

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tea PAVLEK

**VZPOSTAVITEV TESTNEGA SISTEMA ZA
DOLOČANJE MOREBITNEGA AGONIZMA ALI
ANTAGONIZMA INHIBITORJEV RECEPTORJA
DC-SIGN**

DIPLOMSKO DELO
univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tea PAVLEK

**VZPOSTAVITEV TESTNEGA SISTEMA ZA DOLOČANJE
MOREBITNEGA AGONIZMA ALI ANTAGONIZMA
INHIBITORJEV RECEPTORJA DC-SIGN**

DIPLOMSKO DELO
univerzitetni študij

**TEST SYSTEM ESTABLISHMENT FOR DETERMINING
POTENTIAL AGONISM OR ANTAGONISM OF DC-SIGN
INHIBITORS**

GRADUATION THESIS
university studies

Ljubljana 2011

Z diplomskim delom zaključujem univerzitetni dodiplomski študij biotehnologije. Diplomska naloga je bila opravljena v laboratoriju Centra za tipizacijo tkiv, ki deluje v sklopu Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.

Študijska komisija dodiplomskega študija biotehnologije je odobrila prijavljeno diplomsko delo in za mentorja imenovala doc.dr. Miomirja Kneževića; za somentorja dr. Urbana Švajgerja in za recenzentko doc.dr. Tanjo Kunej.

Mentor: doc. dr. Miomir Knežević

Somentor: dr. Urban Švajger

Recenzentka: doc. dr. Tanja Kunej

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof.dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Člani: doc.dr. Miomir Knežević
Biobanka d.o.o., Trzin

dr. Urban Švajger
Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana

doc.dr. Tanja Kunej
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 4.10.2011

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana Tea Pavlek se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tea Pavlek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI):

ŠD Dd
DK UDK 606:577.27(043.2)
KG Receptor DC-SIGN/dendritične celice/agonizem/antagonizem/sintezni ligandi/imunologija
AV PAVLEK, Tea
SA KNEŽEVIĆ, Miomir (mentor)/ŠVAJGER, Urban (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, študij biotehnologije
LI 2011
IN VZPOSTAVITEV TESTNEGA SISTEMA ZA DOLOČANJE MOREBITNEGA AGONIZMA ALI ANTAGONIZMA INHIBITORJEV RECEPTORJA DC-SIGN
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 52 str , 1 pregl., 14 sl., 35 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin) je receptor na površini dendritičnih celic (DC), ki prepoznavajo manozne in fukozne ogljikohidratne ostanke, usmerja migracijo DC, njihovo adhezijo in vnetni odziv, aktivacijo celic T, sprožanje imunskega odgovora in sodeluje pri pobegu patogenov ali tumorskih celic od delovanja imunskega sistema. Dosedanje raziskave so pokazale, da receptor DC-SIGN učinkovito veže glikoprotein gp 120, ki je del ovojnici virusa HIV. Gp 120 je visoko manoziliran in se selektivno z visoko afiniteto veže na domeno CRDDC-SIGN. Sledi internalizacija virusa. DC-SIGN ne sproži procesiranja HIV-1 virusa znotraj DC. Ravno nasprotno, zaščiti ga pred znotrajcelično razgradnjo. Celoten mehanizem interakcije med DC-SIGN in HIV-1 še ni popolnoma znan. HIV-1, vezan na DC-SIGN, je stabilen, infektivnost ostane visoka, virus, ki vstopi v DC, ostane zaščiten pred delovanjem imunskega sistema in se prek infekcijske sinapse iz DC prenese celicam T. Ta sistem v obliki "trojanskega konja" pomeni učinkovito širjenje infekcije in posledično zaviranje funkcij imunskega sistema. Zato so informacije o interakciji med DC-SIGN in gp 120 ključne za razvoj komponent, ki lahko onemogočijo vezavo gp 120 na DC-SIGN, kar pomeni razvoj novih terapij proti okužbam z virusom HIV-1. Za razvoj novih ligandov oz. inhibitorjev DC-SIGN je pomembno dejstvo, da je afiniteta vezave ligandov različna v odvisnosti od strukture liganda. Oligosaharidi, ki vsebujejo manozo ali fukozo, se vežejo z visoko afiniteto. V prejšnjih raziskavah je bil razvit sistem, ki se lahko uporabi za rešetanje potencialnih ligandov oz. inhibitorjev receptorja DC-SIGN. V sklopu omenjenega testnega sistema smo izbrali kandidate za študijo. Poglavitni namen naše študije je vzpostavitev testnega sistema za potencialno določanje morebitnega agonizma oz. antagonizma tovrstnih inhibitorjev DC-SIGN. Za razvoj sinteznih ligandov oz. inhibitorjev potrebujemo informacije o njihovem vplivu na signalizacijske poti po vezavi na DC-SIGN, ki posledično lahko spremenijo profil izražanja citokinov in v končni fazi imunski odziv, ki ga sprožijo DC. Tako lahko dobimo natančnejše odgovore o načrtovanju bodočih ligandov in njihovem terapevtskem potencialu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 606:577.27(043.2)
CX receptor DC-SIGN/dendritic cells/agnism/antagonism/synthetic ligands/immunology
AU PAVLEK Tea
AA KNEŽEVIĆ, Miomir (supervisor)/ŠVAJGER, Urban (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study Programme in Biotechnology
PY 2011
TI TEST SYSTEM ESTABLISHMENT FOR DETERMINING POTENTIAL AGONISM OR ANTAGONISM OF DC-SIGN INHIBITORS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 52 p., 1 tab., 14 fig., 35 ref.
LA sl
AL sl/en
AB DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule 3-Grabbing Nonintegrin) are cell surface receptors on dendritic cells (DC) that recognize mannose and fucose carbohydrate residues, lead DC migration, adhesion, inflammatory response, T cell activation and play a role in pathogen or tumor cells escaping from immune system surveillance. Research shows that DC-SIGN successfully bind HIV envelope glycoprotein gp 120. Gp 120 is a high mannose glycoprotein that selectively and with high affinity binds to the CRD domain on DC-SIGN. Once inside the cell, HIV-1 is protected from intracellular degradation. The whole mechanism of DC-SIGN and HIV interaction is not yet fully known. What we do know is that once bound to DC-SIGN, HIV-1 is stable, infectivity remains high and viruses that enter DC are protected from the immune system and transferred to T cells through infectious synapses. This 'Trojan Horse' system causes successful infection spreading and immune response inhibition. That is why the information about DC-SIGN and gp 120 interaction is crucial for developing components that can inhibit gp 120 binding to DC-SIGN, as they can be potential therapeutic agents against HIV-1 infection. When developing new DC-SIGN ligands or inhibitors it is important to note that the binding affinity to DC-SIGN depends on the ligand structure. Oligosaccharides that contain mannose or fucose bind to DC-SIGN with high affinity. In previous studies a system was developed that can be used for screening potential DC-SIGN synthetic ligands/inhibitors. That was our starting point to choose candidate components for our study. The main focus of our work was to establish a test system that could be used to determine potential agonism or antagonism of synthetic DC-SIGN ligands/inhibitors. To develop these new synthetic agents, we would have to know whether they, after binding to DC-SIGN, influence important signalization pathways, change a cytokine production profile and therefore influence the immune response monitored by DC. This can give us information to consider regarding the development of new synthetic ligands and their future therapeutic use.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 RECEPTOR DC-SIGN	4
2.1.1 Izražanje receptorja DC-SIGN	4
2.1.2 Struktura receptorja DC-SIGN	5
2.1.3 Naravni ligandi DC-SIGN	6
2.2 DENDRITIČNE CELICE –VLOGA IN POMEMBNOST	8
2.2.1 Razvoj DC	9
2.2.2 Receptorji na DC	10
2.3 DC-SIGN IN HIV	11
2.4 IL-10 IN IL-12 V POVEZAVI Z DC-SIGN	14
2.5. SINTEZNI LIGANDI/INHIBITORJI DC-SIGN IN NJIHOV TERAPEVTSKI POTENCIJAL	17
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 IZOLACIJA CELIC	19
3.2 GOJENJE CELIC IN DIFERENCIACIJA	21
3.3 IZLOČANJE CITOKINOV	21
3.4 DOLOČANJE CITOKINSKEGA PROFILA S TESTOM ELISA	22
3.4.1 Postopek (BioLegend Human IL-10 ELISA MAX™ Deluxe Set protokol)	25

3.4.2 Postopek (BioLegend Human IL-12 (p70) ELISA MAX™	
Deluxe Set protokol)	26
3.5 MERJENJE IZRAŽANJA RECEPTORJA DC-SIGN IN MERJENJE AKTIVACIJE DCS PRETOČNO CITOMETRIJO	26
4 REZULTATI	27
4.1 IZRAŽANJE RECEPTORJA DC-SIGN	27
4.2. SINTEZNI LIGANDI IN NJIHOVA SPOSOBNOST AKTIVACIJE DC Z VEZAVO NA DC-SIGN	28
4.2.1 Pretočna citometrija in merjenje aktivacije DC	29
4.3 DOLOČANJE CITOKINSKEGA PROFILA DC	30
4.3.1 Interlevkin 10 (IL-10)	31
4.3.2 Interlevkin 12 (IL-12)	33
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	36
5.1 RAZPRAVA	36
5.1.1 Izražanje receptorja DC-SIGN	37
5.1.2 Pretočna citometrija in merjenje aktivacije DC	37
5.1.3 Določanje citokinskega profila DC	40
5.2 SKLEPI	45
6 POVZETEK	46
7 VIRI	47
ZAHVALA	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura DC-SIGN (Zhou in sod., 2006)	6
Slika 2: Dendritične celice (Abbas in Lichtman, 2009; Tan in sod., 2010)	9
Slika 3: Kontakt med DC in celico T, sinapsa, prikazana z vizualizacijo IA-SEM (Feltsa in sod., 2010)	13
Slika 4: Vizualizacija infekcijske sinapse med celico T in DC z uporabo fluorescenčne mikroskopije (visoka resolucija) (Feltsa in sod., 2010)	13
Slika 5: Struktura sintetiziranega DC-SIGN antagonistu 1 na manozni osnovi (Obermajer in sod., 2010)	17
Slika 6: MACS® (MACS® technology - gold standard in cell separation, 2011)	20
Slika 7: Nivo izražanja receptorja DC-SIGN na DC	27
Slika 8: Gojenje DC s sinteznimi ligandi v času 48 ur	29
Slika 9: Izmerjene koncentracije IL-10	31
Slika 10: Izmerjene koncentracije IL-10, ob prisotnosti LPS	32
Slika 11: Primerjava sprememb citokinskega profila oz. profila izražanja IL-10 pod vplivom določenih sinteznih ligandov DC-SIGN in prisotnosti LPS	33
Slika 12: Izmerjene koncentracije IL-12	33
Slika 13: Izmerjene koncentracije IL-12, ob prisotnosti LPS	34
Slika 14: Primerjava sprememb citokinskega profila oz. profila izražanja IL-12p70 pod vplivom določenih sinteznih ligandov DC-SIGN in prisotnosti LPS	35

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Monovalentni ligandi DC-SIGN (osnovani na manoznični karbohidratni skupini) (Obermajer in sod., 2010). 28

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CLR	lektinski receptorji tipa C
CRD	domena za prepoznavanje ogljikovih hidratov
DC	dendritične celice
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin
DMSO	dimetil sulfoksid
EEE	klastri kislin
ELISA	encimsko imunski test
GM-CSF	faktor, ki spodbuja razvoj granulocitov in monocitov
HAT	histonska acetiltransferaza
HCV	virus hepatitisa C
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti
ICAM	znotrajcelična adhezijska molekula
IFN	interferon
IL	interlevkin
ITAM	aktivacijski motiv, ki temelji na tirozinu
LC	Langerhanske celice
LFA	integrin
LL	di-levcinski motiv
LPS	lipopolisaharidi
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
NF-κB	jedrni faktor kapa B
PBS	fosfatni pufer s soljo
RNA	ribonukleinska kislina
SARS	sindrom akutne respiratorne stiske
TGF	transformirajoči rastni faktor
Th	celice T pomagalke
TLR	Tollu podobni receptorji
TNF	faktor tumorske nekroze

1 UVOD

DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin) je lektin tipa C, ki ga selektivno izražajo dendritične celice (DC). Poglavitna vloga DC je privzem patogenov, njihov prenos v sekundarne limfatične organe in predstavljanje patogenov celicam T. DC-SIGN je receptor, ki prepoznava vzorce, skupne različnim patogenom, oz. manozne in fukozne ogljikohidratne ostanke. Ta receptor vpliva na sprožanje imunskega odziva DC oz. sodeluje pri lovljenju patogenov, migraciji DC, aktivaciji limfocitov T itn (Zhou in sod., 2006).

DC-SIGN prepoznava različne patogene, od virusov (HIV, HCV, SARS, Ebola, hepatitis, citomegalovirus itn.) do bakterij (*Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacilli*, *Streptococcus pneumoniae* itn.) in parazitov (*Schistoma mansoni*) (Zhou in sod., 2006). Na mnogih tipih virusov z ovojnicami so prisotni glikani z visoko vsebnostjo manoze, fukozilirani glikani pa so navadno prisotni na parazitih (Zhou in sod., 2006; Obermajer in sod., 2010).

Receptor DC-SIGN prepoznava ligande, ki jih izražajo patogeni, ter olajša njihovo privzemanje v DC. DC-SIGN interagira tudi z adhezijskimi molekulami, da lahko pride do migracije DC in aktivacije celic T (Zhou in sod., 2006). Aktivacija celic T, ki je odvisna od vzpostavitve stabilne imunološke sinapse, je odvisna od zadostne adhezije med DC in celicami T. Med interakcijami, pomembnimi za stabilizacijo adhezije celic, je tudi vezanje receptorja DC-SIGN na celice T, ki izražajo adhezijske molekule (Zhou in sod., 2006).

Torej, interakcija med receptorjem DC-SIGN na površini DC in ligandom (v naši študiji smo se koncentrirali na gp 120 protein virusa HIV) povzroči: infekcijo DC, njihovo migracijo in prenos patogena iz DC prek imunske sinapse celicam T (CD4+). Ko patogen vstopi v celico, je zaščiten pred litičnim delovanjem imunskega sistema oz. pred znotrajcelično degradacijo (Švajger in sod., 2010).

DC-SIGN na DC ujame HIV tako, da se veže na glikoprotein gp 120, ki sestavlja ovojnico virusa HIV. Po vezavi na DC-SIGN virus vstopi v celico. Virus znotraj celice ohrani svojo

infektivnost, se izogne uničenju in se uspešno prenese naprej celicam T v sekundarnih limfnih organih. Tak sistem prenosa, t. i. "trojanski konj", omogoča širjenje infekcije HIV (Švajger in sod., 2010).

Sistem vezave DC-SIGN in patogenov lahko izkoristimo za načrtovanje in sintezo posebnih ligandov oz. inhibitorjev, ki lahko preprečijo vezavo DC-SIGN in patogenov. Ta pristop ima velik terapevtski potencial, ker lahko že na začetku prepreči prenos patogenov in širjenje okužbe ter infekcijo limfocitov.

V prejšnji študiji so uporabili sistem za oceno kakovosti sintetiziranih ligandov. Sistem je podal informacije o sposobnosti inhibicije receptorja DC-SIGN s sinteznimi ligandi oz. inhibitorji (v smislu zmanjšane adhezije DC na z mananom prevlečene tkivne plošče). Rezultati so bili primerljivi z uporabo specifičnih protiteles, usmerjenih proti DC-SIGN, H200 in 1B10 (Obermajer in sod., 2010). V sklopu navedenega testnega sistema smo nato izbrali primerne kandidate za študijo.

Poglavitni namen naše študije je vzpostavitev testnega sistema za določanje morebitnega agonizma oz. antagonizma tovrstnih inhibitorjev DC-SIGN. Vezava različnih patogenih ligandov na DC-SIGN sproži modulacijo signalizacijskih poti v prid določenemu patogenu. Zaradi tega na koncu pride do sprememb v odzivih celic T (Švajger in sod., 2010). Pri razvoju sinteznih ligandov oz. inhibitorjev DC-SIGN je treba preveriti, ali sintezne spojine spremenijo signalizacijo prek DC-SIGN, kar posledično vpliva na profil izražanja citokinov ter tudi na signalizacijo TLR (Toll like receptors) in imunski odgovor celic T.

