Imunostimulatorni i imunomodulatorni učinak derivata fenantridina

Knežević Teofilović, Natalija

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:790463

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Natalija Knežević Teofilović

IMMUNOSTIMULATORY AND IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF DIFFERENT PHENANTHRIDINE DERIVATIVES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2017



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

NATALIJA KNEŽEVIĆ TEOFILOVIĆ

IMUNOSTIMULATORNI I IMUNOMODULATORNI UČINAK DERIVATA FENANTRIDINA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2017.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Natalija Knežević Teofilović

IMMUNOSTIMULATORY AND IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF DIFFERENT PHENANTHRIDINE DERIVATIVES

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2017

Zahvale

Zahvaljujem se profesorici Nadi Oršolić na vodstvu, razumijevanju i ljudskosti.

Zahvaljujem se djelatnicima i suradnicima Zavoda za Molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković: Luciji, Adriani i Robertu na pomoći u laboratoriju. Hvala Katji na izvedbi MTT testova.

Hvala djelatnicima Zavoda za Organsku kemiju i biokemiju na Institutu Ruđer Bošković. Posebice hvala Marijani Radić Stojković, na pomoći, strpljenju te izvedbi spektrofotometrijskih analiza.

Hvala djelatnicima Plive Hrvatska d.o.o. na predanosti u edukaciji zaposlenika, na materijalnoj pomoći i razumijevanju. Hvala gospođi Štefici Sirovici što je bila tu kroz ove duge godine.

Hvala mami na ljubavi, pomoći i razumijevanju.

Hvala Branku na ljubavi i poticaju.

Hvala Petru što me svaki dan podučava što su strpljenje, ljubav i sreća.

Hvala Jeleni, što je moja sestra i prijateljica. Bez njezine volje, optimizma i podrške ne bih uspjela.

Sadržaj

SAŽETAK XII
ABSTRACT XIV
§ 1. UVOD 1
§ 2. LITERATURNI PREGLED 3
2.1. Imunosni sustav 3
2.2. Receptori prirođene imunosti 10
2.3. TLR-i kao terapijski ciljevi 20
2.4. Fenantridini i načini međudjelovanja s nukleinskim kiselinama 29
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO 34
3.1. Ispitanici 34
3.2. Izolacija perifernih mononuklearnih stanica iz krvi čovjeka 34
3.3. Derivati fenantridina 36
3.4. Ispitivanje učinka derivata fenantridina na rast stanica u *in vitro* uvjetima primjenom metil-tiazolil-tetrazolij (MTT) testa 39
3.5. ELISA test 41
3.6. Rad s kulturama stanica 43
3.7. UZGOJ KOMPETENTNIH BAKTERIJA *Escherichia coli* DH5α 44
3.8. Transformacija stanica bakterija plazmidnim vektorima 45
3.9. Izolacija plazmidne DNA iz kulture bakterija pomoću *Plasmid Midi Kit*-a (Qiagen) 46
3.10. Elektroforeza u gelu agaroze 48
3.11. Stabilna transfekcija stanica u kulturi 49
3.12. Dual-Glo luciferazni test 50
3.13. Spektrofotometrija 53
3.14. Statistička obrada podataka 56
§ 4. REZULTATI 57
4.1. Rezultati analize ispitivanja učinka derivata fenantridina na rast stanica u *in vitro* uvjetima - MTT test 57
4.2. Rezultati analize razine citokina u nasloju humanih mononuklearnih stanica periferne krvi stimuliranih testiranim fenantridinima 61
4.3. Ispitivanje djelovanja molekule M-199 na izlučivanje IL-8, TNF-α i IL-1β 68
4.4. Rezultati ispitivanja djelovanja molekule M-199 na aktivaciju NF-κB transkripcijskog čimbenika 71

4.5. Ispitivanje međudjelovanja molekule M-199 sa sintetskim TLR9 i TLR3 ligandima.....73
§ 5. RASPRAVA 93
§ 6. ZAKLJUČCI 99
§ 7. LITERATURNI IZVORI..... 101
§ 8. ŽIVOTOPIS 107