Naša vzpostavitev testnega sistema za določanje morebitnega agonizma oz. antagonizma inhibitorjev receptorja DC-SIGN temelji na ideji, da nam citokinski profil lahko predloži informacije o morebitnih spremembah v celični signalizaciji po vezavi naših sinteznih inhibitorjev na DC-SIGN na površini DC. Rezultati so pokazali statistično pomembne spremembe v profilu izražanja citokinov, na kar vpliva prisotnost aktivacijskih signalov (lipopolisaharid in spojine). Ker patogeni izkoriščajo naravne poti signalizacije tako, da jih modulirajo na način, ki koristi njihovemu širjenju infekcije, bodo sklepi tovrstnih raziskav

pripomogli k prihodnjemu načrtovanju ligandov DC-SIGN in natančnejši opredelitvi njihovega terapevtskega potenciala.

1.1. DELOVNE HIPOTEZE

- 1.) Domnevamo, da bomo s pomočjo merjenja količine proizvedenih citokinov IL-10 in IL-12p70 po aktivaciji dendritičnih celic (DC) ob prisotnosti agonista TLR-4 ter sinteznih inhibitorjev receptorja DC-SIGN, lahko sklepali na morebiten agonizem posameznega inhibitorja DC-SIGN. Načrtujemo, da bo morebitna intrinzična aktivnost posameznih inhibitorjev DC-SIGN sprožila aktivacijo omenjenega receptorja ter odgovorno intracelularno signalizacijo. V slednjem primeru, bo aktivacija signalizacijske poti receptorja DC-SIGN vplivala na signalizacijo povzročeno s strani aktivacije TLR-4, kar bo privedlo do sprememb v izražanju ter izločanju IL-10 ter IL-12p70 v supernatante kultur DC ter nakazovalo agonizem DC-SIGN inhibitorjev.
- 2.) Nadalje predvidevamo, da bomo s pomočjo merjenja količine IL-10 ter IL-12p70 v supernatantih kultur po aktivaciji DC ob prisotnosti agonista TLR-4 ter sinteznih inhibitorjev receptorja DC-SIGN, lahko sklepali na morebiten antagonizem posameznega inhibitorja DC-SIGN. Domnevamo, da bo morebitna odsotnost intrinzične aktivnosti posameznih inhibitorjev DC-SIGN pomenila vezavo spojin na receptor ob hkratni odsotnosti aktivacije. V tem primeru ne bo vpliva na aktivacijo TLR-4 signalizacijske poti, kar bo privedlo do enakega izražanja ter izločanja IL-10 ter IL-12p70 kot v supernatantih kontrolnih DC aktiviranih le z agonistom TLR-4.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RECEPTOR DC-SIGN

DC-SIGN je površinski receptor DC, ki veže glikane patogenih organizmov. Je del družine receptorjev CLR (lektinski receptorji tipa C). Oznaka za ta receptor je tudi CD209. DC-SIGN prepoznavata vzorce, ki so skupni različnim patogenom, kot so bakterijski lipopolisaharidi (LPS), prepoznavata manozne in fukozne ogljikohidratne ostanke, usmerja migracijo DC, njihovo adhezijo in vnetni odziv, aktivacijo celic T, sprožanje imunskega odgovora ter sodeluje pri pobegu patogenov ali tumorskih celic od delovanja imunskega sistema (Obermajer in sod., 2010; Zhou in sod., 2006; Steinman 2000; Baribaud in sod., 2002).

2.1.1 Izražanje receptorja DC-SIGN

DC-SIGN izražajo mieloidne DC tako v nezrelem kot zrelem aktivacijskem stanju, dermalne DC, DC v krvi in T celičnem delu limfnih vozlov ter vranice. Izražajo ga tudi DC v mukoznih tkivih. Njegovo izražanje je zelo omejeno, zato je DC-SIGN obenem tudi fenotipski marker za DC (Obermajer in sod., 2010).

DC-SIGN je izražen tudi na površini DC, pridobljenih iz monocitov v *in vitro* pogojih (Obermajer in sod., 2010). Če kulturi monocitov dodamo IL-4 in GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), nezrele DC izražajo visoke koncentracije receptorja DC-SIGN. DC-SIGN se na površini teh celic začne izražati 24 ur po diferenciaciji iz monocitov (Obermajer in sod., 2010). Po navadi pa več kot 80 % monocitov, ki se diferencirajo, izraža receptor DC-SIGN pri 36–48-urni starosti kulture, preden se popolnoma ne razvijejo nezrele DC (Zhou in sod., 2006).

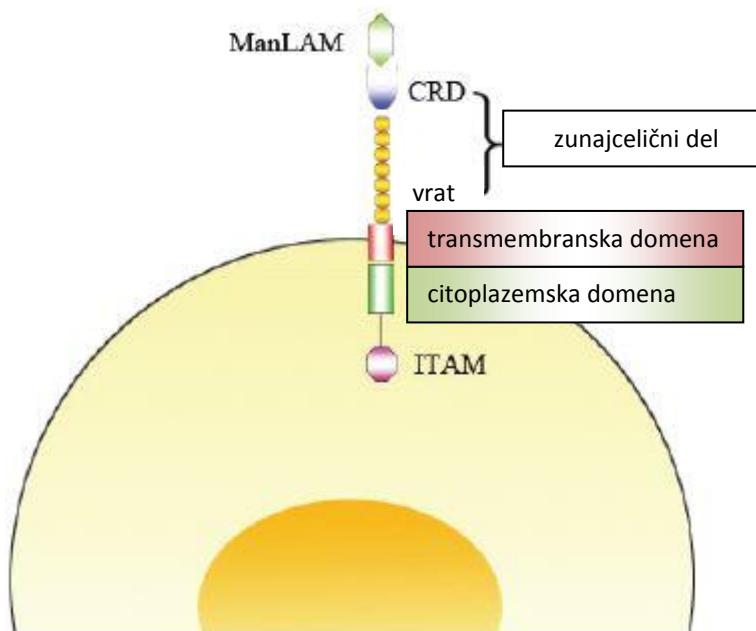
Druge molekule, kot so interferoni IFN- α (interferon- α), IFN- γ , in protivnetni dejavniki, kot je TGF- β (transformirajoči rastni faktor β), negativno regulirajo izražanje receptorja DC-SIGN. Zaradi tega lahko vsebnost citokinov v lokalnem mikrookolju vpliva na

izražanje receptorja DC-SIGN in posledično na *in vivo* zajetje antigena, mediirano z receptorjem DC-SIGN (Zhou in sod., 2006; Relloso in sod., 2002).

2.1.2 Struktura receptorja DC-SIGN

DC-SIGN je tetramerni transmembranski protein tipa II, sestavljen iz 404 aminokislin, molekulska masa je 44 kD. DC-SIGN je sestavljen iz treh delov: 1. zunajcelični, 2. transmembranski in 3. citoplazemski del. (Zhou in sod., 2006).

1. Zunajcelični del vsebuje domeno za prepoznavanje ogljikovih hidratov (Carbohydrate Recognition Domain oz. domeno CRD) in t. i. "vrat" oz. vratno domeno (Zhou in sod., 2006). Del CRD receptorja DC-SIGN ima globularno strukturo, sestavljen je iz 2 α -heliksa, 12 β -verig in treh disulfidnih mostičkov. Del proteina tvori zanko, na kateri sta dve mesti za vezavo Ca²⁺. Eno mesto je ključno za konformacijo CRD, drugo pa za koordinacijo ogljikohidratnih struktur. Štiri aminokisline (Glu347, Asn349, Glu354 in Asn365) reagirajo s Ca²⁺ in uravnavajo prepoznavanje specifičnih ogljikohidratnih struktur. CRD lahko prepozna določene ogljikohidratne antigene, kot so ManLAM (Mannosylated Lipooligosaccharide) in Lewis-x. Vrat molekule DC-SIGN oblikuje stabilne tetramere. Vendar še vedno ni znano, kako struktura vratnega predela pravilno izpostavi mesta za vezanje ligandov. Ker se vrat molekule DC-SIGN šteje za pomembnega pri usmerjanju molekul CRD stran od ogljikohidratnih ligandov v membrani DC in proti površinam patogenega organizma, ima konfiguracija vratu verjetno pomembno vlogo pri ciljanju na patogeni organizem (Zhou in sod., 2006).
2. Transmembranski del je ključen za lokalizacijo DC-SIGN na površini celic (Zhou in sod., 2006).
3. Citoplazemski del vsebuje di-levcinski motiv (LL), klastre kislin (EEE) in aktivacijski motiv ITAM (Incomplete Immunoreceptor Tyrosinebased Activation Motif). LL je odgovoren za privzem antigena, klastri EEE so pomembni za prenos signalov (Zhou in sod., 2006).



Slika 1: Struktura DC-SIGN. Receptor sestavlja citoplazemska, transmembranska in zunajcelična domena. Zunajcelična domena vsebuje domeno CRD za prepoznavanje ogljikohidratov in "vrat". Za prepoznavanje antigenov, ki vsebujejo ogljikohidrate (kot so ManLAM in Lewis-x), so pomembne štiri aminokisline (Glu347, Asn349, Glu354 in Asn365) in mesto za vezavo Ca²⁺ na domeni CRD. Citoplazemska domena vsebuje LL, EEE in ITAM (Zhou in sod., 2006).

2.1.3 Naravni ligandi DC-SIGN

DC-SIGN prepozna vzorce, ki so skupni različnim patogenom. Ta receptor se veže na dva razreda ogljikohidratnih struktur: oligosaharide z visoko vsebnostjo manoze (kot je Man9GlcNAc2) in razvezane, fukozilirane oligosaharide (Zhou in sod., 2006).

DC-SIGN prepozna širok spekter patogenov, od virusov, kot so HIV, HCV, SARS, Ebola, hepatitis, citomegalovirus, do bakterij, kot so *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Lactobacilli*, *Streptococcus pneumoniae*, in parazitov, kot je *Schistoma mansoni* (Zhou in sod., 2006). Glikani z visoko vsebnostjo manoze so v velikem številu prisotni na mnogih tipih virusov z ovojnicami, vključno s HIV, fukozilirane glikane pa navadno najdemo na parazitih (Zhou in sod., 2006, Obermajer in sod., 2010). Torej, DC-SIGN ima pomembno vlogo pri imunosti. Ko pride do interakcij s patogeni ali tumorji,

ti lahko pobegnejo imunskemu nadzoru in preživijo. To je povezano s procesom zaviranja odziva DC (Zhou in sod., 2006; Van Kooyk in Geijtenbeek, 2003).

Poleg lajšanja privzemanja patogenega organizma molekula DC-SIGN interagira z endogenimi glikoproteini, kot sta znotrajcelična adhezijska molekula 2 (ICAM-2) ter ICAM-3, ki omogočita migracijo in interakcijo med DC in celicami T (Zhou in sod., 2006; Engering in sod., 2002; Su in sod., 2004). Interakcije, med receptorjem DC-SIGN na DC in ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule 2) na endotelnih celicah, usmerjajo gibanje progenitornih, nezrelih in zrelih DC (Geijtenbeek in sod., 2000). Celice DC iz krvi potujejo v limfoidna tkiva in sprožijo imunski odgovor. Vezava DC-SIGN in ICAM-2 lahko zdrži pritisk in sile pretoka skozi obtok. DC-SIGN prepoznavata ICAM-2 zaradi njegove glikozilacije (Zhou in sod., 2006).

DC-SIGN in selektini vsebujejo lektinske domene, ki se vežejo na ogljikohidratne strukture endotela. Interakcije med selektinom, receptorjem DC-SIGN, ICAM-2 in kemokini lahko aktivirajo integrin, kot je LFA-1 (Lymphocyte Function-Associated Antigen-1), ter inducirajo adhezijo DC. Obenem se, zaradi vnetja, zviša tudi ICAM-1, kar lahko dodatno okrepi adhezijo, ker pride do interakcije LFA-1-ICAM-1. Za uspešen prehod DC skozi endotel sta pomembni predvsem interakciji DC-SIGN-ICAM-2 in LFA-1-ICAM-1 (Zhou in sod., 2006).

Interakcija DC-SIGN-ICAM-2 inducira začetno adhezijo DC na endotel, učinek je kratek in reverzibilen, LFA-1-ICAM-1 pa pospeši prehod DC skozi endotel. Po prihodu v limfoidna tkiva DC lahko sprožijo začetni imunski odgovor. V limfnih vozlih DC predstavijo svoje antogene znotraj kompleksov MHC (Major Histocompatibility Complex) v obliki peptidov celicam T. Na DC so tudi kostimulatorne molekule, ki so potrebne za popolno aktivacijo celic T (Zhou in sod., 2006).

V centru imunološke sinapse sta TCR (T Cell Receptor) – MHC kompleks in interakcija med CD2 (Cluster of Differentiation 2) in LFA-3. V okviru imunološke sinapse deluje tudi povezava LFA-1-ICAM-1 (Zhou in sod., 2006). LFA-1 na celicah T stabilizira to imunsko

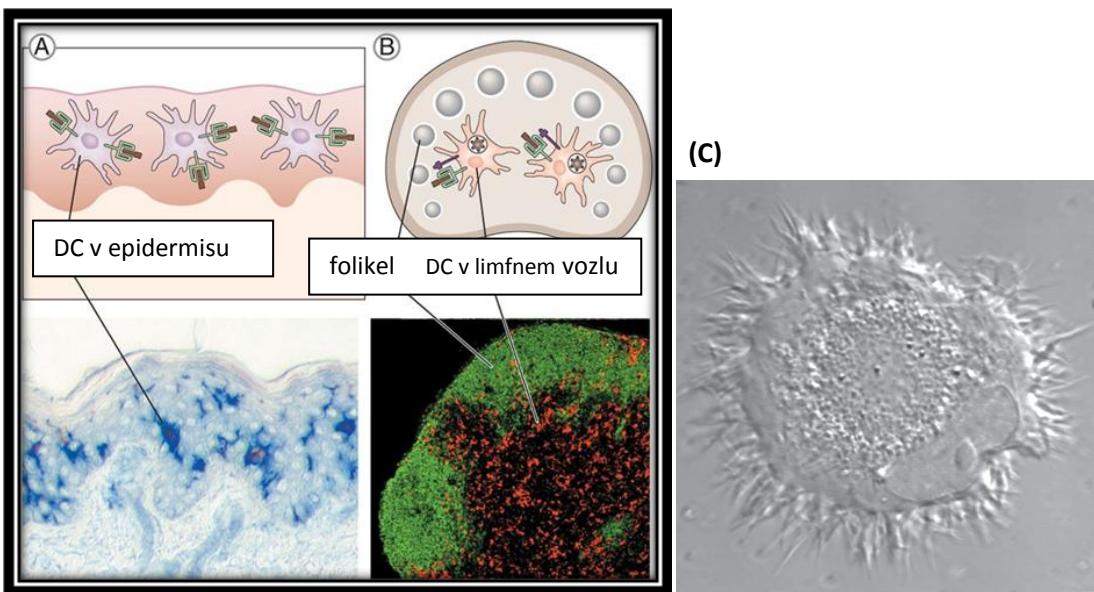
povezavo prek zelo stabilnih interakcij LFA-1-ICAM-1 in CD2-LFA-3 (Zhou in sod., 2006).

Ni še znano, ali je DC-SIGN znotraj imunološke sinapse ali ne. Znano je, da interakcija DC-SIGN-ICAM-3 olajša vezavo receptorjev DC in celic T (Zhou T. in sod., 2006). Optimalna aktivacija celic T je odvisna od zadostne adhezije DC : T, da se tvori stabilna imunološka sinapsa. Ena od interakcij, ki stabilizira adhezijo celic, je vezanje receptorja DC-SIGN na celice T, ki izražajo beljakovino ICAM-3 (Zhou in sod., 2006; Geijtenbeek in sod., 2000).

2.2 DENDRITIČNE CELICE –VLOGA IN POMEMBNOST

Mikrobi vstopajo v telo skozi kožo (kontakt), prek gastrointestinalnega trakta (zaužitje) ali dihal (vdih). Vse površine med telesom in okoljem pokriva sloj epitela, njegova glavna funkcija je fizično preprečiti infekcijo oz. vstop patogena v telo. Epitelna in subepitelna plast tkiva vsebujeta mrežo DC (Abbas in Lichtman, 2009).