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

IMUNOSTIMULATORNI I IMUNOMODULATORNI UČINAK DERIVATA FENANTRIDINA

NATALIJA KNEŽEVIĆ TEOFILOVIĆ
Institut Ruđer Bošković, Bijenička 3, Zagreb, Hrvatska

Toll-like receptori (TLR) sudjeluju u pokretanju prirođene i stečene imunosti. Fenantridini su heterociklički aromatski ugljikovodici čija struktura je slična strukturi nukleotidnih analoga koji su sintetski ligandi za TLR7 i TLR8. Poznati sintetski agonist TLR3 je analog dvostruke RNA (poli(I:C)), dok su TLR9 agonisti oligonukleotidi koji sadrže nemetilirane CpG dinukleotide (CpG-ODN). Istraživanja su pokazala da fenantridini imaju svojstvo ugradnje u strukture dvolančane DNA; potencijalno imunomodulatorno svojstvo.
U ovom istraživanju smo testirali 17 fenantridinskih derivata, pri čemu je spoj M-199 pokazao imunostimulacijski učinak. U ispitivanjima je pokazano da M-199 potiče izlučivanje IL-6, IL-8 i TNF-α, dok ne utječe na promjenu sadržaja IFN-α i IL-1β. Također smo pokazali da spoj M-199 ne djeluje preko TLR7 i TLR8. Tijekom ispitivanja međudjelovanja sa ligandima za TLR9 i TLR3, pokazano je da spoj M-199 ne utječe na stimulaciju TLR9 koja je posljedica vezanja liganda ODN2006, dok suprimira stimulaciju posredovanu ligandom ODN2216. M-199, također suprimira djelovanje poli(I:C).
(108 stranica, 40 slika, 7 tablica, 102 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: fenantridini/ imunomodulacijski potencijal/ imunosni odgovor/ TLR receptori/ M-199

Mentor: prof.dr.sc. Nada Oršolić

Rad prihvaćen: [7. lipnja 2017. godine]

Ocjenitelji (upisuju se tek nakon sjednice Vijeća PMF na kojoj se imenuje Povjerenstvo za ocjenu doktorskog rada, molimo ostaviti prazno tijekom postupka ocjenjivanja):
1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. prof. dr. sc. Nada Oršolić
3. dr. sc. Marijana Radić Stojković, zn. sur.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

IMMUNOSTIMULATORY AND IMMUNOMODULATORY POTENTIAL OF DIFFERENT PHENANHTRIDINE DERIVATIVES

NATALIJA KNEŽEVIĆ TEOFILOVIĆ
Institute Ruđer Bošković, Bijenička 3, Zagreb, Croatia

Toll-like receptors (TLR) are responsible for activation and regulation of innate and adaptive immune response. Synthetic ligands activating TLR7 and TLR8 are nucleoside analogues resembling phenanthridine structure. Phenanthridines are heterocyclic aromatic hydrocarbons. Synthetic ligands for TLR3 are double-stranded RNA analogues (poly(I:C)) and ligands for TLR9 are oligonucleotides containing unmethylated CpG dinucleotide (CpG-ODN). Phenanthridine derivatives also intercalate in double-stranded DNA structure; having possible immunomodulatory potential.

In line with afore-mentioned we have tested 17 different phenanthridine derivatives and concluded that molecule M-199 shows immunostimulatory potential. In further analysis it was shown that M-199 stimulates synthesis of IL-6, IL-8 and TNF-α, while it has no effect on the levels of IFN-α and IL-1β. It was also shown that M-199 does not signal throught TLR7 or TLR8. The results of the interaction study indicated that M-199 does not interfere with ODN2009 while it interferes with ODN2216 and poli(I:C) showing suppression of stimulation.