DC so antigen predstavljaljoče celice (APC), ki prenašajo antigenske informacije celicam pridobljenega imunskega sistema (Abbas in Lichtman, 2009; Banchereau in Steinman, 1998). DC so večinoma v limfatičnih organih in tudi v drugih organih v manjšem številu. V koži se epidermalne DC imenujejo Langerhanske celice. Prekurzorske celice so skupne makrofagom in DC (MDP – Macrophage and Dendritic Cell Precursor) (Laffont in Powrie, 2009).



Slika 2: Dendritične celice. A, nezrele DC so v epitelu, na sliki so imunohistokemično pobarvane s protitelesi, ki prepoznavajo DC (modra barva) (Mikrograf pripada dr. Y-J. Liu, M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Tekkas.). B, zrele DC, so v limfnih vozlih, v območjih, kjer je veliko celic T. Označene so rdeče, celice B v foliklih pa so označene zeleno (s protitelesi, konjugiranimi s fluorokromi). (Dr. Kathryn Pape and Jennifer Walter, University of Minnesota Medical School, Minneapolis) (Abbas in Lichtman , 2009). C, morfološka zgradba DC: imajo številne izrastke na površini in nepravilna jedra z majhnimi jedrci. Slika je nastala z uporabo konfokalne laserske mikroskopije (Tan in sod., 2010).

2.2.1 Razvoj DC

Razvoj DC sestavlja štiri faze razvoja:

- progenitorne celice v kostnem mozgu;
- prekurzorske DC, ki so v krvnem obtoku, limfi in limfoidnih tkivih;
- nezrele DC v tkivih z visoko sposobnostjo endocitoze in fagocitoze, kjer je njihova poglavitna naloga privzemanje okoljskih antigenov;
- zrele DC, ki po aktivaciji med zorenjem potujejo v sekundarna limfatična tkiva. Ko dozorijo, DC razvijejo t. i. dendritične izrastke. Izražajo tudi večje število kostimulatornih molekul za interakcijo in stimulacijo limfocitov T (Tan in sod., 2010; Banchereau in sod., 2000).

Ko DC privzamejo antigene, se v celicah začne procesiranje tega antigena v peptide, ki jih DC izpostavijo na svoji površini z uporabo kompleksov MHC in jih predstavijo

limfocitom T. Da lahko sprožijo aktivacijo, pomnoževanje in diferenciacijo limfocitov T, proizvajajo citokine in kostimulatorne molekule. Patogene predstavijo različnim podtipom celic T, ki potem diferencirajo v efektorske celice z različnimi funkcijami (Banchereau in sod., 2000).

Celice T pomagalke (Th1) nastanejo iz naivnih CD4+ celic T. Naivne CD8+ celice T pa se razvijejo v citotoksične limfocite T. Če npr. DC proizvajajo več citokina IL-12, nastanejo celice pomagalke Th1 (T helper cells). Če DC proizvajajo več IL-10, je stimuliran nastanek celic Th2 (Banchereau in sod., 2000).

Aktivirani limfociti T potujejo do poškodovanega tkiva. Celice T pomagalke izločajo citokine, kar omogoča aktivacijo makrofagov, celic naravnih ubijalk in eozinofilcev. Citotoksične celice T sprožijo lizo inficiranih celic (ob pomoči celic T pomagalk Th1). Na ta način DC vplivajo na različne elemente imunskega sistema (Banchereau in sod., 2000).

2.2.2 Receptorji na DC

Prepoznavanje patogenov temelji na receptorjih za prepoznavanje vzorcev, ki se izražajo na površini DC. Med te receptorje spadajo TLR, ki prepoznavajo bakterijske in virusne komponente. Lahko vežejo tudi različne proteine, ki se sproščajo iz poškodovanega tkiva (Van Vliet in sod., 2007).

Na površini DC se izražajo tudi membransko vezani CLR, ki prepoznavajo glikanske strukture, izražene na celicah imunskega sistema ali na specifičnih tkivih, kar pripelje do celičnih interakcij med DC in drugimi celicami imunskega sistema. Med te receptorje se uvršča receptor DC-SIGN. CLR funkcirajo kot receptorji za prepoznavanje vzorcev, ki so skupni različnim patogenom. Za zdaj je v človeškem organizmu znanih več kot 60 tipov CLR (Zhou in sod., 2006).

Klasifikacija lektinov temelji na primarni sekvenci proteinov, ki sestavljajo domeno CRD. Za uspešno prepoznavanje ogljikovih hidratov so CLR odvisni od Ca²⁺. Lektine tipa C lahko razdelimo v dve kategoriji glede na aminokislinski motiv, ki je vključen v

prepoznavanje ogljikovih hidratov in koordinacijo iona Ca²⁺ (Zhou in sod., 2006). Manozni lektinski receptorji tipa C vsebujejo sekvenco aminokislin Glu-Pro-Asn znotraj CRD, galaktozni lektinski receptorji tipa C pa sekvenco Gln-Pro-Asp. Glede na to proteinsko sekvenco lahko predvidimo, katere ogljikohidrate določen receptor prepozna. Manozni receptorji, kot so DC-SIGN ali langerin, specifično prepoznavajo manozne in/ali fukozne ostanke glikanov. Galaktozni receptorji, kot je galaktozni lektin na makrofagih, pa prepoznavajo galaktozne ali N-acetylglukozaminske strukture (Van Vliet in sod., 2008).

CLR delujejo kot receptorji za privzem antigenov, po interakciji z glikani je pomembna tudi njihova signalna funkcija, ki vpliva na diferenciacijo in aktivacijo DC v vnetni ali protivnetni fenotip. Da po interakciji DC s patogenom pride do vnetnega odziva, morajo tudi TLR prepoznati vzorce, ki so skupni različnim patogenom, kot so bakterijski LPS, virusne dvojne viačnice RNA itn. Ob prepoznavi patogenov signalizaciji prek TLR in DC-SIGN vplivata druga na drugo (Van Vliet in sod., 2008).

2.3 DC-SIGN IN HIV

DC-SIGN je od kalcija odvisen lektin, ki se z visoko afiniteto veže na manoziliran protein gp 120, ki je del ovojnice virusa HIV. Njegovo izražanje na DC, ki je povezano z njegovo sposobnostjo lajšanja vezave in sledečega prenosa virionov v celice T, je razlog za razvoj hipoteze, da se lahko DC-SIGN uporablja kot kanal za prenos virusa HIV iz periferne mukoze v sekundarne limfne organe (Piguet in sod., 2001; Rowland-Jones, 1999).

DC in Langerhanske celice (LC) so prve tarče infekcije HIV. DC so najprej v nezrelem ali neaktiviranem stanju na perifernih mestih, kot so submukozne površine ali črevo. Ob izpostavitvi patogenom in po posledičnem lokalnem vnetju se DC spremenijo v kaskadi dogodkov, ki poudarjajo njihovo vlogo ključne povezave med prirojenim in pridobljenim imunskim sistemom. Prejmejo zaporedne signale, da se diferencirajo v fenotip zrelih DC, se premaknejo v limfni vozeli, povečajo izražanje kostimulacijskih in adhezijskih molekul, izločajo kemokine, ki privlačijo celice T in spremenijo svojo morfologijo. Vsi ti procesi olajšajo združevanje mnogih naivnih celic T z DC, ki privzamejo patogeni.

(mikro)organizem, kar žene preferenčno aktivacijo antigen specifičnih celic T (Piguet in sod., 2001; Rowland-Jones, 1999).

Antigen specifične naivne celice T se razvijejo v efektorske celice T, ki potujejo nazaj na mesta vnetja, kjer uničijo vdirajoči patogeni (mikro)organizem. S tem imajo DC ključno vlogo pri zajetju in izpostavitvi antiga pridobljenemu imunskemu sistemu (Piguet in sod., 2001).

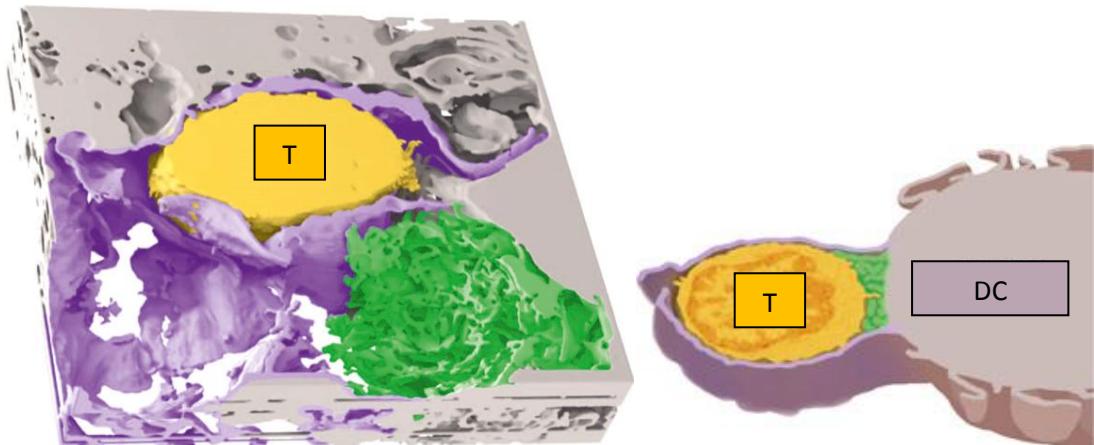
Torej, interakcija med DC in HIV povzroči direktno infekcijo DC, potem DC prenesejo virus prek infekcijske sinapse celicam T (CD4+). HIV inficira celice T med njihovo aktivacijo in njihovim stikom z DC (Piguet in sod., 2001; Masso., 2003, Su in sod., 2003).

Virus HIV ne izkorišča samo zgoraj opisanega naravnega procesa potovanja dendritičnih DC, temveč tudi stimulativno sposobnost aktiviranih DC na celice T za prenos in razmnoževanje virusov. Učinkovitost prenosa in razmnoževanja virusa HIV je odvisna od sposobnosti DC, da privlačijo, vežejo in aktivirajo celice T CD4+ (Zhou in sod., 2006).

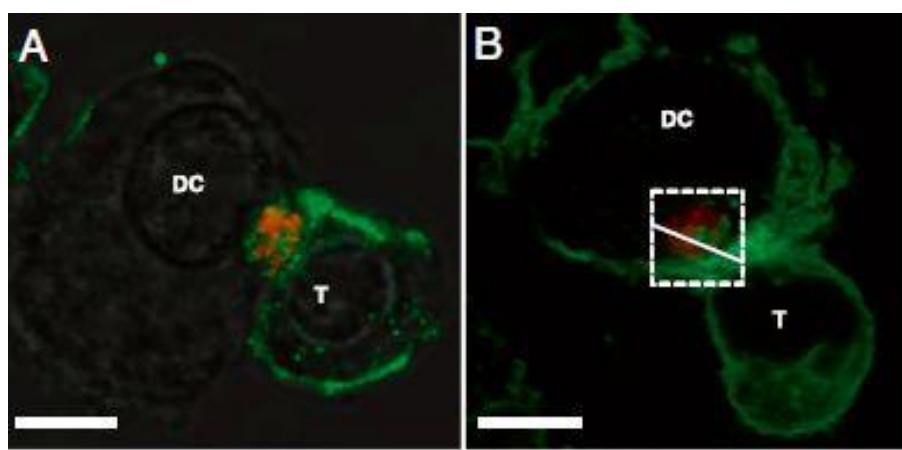
DC-SIGN na DC ujame HIV-1 tako, da se veže na gp 120. Gp 120 je glikoprotein, ki sestavlja ovojnicu virusa HIV-1. Sledi prenos virusa v limfoidno tkivo in prenos celicam T (Trumpfheller in sod., 2003; Geijtenbeek in sod., 2000). Informacije o interakciji med DC-SIGN in gp 120 so ključne za razvoj komponent, ki lahko onemogočijo vezavo gp 120 na DC-SIGN, kar pomeni razvoj novih terapij proti okužbam z virusom HIV-1. Visoko manoziliran glikoprotein iz virusne ovojnici, gp 120, se selektivno z visoko afiniteto veže na domeno CRD DC-SIGN; ta interakcija nato sproži internalizacijo virusa HIV (Piguet in sod., 2001; Švajger in sod., 2010; Obermajer in sod., 2010).

Avidnost vezave DC-SIGN na gp 120 je visoka. DC-SIGN ne sproži procesiranje virusa HIV-1 v DC, ampak ga zaščiti pred znotrajcelično razgradnjo. Celoten mehanizem interakcije med DC-SIGN in HIV-1 še ni popolnoma znan (Zhou in sod., 2006; Kwon in sod., 2002). Celice, ki izražajo DC-SIGN, po privzemuh virusa, lahko virione HIV-1 zadržijo v infektivnem stanju več dni (Sewell in Price, 2001).

HIV-1, vezan na DC-SIGN, je izredno stabilen in količina virusa, ki vstopi v DC, ostane zaščitena pred delovanjem imunskega sistema, obenem pa infektivnost virusa ostane visoka. Virus ostane skrit znotraj celic v multivezikularnih telescih, ki se razlikujejo od lizosomov ali endosomov. DC potem prek infekcijske sinapse prenesejo virus celicam T (Obermajer in sod., 2010).



Slika 3: Kontakt med DC in celico T, sinapsa, prikazana z vizualizacijo IA-SEM (elektronska mikroskopija). Celica T (1) je rumeno pobarvana, DC je pa sive barve. Slika prikazuje membranske podaljške DC (vijoličasto in zeleno) na mestu kontakta med DC in celico T . Desno je shematska oblika te povezave oz. sinapse med celicami (Feltsa in sod., 2010).



Slika 4: Vizualizacija infekcijske sinapse med celico T in DC z uporabo fluorescenčne mikroskopije (visoka resolucija). (A) in (B) mikroskopija STED. HIV je označen z rdečo barvo (ATTO-647N), celice CD4+ T so

označene s protitelesom anti-CD3 (A) ali fluorescenčnim faloidinom (B), ki je marker za distribucijo aktina (zeleno). (A, B – 3 µm) (Feltsa in sod., 2010).

Torej, HIV-1 vstopi v DC prek vezave na receptor DC-SIGN, kar virusu omogoči, da se izogne litični degradaciji. Obenem se HIV izogne tudi delovanju imunskega sistema gostitelja, ohrani svojo infektivnost in ga DC predstavijo direktno celicam T. Ta celoten sistem v obliki "trojanskega konja" omogoča učinkovito širjenje infekcije HIV (Švajger in sod., 2010).

Sistem vezave receptorja DC-SIGN in njegovih ligandov lahko izkoristimo za dizajn in sintezo posebnih molekul, ki lahko preprečijo vezavo DC-SIGN in patogenih ligandov, kar ima velik terapevtski potencial, saj lahko že na začetku prepreči prenos patogenov in širjenje okužbe ter infekcijo limfocitov (Obermajer in sod., 2010).

2.4 IL-10 IN IL-12 V POVEZAVI Z DC-SIGN

Interlevkin 10 (IL-10) je znan kot protivnetni citokin. Proizvajajo ga DC in regulatorne celice T tipa. IL-12 je citokin, ki je vključen v diferenciacijo celic T v celice pomagalke Th1. Pospeši nastajanje IFN- γ in TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha), ki ga proizvajajo celice T in celice naravne ubijalke. IL-12 pospešuje delovanje citotoksičnih limfocitov T (predvsem potrebujejo IFN- γ za delovanje) in celic naravnih ubijalk (Abbas in sod., 2009).

Na odgovor celic imunskega sistema oz. na uspešno aktivacijo celic T in njihovo diferenciacijo v fenotip Th1 ali Th2 vplivajo citokini, posebej IL-12 in IL-10, ter tudi tkivno mikrookolje in IL-4 (Geijtenbeek in sod., 2003). Za razvoj novih terapij je posebej zanimiv glikoprotein gp 120 iz ovojnici virusa HIV-1. V celičnih kulturah gp 120 lahko stimulira DC, da začnejo proizvajati IL-10. Ta citokin deluje protivnetno in imunosupresivno oz. zavira odziv imunskega sistema. Gp 120 tako vpliva na DC zaradi vezave manoznih ostankov gp 120 na receptor DC-SIGN. Če se encimsko odstranijo ti manozni ostanki, prisotni na gp 120, se ne poveča izločanje IL-10 in ni motena dozoritev DC. Isti učinek povzroči tudi vezava inhibitorjev vezave gp 120 na DC-SIGN (kot so

protitelesa anti-DC-SIGN). To se lahko uporabi za razvoj novih protivirusnih učinkovin, usmerjenih proti širjenju infekcije HIV-1 (Shan in sod., 2007).