(108 pages, 40 figures, 7 tables, 102 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: phenanthridines/ immunomodulatory potential/ immune response/ TLR receptors/ M-199

Supervisor**:** Dr Nada Oršolić, Professor

Thesis accepted: [June 7th, 2017]

Reviewers (upisuju se tek nakon sjednice Vijeća PMF na kojoj se imenuje Povjerenstvo za ocjenu doktorskog rada, molimo ostaviti prazno tijekom postupka ocjenjivanja):

Dr. Jasmina Rokov Plavec, Assistent Professor
Dr. Nada Oršolić, Professor
Dr. Marijana Radić Stojković, Research Associate

§ 1. UVOD

Toll like receptori (TLR) su receptori izraženi većinom na stanicama koje sudjeluju u imunosnom odgovoru organizma. Sastavni su dio mehanizama prirođene imunosti te potiču i usmjeravaju stečeni imunosni odgovor. Zbog njihove uloge u aktivaciji i modulaciji obrambenog odgovora imaju velik potencijal za istraživanje u medicini i farmaciji. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati svojstva derivata fenantridina kao novih potencijalnih liganada za TLR-e. Također ispitali smo i njihovo potencijalno inhibicijsko ili sinergističko djelovanje na prijenos signala putem TLR-a.

Do danas su u primjeni, odnosno u raznim fazama kliničkih istraživanja, neki od liganada za TLR-e, kao i modulatori TLR signalnih putova. Koriste se u liječenju virusnih i bakterijskih bolesti, autoimunih bolesti, alergija i tumora. Djelovanjem na same *Toll like* receptore, ili na nizvodne molekule signalnih putova, moguće je dovesti do promjene u staničnoj proizvodnji upalnih citokina, faktora rasta, interferona, interleukina i kostimulacijskih molekula. Krajnji rezultat može biti stimulacija odnosno supresija upalne reakcije. Imunosni sustav mijenja odgovor na stanice ili molekule domaćina odnosno patogena i tumora, te se usmjerava prema T_H1 odnosno T_H2 tipu.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti aktivnost 17 različitih spojeva iz skupine fenantridina, i to u smislu ispitivanja njihove sposobnosti aktivacije i modulacije imunosnog odgovora. Postavljeni cilj temelji se na činjenici da neki od do sada poznatih sintetskih liganada koji se koriste za aktivaciju imunosnog odgovora putem receptora TLR7 i TLR8 pokazuju značajnu strukturnu sličnost sa derivatima spojeva iz porodice fenantridina. Također, u literaturi postoje podaci koji jasno pokazuju na svojstvo ugradnje fenantridina u strukture dvolančane DNA. Obzirom na činjenicu da postoji skupina TLR-a koja se aktivira nukleinskim kiselinama, pretpostavili smo da bi spomenuto svojstvo testiranih spojeva moglo imati učinka na modulaciju imunosnog odgovora preko TLR3 i TLR9.

Stoga su specifični ciljevi ovog rada:

1. Ispitati imunostimulacijsko djelovanje 17 različitih derivata fenantridina na imunokompetentnim stanicama (perifernim mononuklearnim stanicama iz krvi čovjeka);

2. Ispitati da li testirani spojevi stimuliraju stanice direktno putem receptora TLR7/8 u *in vitro* uvjetima (stanice HEK293);
3. Ispitati da li molekule fenantridina međudjeluju s jednolančanim oligodeoksinukleotidima, poznatim sintetskim ligandima za TLR9;
4. Ispitati da li to svojstvo utječe na stimulacijski potencijal sintetskih oligonukleotida specifičnog slijeda u različitim *in vitro* modelima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Imunosni sustav

Imunosni sustav čine stanice i molekule koje su specijalizirane za obranu protiv infekcije. Postoje dva različita odgovora na infekciju: prirođena i stečena imunost. Prirođeni odgovor organizma uvijek iznova jednako reagira na vanjski podražaj, dok se stečeni odgovor pri svakom novom izlaganju dodatno usavršava. U prirođenom odgovoru sudjeluju fagociti (neutrofili, monociti i makrofagi), stanice koje otpuštaju medijatore upale (bazofili, mastociti i eozinofili), te prirodnoubojičke stanice (stanice NK, engl. *natural killer cell*). Molekule koje sudjeluju u prirođenoj imunosti su komplement, proteini akutne faze te citokini. Tijekom stečenog odgovora dolazi do proliferacije antigen-specifičnih T i B stanica. Proliferacija započinje prepoznavanjem antigena pomoću staničnih membranskih receptora. Specijalizirane stanice, antigen predočne stanice, izlažu antigen limfocitima i zajednički s njima odgovaraju na prisutnost antigena. B stanice izlučuju specifična protutijela koja uklanjaju izvanstanične mikroorganizme. Stanice limfocita T pomažu stanicama limfocita B u proizvodnji protutijela te također uklanjaju unutarstanične mikroorganizme aktivacijom makrofaga i ubijanjem stanica zaraženih virusima. Prirođena i stečena imunosna reakcija u većini slučajeva zajedno sudjeluju u uklanjanju patogena [1].

2.1.1. Stanice imunosnog sustava

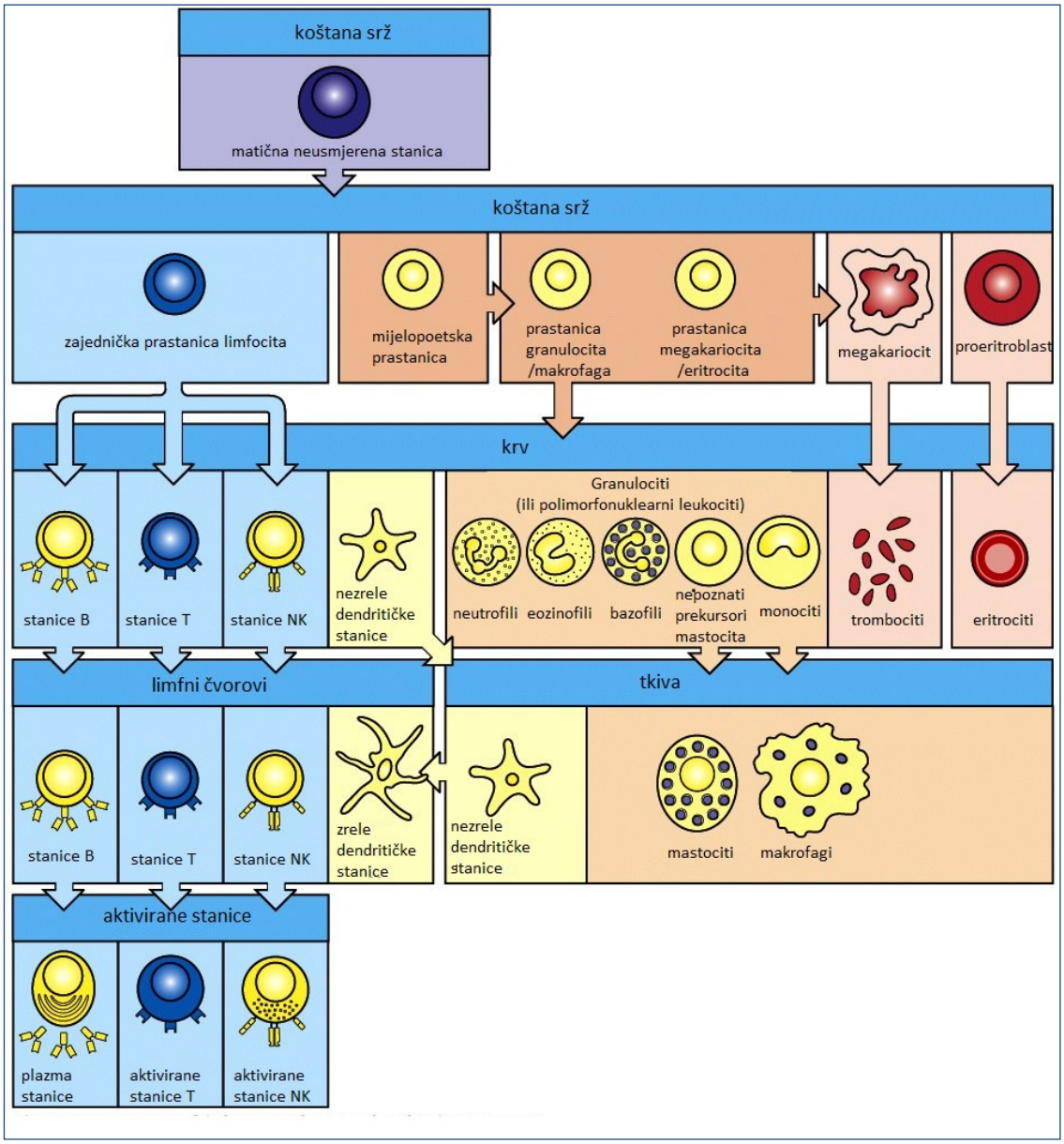
Stanice imunosnog sustava nastaju iz matičnih stanica koštane srži čijom diferencijacijom nastaju mijelopoetska prastanica i zajednička prastanica limfocita (slika1).