Modulacija aktivnosti Nf- κ B (Nuclear factor-kappaB) kot prepletanje signalizacij TLR in DC-SIGN zelo pomembno vpliva na izločanje citokinov (Švajger in sod., 2010; Gringhuis in sod., 2007). Modulacija signalizacije TLR (na katero vpliva DC-SIGN) vpliva na modifikacijo aktivnosti NF- κ B (Švajger in sod., 2010; Gringhuis in sod., 2007).

Aktivacija DC z agonisti TLR in posledično nastajanje vnetnih citokinov, kot je IL-12p70 (IL-12p70 je biološko aktivna struktura IL-12), in imunosupresivnega IL-10, je odvisna od aktivacije in translokacije NF- κ B. Pri nezrelih DC so proteini NF- κ B v citoplazmi in se ne morejo translocirati v jedro, ker so vezani na inhibitorne faktorje. Ko se DC aktivirajo, se lahko dimer NF- κ B (dimer p50-p65, najpogostejsa oblika aktivnega NF- κ B) translocira v jedro in vpliva na transkripcijo različnih genov (veže se na tarčna zaporedja DNA). Na aktivnost NF- κ B, razen začetnih inhibitorjev, vplivajo tudi različne modifikacije, ki spreminjajo sposobnost vezave NF- κ B na DNA. Večinoma gre za posttranslacijske modifikacije, kot sta fosforilacija in acetilacija. Na ta način signalizacija prek receptorja DC-SIGN, ki aktivira Raf-1 in stimulira acetilacijo NF- κ B, povzroči modifikacijo dimera NF- κ B tako, da se poveča aktivnost NF- κ B, do njegove translokacije v jedro in daljšega zadrževanja NF- κ B na promotorju za IL-10, kar pomeni povečano proizvajanje IL-10 (Švajger in sod., 2010).

Torej, signalizacija DC-SIGN je odvisna od ligandov. Aktivacija receptorja DC-SIGN z ManLam ali gp 120 povzroči povečano fosforilacijo Raf-1 kinaze. Aktivacija Raf-1 (prek fosforilacije) je pomembna, ker je Raf-1 odgovorna za fosforilacijo dimera NF- κ B v jedru. Ta korak je predpogoj, da lahko pride do modifikacije NF- κ B s histonskimi acetiltransferazami (HAT). Acetilacija NF- κ B vpliva na povečano vezavo NF- κ B na DNA in transkripcijsko aktivnost NF- κ B. Posledično se poveča proizvajanje IL-10, pa tudi IL-12p70 (Švajger in sod., 2010).

Modifikacija aktivnosti NF- κ B seveda ni edini mehanizem, prek katerega pride do prepletanja signalizacij TLR in DC-SIGN. Tudi ligandi, kot je Salp 15 (protein iz klopa

Ixodes scapularis), po vezavi na DC-SIGN sprožijo aktivacijo Raf-1 kinaze in vplivajo na proizvajanje citokinov (proizvajajo jih DC) v prisotnosti LPS (ki aktivira receptorje TLR). Tak ligand zmanjša proizvajanje IL-12p70 (IL-12p70 je biološko aktivna struktura IL-12) in poveča nastajanje IL-10 (imunosupresija), vendar pa ne pride do modulacije aktivnosti NF-κB (v tem primeru Raf-1 aktivira pot signalizacije MEK-z mitogenom aktivirane kinaze) (Švajger in sod., 2010; Juncadella in sod., 2007).

Torej, gp 120 sproža produkcijo IL-10 in IL-12. Ta proces je odvisen od interakcij med manoznimi ostanki na gp 120 in receptorji na DC. Izločanje IL-10 iz DC je odvisno tudi od koncentracije in tipa proteina gp 120 (Shan in sod., 2007). Aktivacija celic T z DC, po vezavi gp 120 na DC-SIGN, se zmanjša zaradi povečanega razmerja IL-10/IL-12p70 (Shan in sod., 2007). Do znižane aktivacije celic T verjetno pride tudi zato, ker je zmanjšano izražanje kostimulatornih molekul (CD80, CD83 in CD86). Povečano nastajanje IL-10 je skupaj z motnjami v dozoritvi DC in neučinkovitim sprožanjem odgovora celic T pokazatelj učinka gp 120 na DC (Shan in sod., 2007).

Študije so pokazale, da gp 120 in inaktivirani virioni HIV-1 vplivajo na DC, njihove interakcije s celicami T in izločanje citokinov v *in vitro* pogojih (Shan in sod., 2007). Tudi drugi patogeni ligandi izkoriščajo vezavo na receptor DC-SIGN za zaviranje in modulacijo imunskih odzivov. Vezava *Helicobacter pylori* na DC-SIGN tudi povzroči povečano produkcijo IL-10. Povečano izločanje IL-10 zmanjšuje kronično vnetje in zmanjša poškodbo tkiva ter zavira imunski odziv proti tej bakteriji (Bergman in sod., 2004). *Schistosoma mansoni* in *Leishmania mexicana* se tudi vežeta na DC-SIGN, kar ima podoben učinek na imunski odziv (Bergman in sod., 2004).

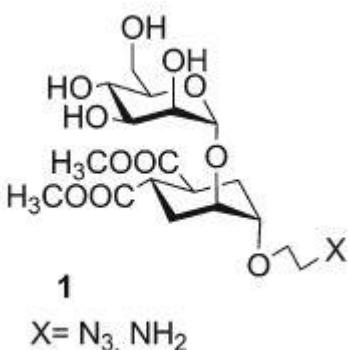
ManLAM, izražen na *Mycobacterium tuberculosis*, se specifično veže na DC-SIGN, zavira dozoritev inficiranih DC in sproži proizvajanje IL-10, ki zmanjša imunski odgovor in olajša infekcijo. DC posledično ne morejo učinkovito sprožiti odgovor celic T, ker je zmanjšano izražanje kostimulatornih molekul in nastajanje IL-12. ManLAM torej prek vezave na DC-SIGN zavira nastajanje IL-12 in poveča izražanje IL-10. To lahko celo pripelje do tolerance celic na ta patogen (Geijtenbeek in sod., 2003).

Zaradi takih posledic vezave patogenov na DC-SIGN je pomembno oblikovati strategije inhibicije specifičnih interakcij med receptorjem DC-SIGN in patogeni, brez vpliva na normalne imunološke funkcije receptorja DC-SIGN na DC. Z drugimi besedami to pomeni ustvariti sintezne inhibitorje DC-SIGN in se obenem zavedati njihovega morebitnega vpliva na imunski sistem zaradi potencialnega agonizma/antagonizma (Geijtenbeek in sod., 2003).

2.5 SINTEZNI LIGANDI/INHIBITORJI DC-SIGN IN NJIHOV TERAPEVTSKI POTENCIAL

DC-SIGN specifično veže manozne in fukozne ostanke glikoziliranih endogenih proteinov (ICAM-2 in ICAM-3) ter manozilirane vzorce, skupne različnim patogenom, kot sta gp 120 na virusu HIV-1, ManLAM na *M. tuberculosis* itn (Appelmelk in sod., 2003; Obermajer in sod., 2010). Afiniteta vezave je različna v odvisnosti od strukture liganda. Oligosaharidi, ki vsebujejo manozo ali fukozo, se vežejo z visoko afiniteto, afiniteta za vezavo samo manoze ali fukoze je pa nižja (gre za multi- oz. monovalentno vezavo) (Obermajer in sod., 2010).

Na receptorju DC-SIGN sta dva mesta za vezavo ligandov, ki ju po navadi izkoriščajo naravni ligandi. To lahko izkoristimo za dizajn novih ligandov oz. inhibitorjev. V prejšnjih raziskavah je bila sintetizirana majhna knjižnica ligandov za receptor DC-SIGN. Najprej je sintetiziran DC-SIGN antagonist 1 na manozni osnovi, ki je bil izhodišče za nove derivate (Obermajer in sod., 2010).



Slika 5: Struktura sintetiziranega DC-SIGN antagonista 1 na manozni osnovi. (Obermajer in sod., 2010).

Prvi sintetizirani ligandi so bili v monomernih oblikah. Imeli so precej nizko afiniteto vezave na DC-SIGN. V multimernih oblikah se je njihova učinkovitost povečala oz. so učinkovito preprečili širjenje virusne infekcije z receptorjem DC-SIGN (Obermajer in sod., 2010).

Sistem, uporabljen v prejšnji študiji za oceno kakovosti sintetiziranih ligandov, podaja rezultate sposobnosti inhibicije ligandov na DC-SIGN v smislu zmanjšane adhezije DC na z mananom prevlečene tkivne plošče. Rezultati so bili primerljivi z uporabo specifičnih protiteles, usmerjenih proti DC-SIGN, H200 in 1B10 (Obermajer in sod., 2010). Uporaba protiteles je prav tako potrdila pomembnost DC-SIGN za vezavo celic na manozne ostanke. Če se protitelesa 1B10 vežejo na DC-SIGN, je vezava na plošče inhibirana do 80 %, protitelo H200 povzroči 65-odstotno inhibicijo. To pomeni, da ima DC-SIGN pri vezavi na manozne ostanke glavno vlogo, poleg drugih receptorjev (Obermajer in sod., 2010).

Ta sistem se lahko uporabi za rešetanje potencialnih ligandov oz. inhibitorjev receptorja DC-SIGN. V sklopu omenjenega testnega sistema smo nato izbrali primerne kandidate za našo študijo, katere poglaviti namen je vzpostavitev testnega sistema za potencialno določanje morebitnega agonizma oz. antagonizma tovrstnih inhibitorjev DC-SIGN. Sklepi tovrstnih raziskav bodo pripomogli k prihodnjemu načrtovanju ligandov DC-SIGN in natančnejši opredelitvi njihovega terapevtskega potenciala.

3 MATERIALI IN METODE

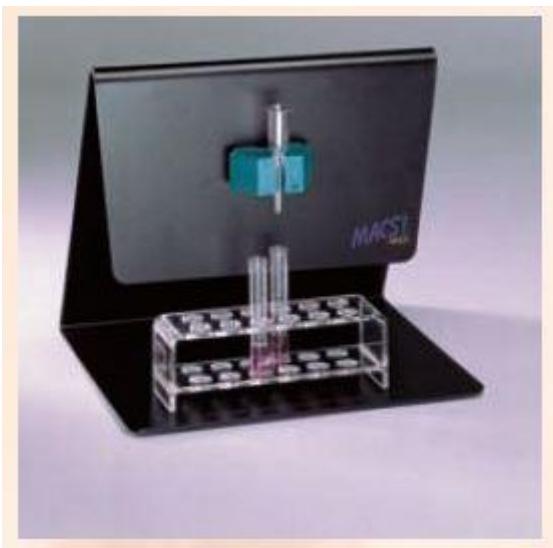
3.1 IZOLACIJA CELIC

Celice smo izolirali iz vzorca krvi (iz ene plastične vrečke, polne krvi).

Prvi korak pri izolaciji celic je bilo gradientno centrifugiranje prek fikola.

- Vzorec krvi smo prelili v gojitveno posodico in dopolnili s fosfatnim pufrom oz. PBS (Phosphate Buffered Saline) do 150 ml.
- Po 12 ml fikola (sobna temperatura) smo dali v centrifugirke, dodali 500 µl PBS, premešali in v vsako centrifugirko dodali po 25 ml vzorca krvi iz gojitvene posodice.
- Sledilo je centrifugiranje: 15 min, 2300 vrt./min
- Po centrifugiranju smo dobili plasti, v katerih so različne celice: na dnu so eritrociti (rdeče barve), sledi plast fikola, na sredini je bela plast mononuklearnih celic, ki vsebuje večinoma bele krvne celice in makrofage, zgornja plast pa sestavljena iz plazme, pufra itn. Bistvo tega načina centrifugiranja je ločevanje po gostoti komponent.
- Previdno smo iz vsake centrifugirke odstranili samo belo plast celic, ker so v njej monociti, ki nas zanimajo. Celice smo združili v eno centrifugirko, dopolnili do 50 ml s PBS in centrifugirali (8 min, 1600 vrt./min).
- Po centrifugiranju smo odlili supernatant, resuspendirali celice v peletu s PBS in ponovno centrifugirali (8 min, 1200 vrt./min). Spiranje smo ponovili trikrat.

Naslednji korak je bilo ločevanje celic z metodo MACS® (Miltenyi Biotec). Metoda temelji na uporabi mikromagnetkov MACS in kolon MACS, ki omogočajo ločevanje celic, označenih z minimalno količino magnetnega materiala pod vplivom magnetnega polja.



Slika 6: MACS® (MACS® technology - gold standard in cell separation, 2011)

Mikromagnetki (MB-microbeads) so vezani na specifična monoklonska protitelesa, ki omogočajo optimalno ločevanje in se vežejo na markerje na površini celic. Premer mikromagnetkov je približno 50 nanometrov (MACS® technology - gold standard in cell separation, 2011). MB so biorazgradljivi, tako da jih po ločitvi celic ni treba odstraniti. MB ne vplivajo na strukturo, funkcijo ali aktivnost označenih celic ter tudi ne vplivajo na potek eksperimentov, ki sledijo (MACS® technology - gold standard in cell separation, 2011).

- Najprej smo pripravili pufer za MACS, ki je sestavljen iz 25 ml PBS in 125 µl FBS (0,5 % količine PBS je FBS).
- Po zadnjem odlitju supernatanta smo celice, izolirane iz krvi, resuspendirali v pufru za MACS (v 700–900 µl pufra).
- Tej suspenziji smo dodali mikromagnetke. Na vsakih 100 µl pufra smo dodali 10 µl MB, torej, v predhodno dodanih 700 µl pufra, smo zdaj dodali 70 µl MB in premešali.
- Suspenzijo smo dali v hladilnik za 20 min (da se zmanjšajo medcelične interakcije).
- Po 20 minutah smo celice sprali: dodali smo 20 ml PBS in centrifugirali (7 min, 1400 vrt./min). Po centrifugi smo resuspenzirali celice iz peleta v 900 µl pufra (iz hladilnika).

- Sestavili smo kolono MACS in jo postavili v separator MACS, ki je v bistvu močan magnet. Ko smo ju združili, se je vzpostavilo dovolj močno magnetsko polje, da lahko znotraj kolone zadrži celice, ki so označene z majhnimi količinami MB. Neoznačene celice se ne zadržijo na koloni in tečejo skozi kolono. Celice (v našem primeru označeni monociti) ostanejo v koloni in se potem sprostijo iz kolone enostavno tako, da kolono odstranimo iz magneta. Ta sistem omogoča hitro in enostavno izolacijo in ločevanje označenih in neoznačenih celic. Postopek traja največ 30 minut, celice pa se lahko takoj uporabijo za nadaljevanje raziskav.
- Suspenzijo celic smo dali na kolono MACS in pustili, da se filtrira.
- Potem smo dodali še 1 ml pufra in dvakrat sprali s 4 ml pufra.
- Po spiranju smo zamenjali centrifugirko (v katero teče suspenzija iz kolone), kolono smo odstranili iz magneta in s 3 ml pufra sprali naše tarčne celice iz kolone (pritisnili smo z batom).
- Potem smo centrifugirali (7 min, 1400 vrt./min) in prešteli celice (štetje s tripanom, stevna ploščica Bürker-Türk)

3.2 GOJENJE CELIC IN DIFERENCIACIJA

Sledilo je gojenje celic: kompletno gojišče (RPMI, L-glutamin), citokini (IL-4), rastni faktorji (GM-CSF). Koncentracije so bile: IL-4 1000 U/ml in GM-CSF 800 U/ml. Čez dva dni smo polovico medija zamenjali z novim medijem in spet dodali enako količino citokinov.

3.3 IZLOČANJE CITOKINOV

Pet dni po izolaciji so celice diferencirale iz monocitov v iDC. Pobrali smo vsebino gojitvenih posodic, centrifugirali (7 min, 1400 vrt./min) in resuspendirali pelet v mediju ($V = 2 \text{ ml}$). Celice smo prešteli.