Zajednička prastanica limfocita dalje diferencira u stanice limfocita B, stanice limfocita T i stanice NK. Stanice limfocita B na površini izražavaju imunoglobuline, receptore za širok raspon antigena (Ag). Stanice limfocita T imaju TCR (engl. *T cell receptor*) koji se vežu na prerađene antigene na površini stanica APC (engl. *antigen presenting cell*, antigen-predočna stanica). Na stanicama NK nalaze se receptori pomoću kojih prepoznaju stanice inficirane virusima i tumorske stanice.

Diferencijacijom mijelopoetskih prastanica nastaju granulociti (neutrofili, bazofili, eozinofili), monociti, mastociti, trombociti i eritrociti.

Neutrofili se nakupljaju na mjestima bakterijske infekcije i ozljeda tkiva. Imaju sposobnost fagocitoze mikroba i molekula antigena. Proizvode citokine TNF (engl. *tumor necrosis factor*) i IL-12 (interleukin 12), neke kemokine i velike količine ROS-a (engl. *reactive oxygen species*) citotoksičnog za bakterijske patogene [2] [3].

Monociti u tkivima diferenciraju u makrofage. Imaju sposobnost fagocitoze mikroba i molekula koje su označene za uništenje imunoglobulinima ili komplementom. Ove stanice dolaze na mjesto upale ili oštećenja tkiva ubrzo nakon neutrofila i tu ostaju duže vrijeme. Koriste dušični oksid za ubijanje patogena i proizvode velike količine citokina (IL-12 i interferon-γ). Ovisno o aktivirajućem signalu koji pokreće diferencijaciju makrofaga razlikujemo: klasično aktivirane i alternativno aktivirane makrofage. Klasično aktivirani makrofazi (M1) imaju snažno proupalno i antibakterijsko djelovanje te proizvode velike količine IFN-γ (interferon-γ), IL-6, IL-12 i TNF-α. Nastanak alternativno aktiviranih makrofaga (M2) može biti posljedica djelovanja IL-4, IL-10 ili IL-13, odnosno glukokortikoidnih hormona. Oni imaju protuupalno djelovanje i proizvode IL-10, antagonist IL-1 receptora i TGF-β (engl. *tumor growth factor*) [4, 5].



Slika 1. Stanice imunosnog sustava. Preuzeto i prilagođeno prema ref. Murphy i sur [6]

Eozinofili su stanice alergijskih reakcija, također djelotvorne protiv parazita. Bazofili i mastociti na površini izražavaju receptore za IgE (FcεRI) i glavni su inicijatori reakcija preosjetljivosti i odgovora domaćina na helminte. Tijekom tih reakcija otpuštaju iz granula histamin i druge medijatore, te proizvode velike količine lipidnih medijatora koji dovode do upale tkiva, edema i kontrakcije glatkih mišića. Mastociti i bazofili mogu otpustiti velike količine IL-4 koji ima ulogu u poticanju alergijskih reakcija [7].