Potem smo v vsako luknjico na plošči s 24 luknjicami dodali:

1. 500 µl medija
2. GM-CSF 800 U/ml

V določene luknje smo potem dodali še posamezne kontrole:

1. $0,5 \times 10^6$ DC (plošča s 24 luknjicami). Za ploščo s 96 luknjicami pa 1×10^5 DC
(netretirano)
2. 3 ug/ml gp 120
3. 0,5 ug/ml protitelesa H200
4. 0,5 ug/ml protitelesa 1B10

V preostale luknjice smo dodali spojine: L, N, Q, S, V, M001, M005, M030. Končna koncentracija je bila 125 µM (Izbrali smo jih na podlagi prejšnjih raziskav, ki so pokazale, da te spojine vplivajo na profil izločanja citokinov iz DC). Na koncu smo še v vsako luknjico dodali $0,5 \times 10^6$ celic. Opisana razporeditev vzorcev je brez dodanega lipopolisaharida (LPS). Naredili smo še ponovitev, pri kateri je vse bilo enako, le k vsakemu vzorcu smo dodali še 20 ng/ml LPS. Čez dva dni inkubacije (po 48 urah) smo vzeli supernatante iz celičnih kultur in jih zamrznili za poznejšo določitev citokinov z ELISO.

3.4 DOLOČANJE CITOKINSKEGA PROFILA S TESTOM ELISA

Naslednji korak je bil test ELISA (angl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

Uporabili smo:

- BioLegend Human IL-10 ELISA MAX™ Deluxe Set
- BioLegend Human IL-12 (p70) ELISA MAX™ Deluxe Set

BioLegend Human IL-10 ELISA MAX™ Deluxe Set:

ELISA MAX™ Deluxe Set je t. i. "sendvič" metoda, pri kateri se najprej monoklonska protitelesa, ki so specifična za IL-10, vežejo (t. i. "coating" postopek) na ploščo s 96 luknjicami (angl. 96-well). Potem se dodajo standardi in vzorci. IL-10 se veže na pritrjeno protitelo (angl. *capture antibody*). Ko se doda še biotinizirano protitelo oz. detekcijsko protitelo, nastane "sendvič" protitelo-antigen-protitelo. V naslednjem koraku se doda peroksidaza (angl. *avidin-horseradish peroxidase*), potem se doda še TMB raztopina substrata in nastane modroobarvanje, ki je proporcionalno koncentraciji IL-10, prisotni v posameznem vzorcu. Na koncu dodajanje stop-raztopine spremeni modro barvo v rumeno in sledi merjenje absorbance (450 nm) s čitalnikom. Minimalna koncentracija IL-10, ki jo lahko zazna ta sistem, je 2 pg/ml (ELISA MAX™ Deluxe Sets - Human IL-10, 2011).

Materiali v kompletu reagentov

- Human IL-10 ELISA MAX™ "Capture" protitelo (200X)
- Human IL-10 ELISA MAX™ detekcijsko protitelo (200X)
- Standard Human IL-10
- Avidin-HRP (1000X)
- raztopina substrata A
- raztopina substrata B
- Coatingpufer(5X)
- Redčilo (angl. *assay diluent*, AD) (5X)
- plošče NUNC MaxisorpTM 96 MicroWell

Dodatni materiali, ki smo jih potrebovali:

- čitalnik za merjenje absorbance iz plošč s 96 luknjicami pri 450 nm
- pipete (od 2 µl do 1 ml)
- deionizirana voda

- PBS (angl. *Phosphate-Buffered Saline*): 8,0 g NaCl, 1,16 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄, 0,2 g KCl, dopolniti z deionizirano vodo do 1 L; pH 7,4
- pufer za spiranje (angl. *wash buffer*) (Phosphate-Buffered Saline (PBS) + 0,05 % Tween-20, pH 7,4)
- "Microplate washer", ki avtomatično spira plošče
- stop-raztopina (2N H₂SO₄)
- programska oprema za analizo podatkov

Priprava reagentov (reagente in redčitve smo pripravili tik pred uporabo):

1. Redčitev "coating" pufra z deionizirano vodo od 5-X do 1-X-koncentracije:
Za eno ploščo smo razredčili 2,4 ml 5X "coating" pufra v 9,4 ml deionizirane vode
2. Redčitev t. i. "capture" protitelesa 1 : 200 v 1X "coating" pufru:
Za eno ploščo smo razredčili 60 µl "capture" protitelesa v 12 ml 1X "coating" pufra.
3. Redčitev AD od 5-X do 1-X s PBS (pH 7,4):
Za 50 ml smo redčili 10 ml 5X AD v 40 ml PBS
4. Liofiliziranemu standardu smo dodali liofiliziranega 0,2 ml 1X AD. Pustili smo standard na sobni temperaturi vaj 15 min pred uporabo
5. Iz založne raztopine smo pripravili 1,000 µl standarda s koncentracijo 250 pg/ml
6. Redčitev biotiniziranega detekcijskega protitelesa 1 : 200 v 1X AD:
Za eno ploščo smo razredčili 60 µl detekcijskega protitelesa v 12 ml AD
7. Redčitev Avidin-HRP 1 : 1000 v 1X AD.
Za eno ploščo smo razredčili 12 µl Avidin-HRP v 12 ml AD.
8. Raztopina TMB je mešanica enakih volumnov raztopine substrata A in raztopine substrata B. Za eno ploščo smo 6 ml raztopine substrata A zmešali s 6 ml raztopine substrata B (ELISA MAXTM Deluxe Sets - Human IL-10, 2011)

3.4.1 Postopek (protokol BioLegend Human IL-10 ELISA MAX™ Deluxe Set)

1. Dan pred izvajanjem testa ELISA smo dodali 100 µl raztopine "capture" protitelesa v vseh 96 luknjic na plošči. Vsako ploščo smo zaprli in inkubirali čez noč (16–18 ur) na 4 °C. Imeli smo dve plošči.
2. Pred uporabo smo vse reagente dali na sobno temperaturo.
3. Vsako ploščo smo štirikrat sprali (uporabili smo t. i. "Washer", ki avtomatično spira plošče s puferom za spiranje).
4. Dodali smo 200 µl 1X AD v vsako luknjico. S tem blokiramo nespecifično vezavo in zmanjšamo vpliv ozadja na rezultate pri merjenju absorbance.
5. Plošči smo zaprli in ju inkubirali pri sobni temperaturi eno uro.
6. Pripravili smo redčitve standarda.
7. Redčitve standarda: 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml in 3,9 pg/ml. AD velja kot standard s koncentracijo 0 pg/ml.
8. Vsako ploščo smo sprali 4-krat.
9. Dodali smo 100 µl standardov in vzorcev v posamezno določeno luknjico.
9. Torej, imeli smo dve plošči s 96 luknjicami. Ena plošča je bila namenjena merjenju količine IL-10, druga IL-12. Na vsaki plošči so bili:
 10. vzorci: L, N, Q, S, V, M001, M005, M030
 11. vzorci: L, N, Q, S, V, M001, M005, M030 z dodanim LPS
 12. kontrole: netretiran vzorec, gp 120, H200, 1B10, LPS
 13. ustrezne redčitve standardov
10. Vsako ploščo smo zaprli in inkubirali dve uri pri sobni temperaturi.
11. Vsako ploščo smo sprali 4-krat.
12. Dodali smo 100 µl redčenega detekcijskega protitelesa v vsako luknjico, plošči smo zaprli in ju inkubirali eno uro pri sobni temperaturi.
13. Vsako ploščo smo sprali 4-krat.
14. Dodali smo 100 µl pripravljene raztopine Avidin-HRP v vsako luknjico, plošči smo zaprli in ju inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi.
15. Vsako ploščo smo sprali 4-krat. Postopek smo ponovili dvakrat.

16. Dodali smo 100 µlTMB raztopine substrata in inkubirali v temi 30 minut. Pozitivni vzorci so se obarvali modro.

17. Reakcijo smo ustavili z dodajanjem 100 µl stop raztopine v vsako luknjico.

18. Pozitivni vzorci so spremenili barvo iz modre v rumeno.

Merili smo absorbanco (450 nm) takoj tekom naslednjih 30 minut.

(ELISA MAXTM Deluxe Sets - human IL-10, 2011)

3.4.2 Postopek (protokol BioLegend Human IL-12 (p70) ELISA MAXTM Deluxe Set)

Postopek je enak kot za IL-10.

Edine razlike so pri pripravi standardov (7. korak protokola):

Redčitve standarda za IL-12: 1,000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml in 15,6 pg/ml. AD velja kot standard s koncentracijo 0 pg/ml Raztopina TMB je mešanica enakih volumnov raztopine substrata A in raztopine substrata B. Za eno ploščo smo 6 ml raztopine substrata A zmešali s 6 ml raztopine substrata B. (ELISA MAXTM deluxe sets - Human IL-10, 2011)

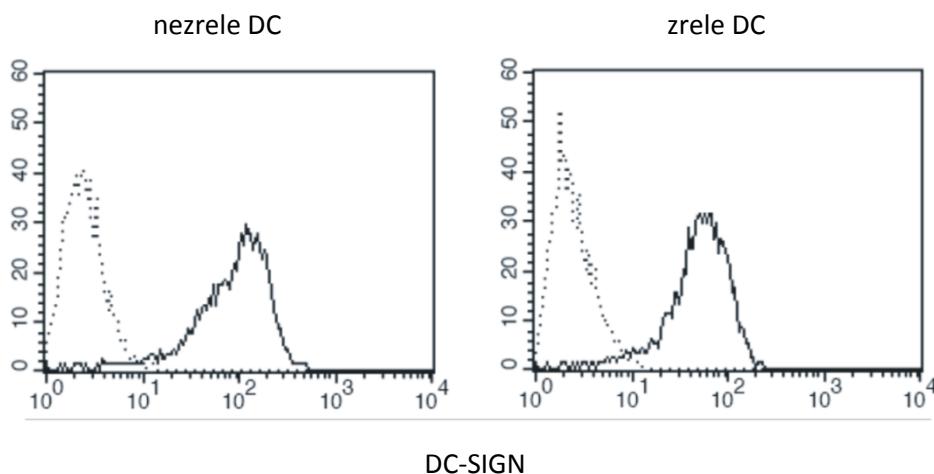
3.5 MERJENJE IZRAŽANJA RECEPTORJA DC-SIGN IN MERJENJE AKTIVACIJE DCS PRETOČNO CITOMETRIJO

Vzorce celic, ki smo jih gojili v prisotnosti spojin in kontrol, smo centrifugirali (in odlili supernatante), ter vsakem vzorcu celic dodali monoklonska protitelesa proti antigenu CD86 in proti antigenu CD40, konjugirana s FITC (Fluorescein Isothiocyanate). Celice smo inkubirali 15 minut v temi. Potem smo jih dvakrat sprali z PBS in resuspendirali v dvoodstotnem paraformaldehidu. Uporabili smo FACS Calibur System (Becton Dickinson, Inc) in rezultate meritev s pretočno citometrijo izrazili kot MFI (angl. *Mean Fluorescence Intensity value*).

4 REZULTATI

4.1 IZRAŽANJE RECEPTORJA DC-SIGN

S preočno citometrijo smo izmerili izražanje receptorja DC-SIGN na površini nezrelih in zrelih DC.



Slika 7: Nivo izražanja receptorja DC-SIGN na DC.

Prikazano (na sliki 7) je izražanje receptorja DC-SIGN na DC. Prekinjena črta označuje izotipsko kontrolo, neprekinitvena črta prikazuje izražanje DC-SIGN (enota: MFI (x-os), logaritemska skala). Prikazana sta rezultata reprezentativnega eksperimenta od skupaj treh neodvisno opravljenih eksperimentov.

Meritev izražanja receptorja DC-SIGN je pokazala, da je receptor izražen na površini nezrelih DC, s povprečno vrednostjo 129 MFI. Receptor je izražen tudi na zrelih DC, s povprečno vrednostjo 67 MFI. Receptor se izraža na površini zrelih DC v manjšem številu kot na površini nezrelih DC, kar smo tudi pričakovali. Pomembno pa je to, da nam je ta meritev potrdila, da DC, s katerimi smo delali, izražajo receptor DC-SIGN na svoji površini.

4.2 SINTEZNI LIGANDI IN NJIHOVA SPOSOBNOST AKTIVACIJE DC Z VEZAVO NA DC-SIGN

V raziskavi smo uporabili naslednje sintezne ligande, ki se vežejo na receptor DC-SIGN:

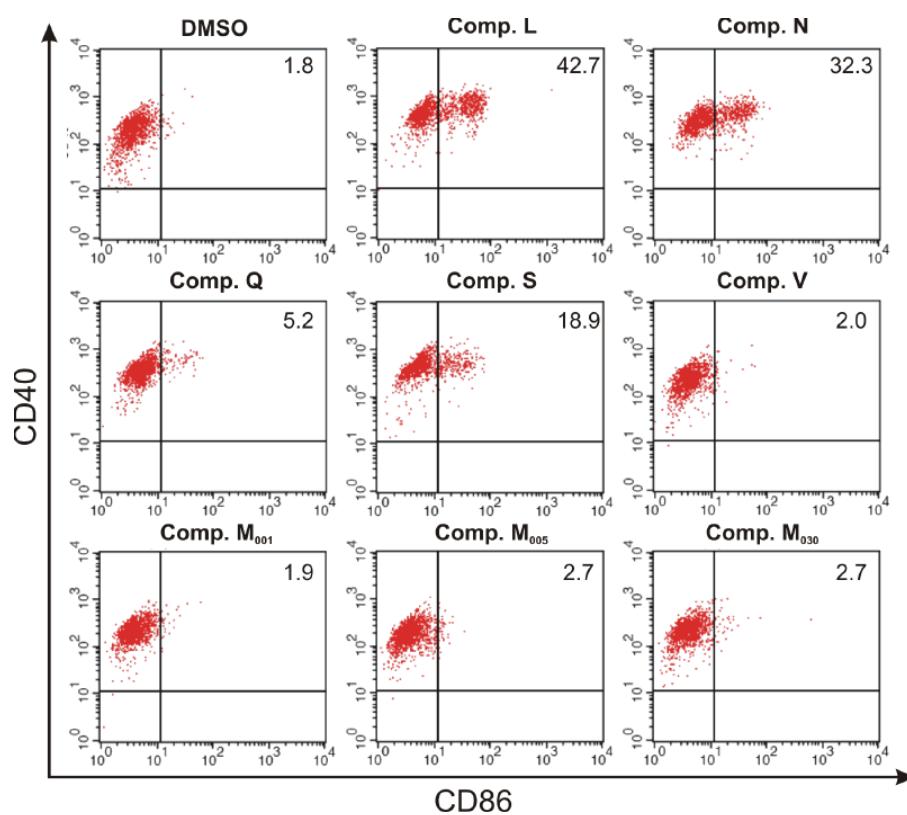
Preglednica 1: Monovalentni ligandi DC-SIGN (osnovani na manozi) (Obermajer in sod., 2010).

IME	STRUKTURA	Črkovne šifre	M. W. (g/mol)	Batch
MB-001		V	463,44	SARA 145
MB-018		L	674,65	Cinzia 65
MB-024		Q	616,66	MB 59
MB-027	<chem>O=C[C@H]1[C@@H](O[C@H]2[C@@H](O[C@H]([C@H](O)[C@H](O[C@H](COP(=O)([O-])[O-])[C@H](O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@H](O)[C@H]1O)]C(=O)N3CS(=O)(=O)N3)C=O</chem>	S	570,64	SARA 188
MB-028	<chem>O=C[C@H]1[C@@H](O[C@H]2[C@@H](O[C@H]([C@H](O)[C@H](O[C@H](COP(=O)([O-])[O-])[C@H](O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@H](O)[C@H]1O)]C(=O)N3Cc4ccccc4N3)C=O</chem>	N	556,60	MB 51

Prikazane so strukture vseh sinteznih ligandov, razen M001, M005 in M030. Struktur teh spojin zaradi novosti in varovanja podatkov, za zdaj še ne moremo objaviti.

4.2.1 Pretočna citometrija in merjenje aktivacije DC

S pretočno citometrijo smo, po 48 urah gojenja DC s sinteznimi ligandi, izmerili nivo aktivacije DC. Ta podatek je pomemben zato, da na koncu lažje komentiramo spremembo citokinskega profila DC.



Slika 8: Gojenje DC s sinteznimi ligandi v času 48 ur.

Izbrali smo označevalca CD40 (Cluster of Differentiation 40) in CD86, ker sta značilna označevalca za aktivacijo celic. Nezrele DC izražajo CD40 in CD86, pri aktiviranih (zrelih) DC pa je izražanje povečano.

DMSO smo uporabili kot kontrolo, da bi tako lahko potrdili, da so se DC aktivirale zaradi dodanih spojin (L, N, Q, S, V, M001, M005, M030), ne pa zaradi prisotnosti samega DMSO ali morebitne okužbe DMSO, v katerem so bile spojine raztopljene. Torej, vrednost, ki smo jo dobili in velja za celice, ki smo jim dodali samo DMSO, je 1,8 %. Ta vrednost pomeni odstotek (%) celic, ki so bile označene pozitivno za določen marker (CD 86). Do tega nivoja na DC vpliva samo DMSO. Močno zvišane vrednosti pomenijo, da so se DC aktivirale. Če je vrednost primerljiva z DMSO, potem spojina sama po sebi ne aktivira DC.

Rezultati (slika 8) so pokazali, da so spojine V (vrednost 2,0 %), M001 (vrednost 1,9 %), M005 (vrednost 2,7 %), M030 (vrednost 2,7 %), Q (vrednost 5,2 %) še vedno primerljive z DMSO in same po sebi ne aktivirajo DC. Izmerjene vrednosti spojin L (42,7 %), N (32,3 %) in S (18,9 %) so precej zvišane, kar pomeni, da so te spojine aktivirale DC.

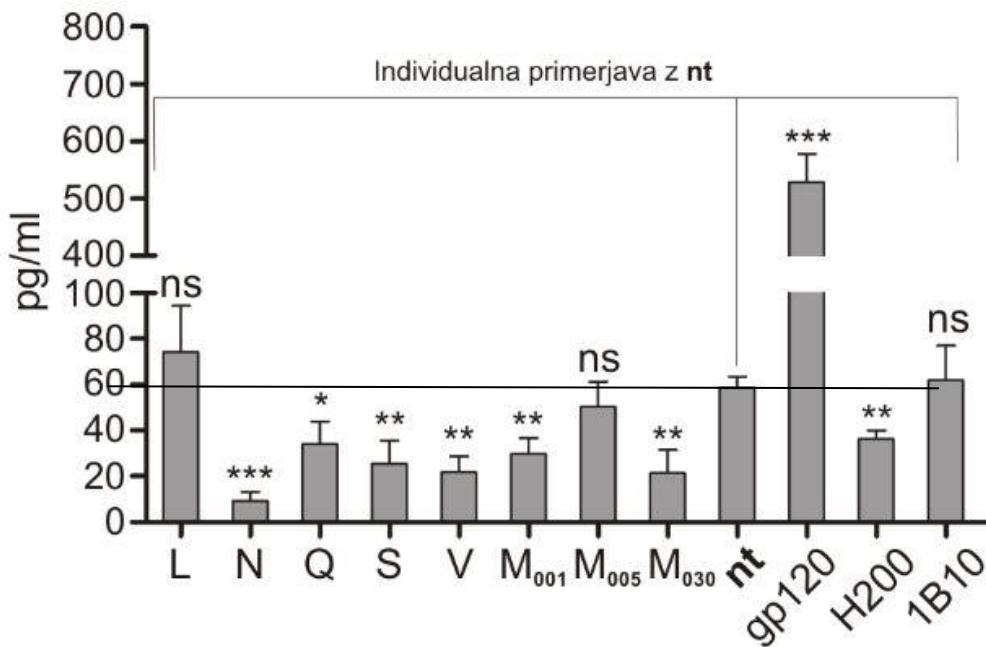
4.3 DOLOČANJE CITOKINSKEGA PROFILA DC

Test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay):

- BioLegend Human IL-10 ELISA MAX™ Deluxe Set
- BioLegend Human IL-12 (p70) ELISA MAX™ Deluxe Set

Test ELISA smo uporabili za določanje profila izražanja citokinov IL-10 in IL-12. Ta dva citokina nam lahko podata informacije o odzivu celic po vezavi sinteznih inhibitorjev na receptor DC-SIGN. Glede na spremembe v izražanju citokinov lahko sklepamo o agonističnem oz. antagonističnem delovanju sinteznih inhibitorjev receptorja DC-SIGN.

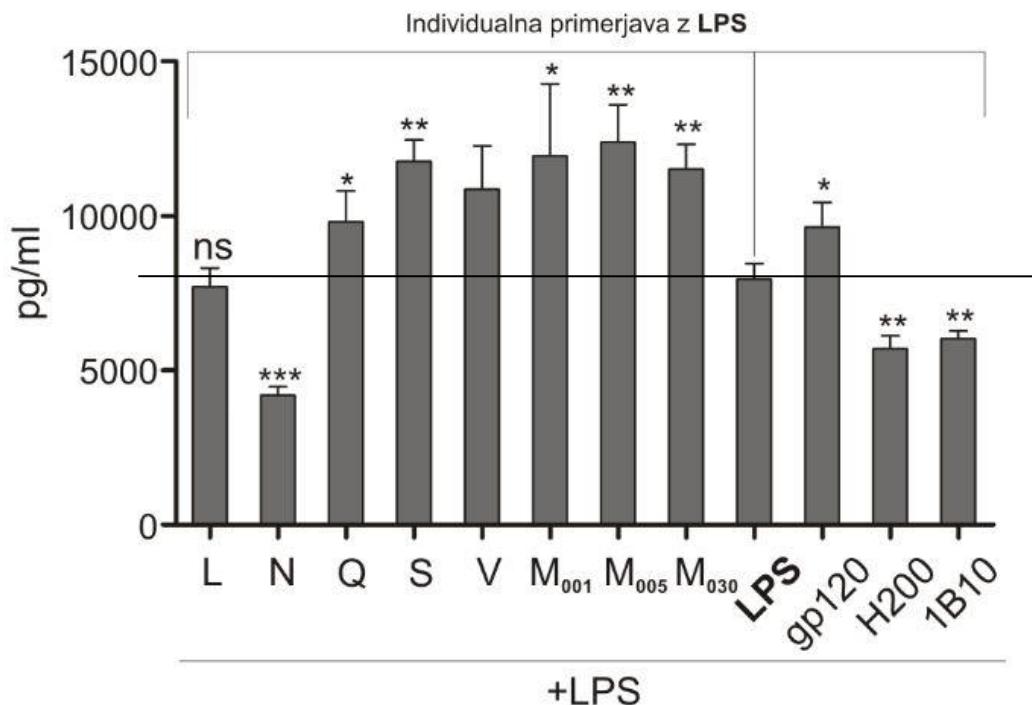
4.3.1 Interlevkin 10 (IL-10)



Slika 9: Izmerjene koncentracije IL-10.

Slika 9 prikazuje izmerjene koncentracije IL-10, ki gaizločajo celice, tretirane s posameznimi sinteznimi ligandi DC-SIGN: L, N, Q, S, V, M001, M005 in M030, ter s posameznimi kontrolnimi vzorci: gp 120, H200 in 1B10.

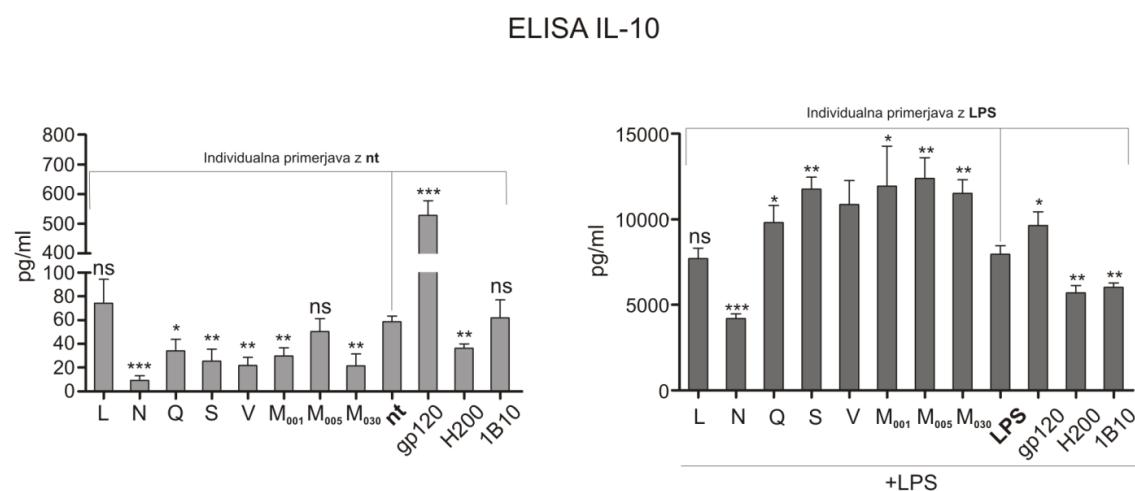
Statistično analizo za ELISO smo naredili z uporabo Studentovega t-testa (slika 9). Torej, vsak posamezni vzorec (L, N, Q, S, V, M001, M005, M030, gp 120, H200, 1B10) smo, v tem primeru, primerjali z netretiranim vzorcem. Za vsak vzorec (nad stolpcem) smo podali rezultate, ki nam povejo, ali se vzorec statistično pomembno razlikuje od netretiranega vzorca (nt-kontrole). ns –ni statistično pomembna razlika, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ in *** – $p < 0,001$ (statistično pomembne razlike).



Slika 10: Izmerjene koncentracije IL-10, ob prisotnosti LPS.

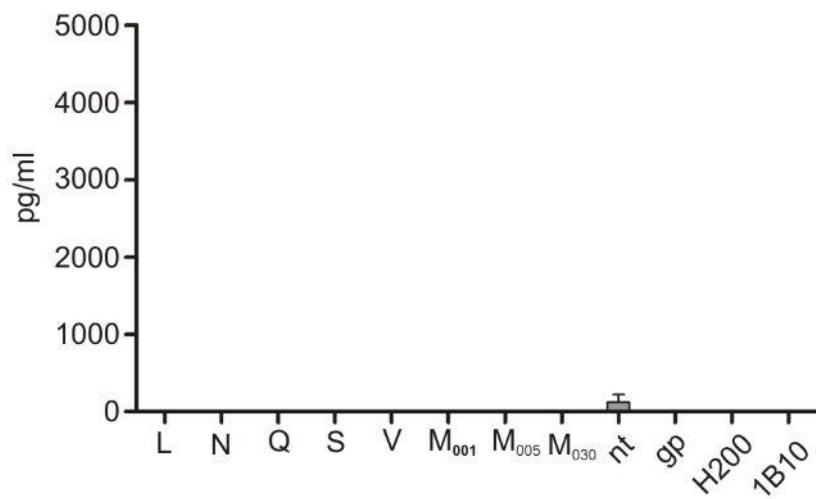
Slika 10 prikazuje izmerjene koncentracije IL-10, ki ga izločajo celice, tretirane s posameznimi sinteznimi ligandi DC-SIGN: L, N, Q, S, V, M001, M005 in M030, ter s posameznimi kontrolnimi vzorci: gp 120, H200 in 1B10. V tem primeru smo vsakemu vzorcu dodali še LPS.

Vsak posamezni vzorec (L, N, Q, S, V, M001, M005, M030, gp 120, H200, 1B10) smo primerjali z vzorcem LPS (kontrola). Za vsak vzorec (nad stolpcem) smo spet podali rezultate, ki nam povejo, ali se vzorec statistično pomembno razlikuje od vzorca, tretiranega le z LPS (kontrole). ns –ni statistično pomembna razlika, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ in *** – $p < 0,001$ (statistično pomembne razlike).



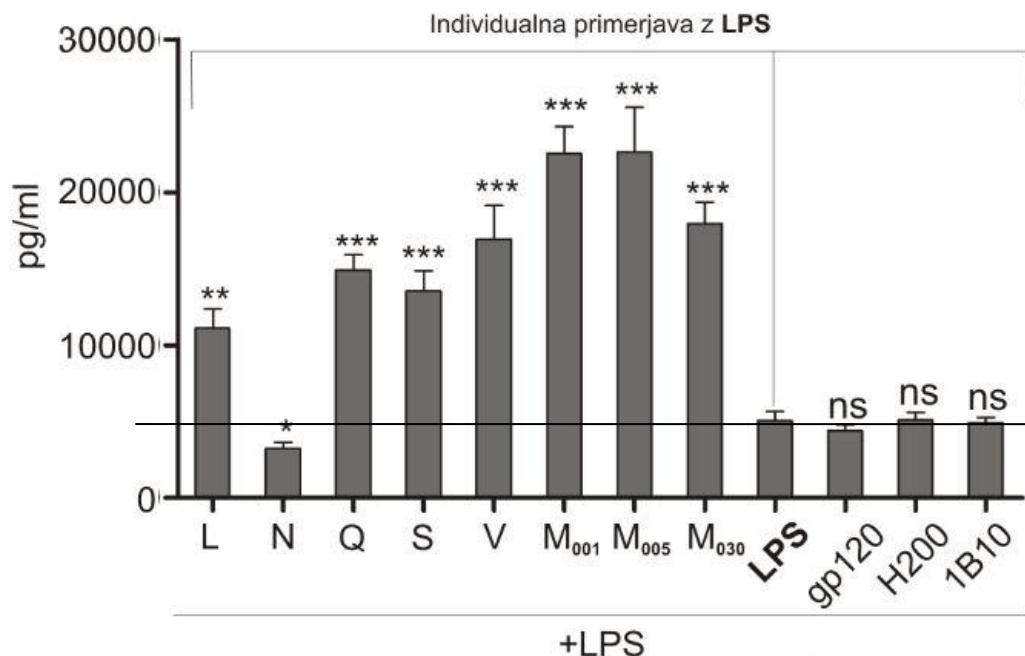
Slika 11: Primerjava sprememb citokinskega profila oz. profila izražanja IL-10 pod vplivom določenih sinteznih ligandov DC-SIGN in prisotnosti LPS (združeni sliki 9 in 10).

4.3.2 Interlevkin 12 (IL-12)



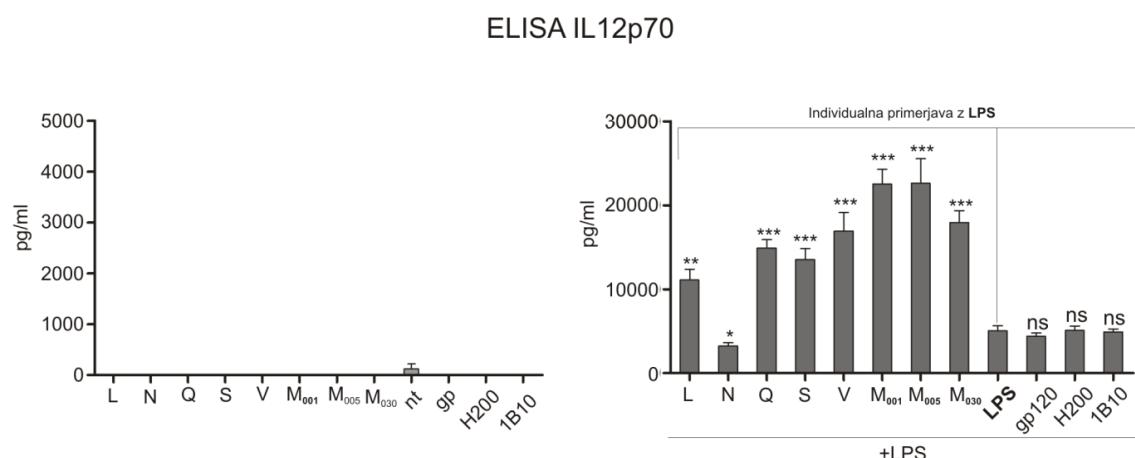
Slika 12: Izmerjene koncentracije IL-12.

Slika 12 prikazuje izmerjene koncentracije IL-12, ki ga izločajo celice, tretirane s posameznimi sinteznimi ligandi DC-SIGN: L, N, Q, S, V, M001, M005 in M030, ter s posameznimi kontrolnimi vzorci: gp 120, H200 in 1B10.



Slika 13:Izmerjene koncentracije IL-12, ob prisotnosti LPS.

IL-12 izločajo celice, tretirane s posameznimi sinteznimi ligandi DC-SIGN: L, N, Q, S, V, M₀₀₁, M₀₀₅ in M₀₃₀, ter s posameznimi kontrolnimi vzorci: gp 120, H200 in 1B10. V tem primeru (slika 13) smo vsakemu vzorcu dodali še LPS. Vsak posamezni vzorec (L, N, Q, S, V, M₀₀₁, M₀₀₅, M₀₃₀, gp 120, H200, 1B10) smo primerjali z vzorcem LPS (kontrola). Za vsak vzorec (nad stolpcem) smo spet podali rezultate, ki nam povejo, ali se vzorec statistično pomembno razlikuje od netretiranega vzorca (kontrole). ns –ni statistično pomembna razlika, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ in *** – $p < 0,001$ (statistično pomembne razlike).



Slika 14: Primerjava sprememb citokinskega profila oz. profila izražanja IL-1p70 pod vplivom določenih sinteznih ligandov DC-SIGN in prisotnosti LPS (združeni slike 12 in 13).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

DC-SIGN je receptor na površini DC. Ta receptor prepoznava manozne in fukozne ogljikohidratne ostanke, usmerja migracijo, adhezijo in vnetni odziv DC, prenos patogena celicam T, sprožanje imunskega odgovora in sodeluje pri izogibanju patogenov od delovanja imunskega sistema (Švajger in sod., 2010).

DC-SIGN na DC se z visoko afiniteto veže na manoziliran protein gp 120, ki je del ovojnice virusa HIV. Ko HIV prek vezave na receptor DC-SIGN vstopi v DC, se virus lahko izogne litični degradaciji, ohrani svojo infektivnost in ga DC predstavijo direktno celicam T. Tak sistem v obliki "trojanskega konja" omogoča učinkovito širjenje infekcije HIV-1. Njegovo izražanje na DC, sposobnost lajšanja vezave in prenosa infekcije celicam T so razlogi za razvoj hipoteze, da se lahko DC-SIGN uporablja kot mehanizem za prenos virusa HIV iz mesta vstopa v organizem v sekundarne limfne organe (Švajger in sod., 2010).

Sistem vezave receptorja DC-SIGN in njegovih ligandov lahko izkoristimo za dizajn in sintezo molekul, ki lahko preprečijo vezavo patogenov na DC-SIGN, kar ima velik terapevtski potencial, saj lahko že na začetku prepreči prenos patogenov ter širjenje okužbe in infekcijo limfocitov. Pomemben korak je oblikovati strategije inhibicije specifičnih interakcij med receptorjem DC-SIGN in patogeni, brez vpliva na normalne imunološke funkcije receptorja DC-SIGN na DC. Z drugimi besedami ustvariti sintezne inhibitorje DC-SIGN in se hkrati zavedati njihovega morebitnega vpliva na imunski sistem zaradi potencialnega agonizma/antagonizma.

Poglavitni namen naše študije je bil vzpostaviti testni sistem, s katerim lahko določimo vpliv sinteznih ligandov ali inhibitorjev na delovanje DC-SIGN oz. določimo morebiten agonizem ali antagonizem sinteznih inhibitorjev DC-SIGN v kontekstu DC. Cilj je bil dobiti natančnejše informacije o načrtovanju ligandov in njihovi potencialni terapevtski

uporabi. Torej, najprej smo preverili izražanje receptorja DC-SIGN na DC, ki smo jih uporabili v študiji.

5.1.1 Izražanje receptorja DC-SIGN

Z uporabo pretočne citometrije smo preverili izražanje receptorja DC-SIGN na nezrelih in zrelih DC (slika 7). Ta podatek je pomemben, da lahko potrdimo, da se je na celicah, ki smo jih uporabili v študiji, receptor DC-SIGN normalno izražal, ter naslednji rezultati niso pod vplivom nepravilnega izražanja receptorja DC-SIGN.

Večji svetlobni signal pomeni več receptorja na površini celic. Rezultati so pokazali, da se na nezrelih DC izraža približno dvakrat večje število receptorjev DC-SIGN kot na zrelih DC. To smo tudi pričakovali, ker nezrele DC lovijo okoljske antigene z visoko sposobnostjo endocitoze in fagocitoze ter je njihova glavna naloga privzemanje okoljskih antigenov, za kar potrebujejo večje število receptorjev, ki prepoznavajo vzorce, skupne različnim patogenom, kot je receptor DC-SIGN (med drugimi receptorji).

Zrele DC po aktivaciji med zorenjem potujejo v sekundarna limfatična tkiva. Ko dozorijo, DC razvijejo t. i. dendritične izrastke. Izražajo tudi večje število kostimulatornih molekul za interakcijo in stimulacijo limfocitov. Obenem se pa zmanjša število DC-SIGN na njihovi površini, ker njihova poglavita vloga zdaj postane prenos in predstavljanje antigenov celicam T.

5.1.2 Pretočna citometrija in merjenje aktivacije DC

V naslednjem koraku smo uporabili pretočno citometrijo za določanje nivoja aktivacije DC. V prejšnjih raziskavah je bil razvit sistem, ki se lahko uporabi za rešetanje potencialnih ligandov oz. inhibitorjev receptorja DC-SIGN. V sklopu omenjenega testnega sistema smo izbrali kandidate za študijo, in sicer spojine: L, N, Q, S, V, M001, M005, M030. Spojine so monovalentni ligandi DC-SIGN, osnovani na manozi.

Po 48 urah gojenja DC s sinteznimi ligandi (L, N, Q, S, V, M001, M005, M030) smo s pretočno citometrijo izmerili raven aktivacije DC (slika 8). Ta podatek je pomemben, da pozneje lažje pridemo do sklepov glede sprememb citokinskega profila DC.

Izbrali smo značilna označevalca za aktivacijo celic: CD40 (Cluster of Differentiation 40) in CD86 (Cluster of Differentiation 86). Spojine, ki smo jih uporabili, so bile raztopljene v DMSO. Zato smo DMSO uporabili kot kontrolo. Na ta način lahko potrdimo, da so se DC aktivirale zaradi spojin (L, N, Q, S, V, M001, M005, M030) in ne zaradi vpliva samo DMSO ali morebitne okužbe DMSO, v katerem so bile spojine raztopljene.

V kontrolnih kulturah, kjer je bil le DMSO, je delež celic, označenih pozitivno za aktivacijski označevalci CD86, znašal 1,8 %. Do tega nivoja na DC vpliva oz. ne vpliva samo DMSO. Močno zvišane vrednosti pomenijo, da so se DC aktivirale. Če je vrednost primerljiva z DMSO, potem spojina sama po sebi ne aktivira DC.

Torej, za spojine V (vrednost 2,0 %), M001 (vrednost 1,9 %), M005 (vrednost 2,7 %), M030 (vrednost 2,7 %), Q (vrednost 5,2 %) smo sklepali, da so primerljive z DMSO in same po sebi ne aktivirajo DC. Izmerjene vrednosti spojin L (42,7 %), N (32,3 %) in S (18,9 %) so se zelo zvišale, kar pomeni, da so te spojine aktivirale DC.

Spojine oz. ligandi/inhibitorji DC-SIGN, ki smo jih uporabili v študiji, so bile razvite z namenom, da se čim bolj specifično vežejo samo na DC-SIGN in onemogočijo njegovo vezavo na ligande, ki jih izražajo patogeni. Zaželeno je, da spojine same po sebi ne aktivirajo DC, ampak samo preprečijo vezavo patogenov na receptor DC-SIGN, vendar takih stvari pri začetnem načrtovanju še ni mogoče predvidevati. Naša študija je prva, ki je naslovila to temo, po njej pa bomo lahko začeli diskusijo o strukturi spojin, ki so morebitni agonisti oz. antagonisti.

Aktivacijski test smo opravili zaradi morebitne aktivacije DC prek vezave spojin na druge receptorje, ki bi lahko aktivirali DC ali če bi bile mogoče spojine same okužene. Vezava in aktivacija DC-SIGN sama po sebi ne more aktivirati DC, DC-SIGN samo modulira

aktivacijo, ki pa jo povzročijo nekateri drugi receptorji, kot so nekateri TLR (Švajger in sod., 2010).

Iz rezultatov je razvidno, da večina spojin (V, M001, M005, M030, Q) ne zviša vrednosti aktivacije (do statistično pomembnega nivoja). Torej, vezava samo specifičnih ligandov/inhibitorjev na DC-SIGN ni dovolj za popolno aktivacijo DC, potrebne so še interakcije med receptorji TLR za sprožanje aktivacije DC. Da se po interakciji DC s patogenom pojavi vnetni odziv, morajo tudi TLR prepoznati vzorce na patogenu. Ob prepoznavi patogenov vplivata signalizaciji prek TLR in DC-SIGN druga na drugo(Van Vliet in sod., 2008; Švajger in sod., 2010).

Zato lahko sklepamo, da so se spojine oz. ligandi/inhibitorji DC-SIGN, ki smo jih uporabili in ki niso statistično pomembno zvišale nivo aktivacije DC (V, M001, M005, M030, Q), vezale na DC-SIGN, obenem pa niso aktivirale DC. Spojine same tudi niso okužene, ker bi kakršna koli okužba zvišala aktivacijo DC. Tako da te spojine ustrezajo zahtevanim lastnostim.

Kar se tiče same vezave teh spojin (ki so monovalentni ligandi DC-SIGN, osnovani na manozi) na DC-SIGN, je bil v prejšnjih študijah razvit sistem, ki podaja rezultate o sposobnosti sinteznih ligandov, ki se vežejo na DC-SIGN, da zmanjšajo adhezijo DC na z mananom prevlečene tkivne plošče. Rezultati so bili primerljivi z uporabo specifičnih protiteles H200 in 1B10. Ta protitelesa so usmerjena proti DC-SIGN (Obermajer in sod., 2010). Ko so se 1B10 protitelesa vezala na DC-SIGN, so povzročila 80-odstotno inhibicijo, protitelesa H200 pa so povzročila 65-odstotno inhibicijo (Obermajer in sod., 2010). To nam pove, da ima pri vezavi na manozne ostanke oz. v tem primeru na naše ligande glavno vlogo DC-SIGN.

Rezultati so nam pokazali, da se določeni sintezni ligandi lahko vežejo na DC-SIGN in obenem statistično pomembno ne aktivirajo DC. V naslednji fazi nas je zanimalo, kako sama vezava teh sinteznih ligandov vpliva na citokinski profil DC, oz. konkretnje, ali spremeni profil izražanja citokinov IL-10 (protivnetni citokin, odgovoren za imunosupresijo) in IL12p70 (odgovoren za aktivacijo celic Th1), kar nam lahko da

informacije o morebitnem agonizmu/antagonizmu sinteznih ligandov ob sočasni vezavi TLR4 (TLR4 je pomemben zato, ker morajo, kot je bilo že omenjeno, tudi TLR prepoznati vzorce na patogenu) (VanVliet in sod., 2008).

5.1.3 Določanje citokinskega profila DC

Test ELISA smo uporabili za določanje IL-10 in IL-12p70. Interlevkin 10 (IL-10) je znan kot protivnetni citokin. IL-12 je faktor, ki stimulira celice T. Vključen je v diferenciacijo celic T v celice pomagalke Th1.

Ko smo gojili celice, smo vzorce razporedili na naslednji način:

- V vsako luknjico na plošči s 96 luknjicami smo dodali medij in GM-CSF
- Potem smo v določene luknjice dodali še posamezne kontrole: iDC (netretirano), gp 120, specifično protitelo za DC-SIGN H200 in specifično protitelo za DC-SIGN 1B10, v preostale luknje pa spojine L, N, Q, S, V, M001, M005, M030.
- Na koncu smo še dodali DC.

Opisana razporeditev vzorcev je brez dodanega lipopolisaharida (LPS). Naredili smo še eno ponovitev, pri kateri je bilo vse enako, samo k vsakemu vzorcu smo dodali še LPS.

Najprej se bomo osredotočili na IL-10. Torej, rezultati prikazujejo izražanje IL-10 brez dodanega LPS (slika 9). Gre za izmerjene koncentracije IL-10, ki ga izločajo DC, tretirane s posameznimi sinteznimi ligandi DC-SIGN: L, N, Q, S, V, M001, M005 in M030, ter s posameznimi kontrolnimi vzorci: gp 120, H200 in 1B10. Vsak posamezni vzorec (L, N, Q, S, V, M001, M005, M030, gp 120, H200, 1B10) smo – v tem primeru – primerjali z netretiranim vzorcem. Statistično pomembne razlike v proizvajanju IL-10 smo dobili, če smo celice gojili v prisotnosti spojin N, Q, S, V, M001, M030 ter kontrol gp 120 in H200. Vse spojine, razen gp 120, so znižale izražanje IL-10.

Gp 120 je zvišal IL-10, kar smo tudi pričakovali. V celičnih kulturah gp 120 stimulira DC, da začnejo proizvajati IL-10. Ta citokin deluje protivnetno in imunosupresivno oz. zavira

odziv imunskega sistema (Shan in sod., 2007). Tak odgovor celic je bistven za učinkovito širjenje virusne infekcije.

Protitelo H200 in spojine N, Q, S, V, M001, M030 so znižali izražanje IL-10. Že dodatek samih spojin nakazuje morebitno signalizacijo prek DC-SIGN, saj prihaja do manjših, a vsekakor signifikantnih razlik v izločanju IL-10. V nasprotju z gp 120, ki poveča izločanje IL-10, spojine v manjšem obsegu znižajo proizvodnjo IL-10, kar nakazuje razliko v aktivaciji DC-SIGN v primerjavi z gp 120.

Za osnovno teoretično izhodišče zastavljenega eksperimentalnega sistema so ključni rezultati, ki jih bo podala hkratna aktivacija celic z LPS in spojinami, saj bo modulacija aktivacije DC tako najvidnejša. V naslednjem primeru smo celicam dodali še LPS. LPS sproži odziv receptorja TLR-4.

Rezultati (slika 10) so pokazali statistično pomembno zvišanje IL-10 v prisotnosti vseh spojin, razen protiteles H200 in 1B10 (kar je tudi pričakovano za delovanje protiteles), in spojine N. Zvišanje izločanja IL-10 lahko razložimo kot posledico prepletanja signalizacij TLR in DC-SIGN, kar vpliva na modulacijo aktivnosti Nf-κB (Švajger in sod., 2010).

To bi lahko razložili na naslednji način: LPS, ki smo ga dodali, je agonist TLR (konkretno: agonist TLR4). Treba je omeniti tudi to, da vpliv receptorja DC-SIGN na aktivnost TLR ni omejena samo na TLR4, temveč tudi na TLR3, TLR5 itn., ter je v vsakem primeru povečano izločanje IL-10 (Švajger in sod., 2010). Torej, LPS se veže na receptorje TLR na DC in posledično DC izločajo citokine IL-10 in IL-12p70. Ta proces odziva DC na LPS in posledično izločanje citokinov sta odvisna od aktivacije in translokacije NF-κB. Vezava LPS na TLR aktivira signalizacijsko pot NF-κB. Nastane modifikacija (fosforilacija, acetilacija) NF-κB. Kinaze ločijo NF-κB od inhibitorja, ki je nanj vezan v citoplazmi. Fosforilirajo inhibitorno molekulo (ki se loči od NF-κB in razpade) in omogočijo, da NF-κB pride v jedro. Po drugi strani deluje tudi signalizacija prek DC-SIGN (ki jo sprožijo ligandi za DC-SIGN, v tem primeru spojine Q, S, V, M001, M005, M030), ki aktivira Raf-1 in stimulira acetilacijo NF-κB. To modificira NF-κB na

tak način, da se poveča aktivnost NF-κB, ki se translocira v jedro in se več časa zadržuje na promotorju za IL-10, kar pomeni povečano proizvajanje IL-10 (Švajger in sod., 2010).

H200, 1B10 in spojina N so tudi v tem primeru znižali IL-10, kar pomeni, da se verjetno po vezavi teh spojin na receptor DC-SIGN sprožajo drugačne poti signalizacije in se ne poveča izražanje protivnetnega citokina IL-10. Kar je tudi zaželeno, saj tudi, če dodamo LPS, odziv ni usmerjen proti zaviranju delovanja imunskih celic. Verjetno na to vplivata tudi način in mesto vezave, to pa je že predmet naslednjih študij.

Zdaj se bomo osredotočili na IL-12p70. Brez prisotnosti LPS so rezultati pokazali, da nobena izmed spojin ni povzročila izločanja IL-12p70 (slika 12). V zelo majhni količini ga proizvajajo samo netretirane celice, kar je pričakovano in v smislu diskusije zanemarljivo. Tak rezultat smo tudi pričakovali. Za nastajanje IL-12 je potrebna prisotnost aktivacijskih signalov, kakršen je LPS (Geijtenbeek in sod., 2003). IL-12 je odgovoren za usmerjanje diferenciacije celic Th1. DC namreč ne morejo učinkovito sprožiti odgovora celic T, če je zmanjšano izražanje aktivacijskih signalov, kot je IL-12.

V prisotnosti LPS (slika 13) so spojine modificirale izločanje IL-12. Vse spojine, razen spojine N, so statistično pomembno zvišale IL-12. Spojina N ga je znižala. Kontrole (gp 120, H200, 1B10) niso statistično pomembne.

Zvišanje IL-12 tudi lahko razložimo kot posledico medsebojnega vpliva signalizacije prek DC-SIGN in signalizacije TLR. Torej, receptorji TLR na DC vežejo ligande, ki jih izražajo patogeni (v našem primeru je to LPS), in aktivirajo DC. Da lahko aktivirajo DC, se po vezavi patogenih ligandov sprožajo signalne poti. Signalizacijo, ki jo sprožijo receptorji TLR, modulira DC-SIGN (Švajger in sod., 2010).

Modulacija signalizacijskih poti oz. medsebojni vpliv signalizacij DC-SIGN in TLR vpliva na imunski odgovor celic oz. citokinski profil. Patogeni, ki izražajo manozne ostanke (kot so *M. tuberculosis* in tudi HIV ter v našem primeru testne spojine, ki so osnovane na manozni osnovi), prek DC-SIGN aktivirajo Raf-1 kinazo (Švajger in sod., 2010).

Raf-1 je odgovorna za fosforilacijo NF-κB v jedru, ki ji sledi acetilacija NF-κB, kar poveča sposobnost vezave NF-κB na DNA in transkripcijsko aktivnost NF-κB. Zaradi tega se poveča proizvajanje IL-12p70 in prej opisanega IL-10. Potrebna je dvojna stimulacija, prek TLR in DC-SIGN, saj vezava liganda na sam DC-SIGN ni dovolj (Švajger in sod., 2010).

Za ligande, ki jih izražajo patogeni, ki se vežejo na DC-SIGN, je značilno, da sprožajo kronične infekcije, kar potrjuje dejstvo, da se želijo izogniti uničenju in izkoriščajo antigen predstavitevne celice za prenos do limfocitov, kar omogoča učinkovito širjenje infekcije; ter da je za njihovo preživetje bistvena manipulacija razmerja med celicami Th1 in Th2. To je seveda odvisno od tega, za kateri patogen gre. Vezava različnih patogenov na DC-SIGN in posledično modulacija signalizacijskih poti (v prid določenemu patogenu) povzročata spremembe v odzivih celic Th1 ali Th2 oz. v diferenciaciji regulatornih celic T (Švajger in sod., 2010). Zato je pri razvoju sinteznih inhibitorjev receptorja DC-SIGN pomembno preveriti, kakšen odziv DC te sintezne spojine sprožajo oz. ali spremenijo signalizacijo prek DC-SIGN, kar posledično vpliva na citokinski profil intudi na signalizacijo TLR.

Citokinski profil nam, v tem primeru, lahko da informacije o morebitnih spremembah v celični signalizaciji po vezavi naših sinteznih inhibitorjev na DC-SIGN. Na tem temelji naša vzpostavitev testnega sistema za določanje morebitnega agonizma oz. antagonizma inhibitorjev receptorja DC-SIGN. Rezultati so pokazali statistično pomembne spremembe v profilu izražanja citokinov, na kar močno vpliva prisotnost aktivacijskih signalov, kakršen je LPS. Kar je tudi pričakovano glede na večinoma kompleksno sestavo naravnih patogenov in dejstvo, da morajo za popolno aktivacijo imunskega odziva delovati aktivacijski faktorji. Patogeni izkoriščajo naravne poti signalizacije tako, da jih modulirajo na način, ki koristi njihovemu širjenju infekcije. Receptor DC-SIGN, ki veže patogene, kot so HIV, *M. tuberculosis* itn., in modulira signalizacijske poti, je pomemben faktor, katerega delovanje nam še vedno ni popolnoma znano.

Aktivacija samih signalizacijskih poti ter aktivacija transkripcijskih faktorjev in genske ekspresije še ne pomeni, da bo na koncu določen protein tudi sintetiziran. Na to vplivajo številni faktorji (epigenetski, transkripcijski dejavniki itn.). Prednost našega sistema je tudi

to, da merimo končni produkt oz. da so rezultati na nivoju proteinov, ki se sintetizirajo in izločajo kot posledica aktivacije in sprememb delovanja signalizacijskih poti.

Vzpostavitev testnega sistema za določanje morebitnega agonizma oz. antagonizma inhibitorjev receptorja DC-SIGN nam lahko da informacije o tem, ali spojine, ki jih razvijamo kot potencialne inhibitorje DC-SIGN (v končni fazi tudi kot potencialne terapevtske učinkovine), povzročajo spremembe v signalizacijskih poteh, kar lahko hitro zaznamo prek profila izražanja citokinov. Seveda pa so dodatne študije, kot so študije posameznih signalizacijskih poti, njihovega medsebojnega vpliva, genetskega ozadja (PCR), delovanja transkripcijskih dejavnikov, epigenetskega vpliva itn., potrebne za okrepitev testnega sistema.

5.2 SKLEPI

Rezultati, ki smo jih pridobili s tem eksperimentalnim modelom za določanje morebitnega agonizma/antagonizma sinteznih inhibitorjev DC-SIGN, so pokazali statistično pomembne razlike v spremembi profila izražanja citokinov. To pomeni, da so sintezni ligandi oz. inhibitorji pomembno vplivali na delovanje signalizacijskih poti DC-SIGN in TLR, ki prek aktivacije NF- κ B uravnavajo izražanje citokinov (IL-10 in IL-12p70) ob prisotnosti aktivacijskih signalov (LPS).

Aktivacija signalizacijske poti receptorja DC-SIGN je vplivala na signalizacijo povzročeno s strani aktivacije TLR-4, kar je privelo do sprememb v izražanju ter izločanju IL-10 ter IL-12p70 v supernatante kultur DC ter nakazovalo agonizem DC-SIGN inhibitorjev. Z uporabo takega sistema lahko dobimo informacije o morebitnih spremembah v celični signalizaciji po vezavi sinteznih ligandov oz. inhibitorjev na DC-SIGN, kar je pomembno pri načrtovanju ligandov in njihovi potencialni terapevtski uporabi.

6 POVZETEK

DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin) je receptor na površini dendritičnih celic (DC), ki prepoznavajo manozne in fukozne ogljikohidratne ostanke, usmerja migracijo DC, njihovo adhezijo in vnetni odziv, aktivacijo celic T, sprožanje imunskega odgovora ter sodeluje pri pobegu patogenov ali tumorskih celic od delovanja imunskega sistema (Obermajer in sod., 2010; Zhou in sod., 2006). DC-SIGN se veže na gp 120, ki je glikoprotein ovojnice virusa HIV. HIV, vezan na DC-SIGN, je stabilen, infektivnost ostane visoka, virus, ki vstopi v DC, ostane zaščiten pred delovanjem imunskega sistema in se prek infekcijske sinapse iz DC prenese celicam T (Obermajer in sod., 2010). Informacije o interakciji med DC-SIGN in gp 120 so ključne za razvoj komponent, ki lahko onemogočijo vezavo gp 120 na DC-SIGN, kar pomeni razvoj novih terapij proti okužbam z virusom HIV-1 (Piguet in sod., 2007).

Poglavitni namen naše študije je vzpostavitev testnega sistema za potencialno določanje morebitnega agonizma oz. antagonizma tovrstnih inhibitorjev DC-SIGN. Za razvoj sinteznih ligandov oz. inhibitorjev potrebujemo informacije o njihovem vplivu na signalizacijske poti po vezavi na DC-SIGN, ki posledično lahko spremeni profil izražanja citokinov in na koncu imunski odziv, ki ga sprožijo DC. Tako lahko pridemo do natančnejših odgovorov o načrtovanju bodočih ligandov in njihovem terapevtskem potencialu.

7 VIRI

Abbas A., Lichtman A. 2009. Basic immunology - functions and disorders of the immune system. 3.izd. Philadelphia, Saunders Elsevier: 312 str.

Appelmelk B., Die I., Van Vliet S., Vandenbroucke-Grauls C., Geijtenbeek T., Van Kooyk Y. 2003. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 170, 4: 1635–1639

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y., Pulendran B., Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 18: 767–811

Banchereau J., Steinman R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 6673: 245–252

Baribaud F., Pohlmann S., Leslie G., Mortari F., Doms R. 2002. Quantitative expression and virus transmission analysis of DC-SIGN on monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Virology*, 76, 18: 9135–9142

Bergman M., Engering A., Smits H., Van Vliet S., Bodegraven A., Wirth H., Kapsenberg M., Vandenbroucke-Grauls C., Van Kooyk Y., Appelmelk B. 2004. Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *The Journal of Experimental Medicine*, 200, 8: 979–990

ELISA MAXTM Deluxe Sets - Human IL-10. 2011. BioLegend.

http://www.biologend.com/media_assets/pro_detail/datasheets/430604.pdf (25.7.2011)

Engering A., Geijtenbeek T., Van Vliet S., Wijers M., Liempt E., Demaurex N., Lanzavecchia A., Fransen J., Figdor C., Piguet V., Van Kooyk Y. 2002. The dendritic cell-

specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. The Journal of Immunology, 168, 5: 2118–2126

Feltsa R., Narayana K., Estesb J., Shia D., Trubeyb C., Fua J., Hartnella L., Ruthelc G., Schneiderb D., Nagashimad K., Bess J., Bavari S., Lowekampe B., Blisse D., Lifsonb J., Subramaniam S. 2010. 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 30: 13336–13341

Geijtenbeek T., Kwon D., Torensma R., Van Vliet S., Duijnhoven G., Middel J., Cornelissen I., Nottet H., KewalRamani V., Littman D., Figdor C., Van Kooyk Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. Cell, 100, 5: 587–597

Geijtenbeek T., Torensma R., Van Vliet S., Duijnhoven G., Adema G., Van Kooyk Y., Figdor C. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. Cell, 100, 5: 575–585

Geijtenbeek T., Krooshoop D., Bleijs D., Van Vliet S., Duijnhoven G., Grabovsky V., Alon R., Figdor C., Van Kooyk Y. 2000. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. Nature Immunology, 1, 4: 353–357

Geijtenbeek T., Van Vliet S., Koppel E., Sanchez-Hernandez M., Vandenbroucke-Grauls C., Appelmelk B., Van Kooyk Y. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. The Journal of Experimental Medicine, 197, 1: 7–17

Gringhuis S., Dunnen J., Litjens M., Hof B., Van Kooyk Y., Geijtenbeek T. 2007. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF- κ B. Immunity 26, 5: 605–616

Juncadella I., Garg R., Ananthnarayanan S., Yengo C., Anguita J. 2007. T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49, 3: 433–438

Kwon D., Gregorio G., Bitton N., Hendrickson W., Littman D. 2002. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, 16, 1: 135–144

Laffont S., Powrie F. 2009. Dendritic-cell genealogy. *Nature Immunology*, 462: 732–733

MACS® technology - gold standard in cell separation. 2011. Miltenyi Biotec.

[\(25.7.2011\)](http://www.miltenyibiotec.com/download/flyer_en/680/MACS_Technology_Flyer.pdf)

Masso M. 2003. DC-SIGN points the way to a novel mechanism for HIV-1 transmission. *Medscape General Medicine*, 5, 2: 2

Obermajer N., Sattin S., Colombo C., Bruno M., Švajger U., Anderluh M., Bernardi A. 2010. Design, synthesis and activity evaluation of mannose-based DC-SIGN antagonists. *Molecular Diversity*, 15, 2: 347–360

Piguet V., Steinman R. 2007. The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends in Immunology*, 28, 11: 503–510

Reloso M., Puig-Kroger A., Muniz Pello O., Rodríguez-Fernandez J., Rosa G., Longo N., Navarro J., Munoz-Fernandez M., Sanchez-Mateos P., Corbý A. 2002. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 Dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-, and anti-inflammatory agents. *The Journal of Immunology*, 168, 6: 2634–2643

Rowland-Jones S. 1999. HIV: The deadly passenger in dendritic cells. *Current Biology*, 9, 7: 248–250

Sewell A., Price D. Dendritic cells and transmission of HIV-1. 2001. Trends in Immunology, 22, 4: 173–175

Shan M., Klasse P., Banerjee K., Dey A., Iyer S., Dionisio R., Charles D., Campbell-Gardener L., Olson W., Sanders R., Moore J. 2007. HIV-1 gp120 mannoses induce immunosuppressive responses from dendritic cells. PLoS Pathogens, 3, 11: 1637–1650

Steinman R. 2000. DC-SIGN: A guide to some mysteries of dendritic cells. Cell, 100, 5: 491–494

Su S., Gurney K., Lee B. 2003. Sugar and Spice: Viral envelope-DC-SIGN interactions in HIV pathogenesis. Current HIV Research, 1, 1: 87–99

Su S., Hong P., Baik S., Negrete O., Gurney K., Lee B. 2004. DC-SIGN binds to HIV-1 glycoprotein 120 in a distinct but overlapping fashion compared with ICAM-2 and ICAM-3. The Journal of Biological Chemistry, 279 18: 19122–19132

Švajger U., Anderluh M., Jeras M., Obermajer N. 2010. C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. Cellular Signalling, 22, 10: 1397–1405

Tan Y., Leong C., Cheong S. 2010. Observation of dendritic cell morphology under light, phase-contrast or confocal laser scanning microscopy. The Malaysian Journal of Pathology, 32, 2: 97–102

Trumpfheller C., Park C., Finke J., Steinman R., Granelli-Piperno A. 2003. Cell type-dependent retention and transmission of HIV-1 by DC-SIGN. International Immunology, 15, 2: 289–298

Van Vliet S., Dunnen J., Gringhuis S., Geijtenbeek T., Van Kooyk Y. 2007. Innate signaling and regulation of dendritic cell immunity, 19, 4: 435–440

Van Vliet S., García-Vallejo J., Van Kooyk Y. 2008. Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. *Immunology and Cell Biology*, 86, 7: 580–587

Van Kooyk Y., Geijtenbeek T. 2003. DC-SIGN: escape mechanismor pathogens. *Nature Reviews Immunology*, 3, 9: 697–709

Zhou T., Chen Y., Hao L., Zhang Y. 2006. DC-SIGN and immunoregulation. *Cellular & Molecular Immunology*, 3, 4: 279–283

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem komentorju dr. Urbanu Švajgerju za vse strokovne nasvete, kakovostno in aktivno sodelovanje in pomoč, zabavno delovno atmosfero ter izredno vodenje učinkovitega dela v laboratoriju. Dr. Urban Švajger predstavlja vzor mladim kot sem jaz, ki delajo na znanstvenem strokovnem področju.

Hvala mentorju doc.dr. Miomirju Kneževiću za vso inspiracijo in zagon za trenutno in nadaljnje delo. Ta entuziazem je v veliki meri vplival na izbor področja znanosti na katerem si želim nadaljevati svoje izobraževanje.

Zahvaljujem se recenzentki doc.dr. Tanji Kunej za pregled diplomske naloge, sodelovanje, razumevanje in nasvete.

Hvala vsem sodelavcem v laboratoriju Centra za tipizacijo tkiv in v laboratoriju na farmacevtski fakulteti, ki so na kakršenkoli način pomagali pri izdelavi tega diplomskega dela.

Na koncu se zahvaljujem moji družini, očiju Željku, mami Snježani, sestrici in starim staršem, ki ne glede na vse verjamejo vame in so bili neverjetna opora tekom celotnega študija ter najboljšim prijateljem in fantu, ki so vedno poskrbeli za dobro vzdušje in nepozabna študijska leta.