U grupu stanica koje imaju sposobnost fagocitoze ubrajaju se: monociti/makrofagi, neke stanice epiderme, jetre, mikroglija i dendritičke stanice (DC). Sve ove stanice imaju

sposobnost preuzimanja mikrobnih antigena, njihove proteolize i izlaganja peptidnih odsječaka u svrhu aktivacije stanica limfocita T. Najmoćnije APC su dendritičke stanice koje su prisutne u većini tkiva u ljudskom tijelu, a visoko su koncentrirane u sekundarnim limfnim tkivima. Sve dendritičke stanice izražavaju na površini MHC I i MHC II molekule (engl. *major histocompatibility complex*) pomoću kojih izlažu prerađene antigene stanicama limfocita T. Osim konvencionalnih DC-a postoje i plazmocitoidne DC (pDC) koje su veliki proizvođači interferona tipa I i koje imaju značajnu ulogu u antivirusnom odgovoru i reakcijama autoimunosti [(2) (3)].

2.1.2. Prirođena imunost

Prirođeni imunosni odgovor organizma temelji se na prepoznavanju stranog patogena (engl. *infectious non self* [(8)]), ali i promijenjenih molekula domaćina (engl. *danger self model* [(9)]).

Prvu liniju prirođenog odgovora čine anatomske i fiziološke barijere: koža, sluznice dišnog, probavnog i urogenitalnog sustava. Nekim mikroorganizmima ne odgovaraju tjelesna temperatura, oksigenacija tkiva, pH u tkivima i kemijske tvari (npr. lizozim, interferon ili C-reaktivni protein). Kada patogen ipak prodre kroz zaštitne barijere uklanjaju ga fagociti i prirodnoubojičke NK stanice. Organizam se nadalje štiti složenom reakcijom upale. Stanice koje sudjeluju u urođenom imunosnom odgovoru nose receptore za prepoznavanje obrazaca (engl. *pathogen recognition receptor*, PRR). Mikroorganizmi na svojoj površini izražavaju molekule koje su konzervirane tijekom evolucije, molekularne obrasce pridružene patogenu (engl. *pathogen associated molecular patterns,* PAMP). Receptori koji prepoznaju patogene također prepoznaju promijenjene domaće stanične elemente koji signaliziraju određenu opasnost, tzv. molekularne obrasce otpuštene nakon oštećenja vlastitih tkiva i stanica (engl. *danger associated molecular patterns,* DAMPs). U APC se ubrajaju makrofagi, dendritičke stanice, limfociti B i stanice timusne strome. PRR-i koji su u velikoj mjeri ispoljeni na APC upravo su *Toll like* receptori. Vezanjem specifičnog liganda na TLR-e dolazi do pokretanja složenih signalnih putova koji rezultiraju razvojem antimikrobnnog odgovora i upale. Također, TLR-i na dendritičkim stanicama povezuju prirođenu i stečenu imunost. Naime, kada nezrele dendritičke stanice na periferiji prepoznaju PAMP odnosno DAMP, povlače se u regionalne limfne čvorove, tamo sazrijevaju i aktiviraju limfocite T, koji uz limfocite B, predstavljaju stanice stečene imunosti[(3)].

2.1.3. Stečena imunost

Stečena imunost predstavlja imunoodgovor organizma koji nastaje kao reakcija nakon ulaska određenog antigena u organizam. U primarnoj reakciji nastaju humoralni i stanični izvršioci upale. Humoralni izvršioci su protutijela dok su stanični izvršioci limfociti. Temeljne značajke stečenog odgovora su prepoznavanje, specifičnost, imunološko pamćenje i različitost. Prepoznavanje tuđeg odvija se preko klonova limfocita B i T. Limfociti B prepoznaju izvanstanične antigene pomoću imunoglobulinskih receptora, dok limfociti T prepoznaju peptide vezane na površinske MHC molekule koji su nastali unutarstaničnom preradom antigena. Stečena imunoreakcija je specifična, dakle usmjerena je samo protiv onog antigena koji je izazvao imunoreakciju podražavajući limfocite T i B koji nose površinske receptore specifične prema istom antigenu. Imunološko pamćenje se očituje pri svakom sljedećem ulasku antigena u organizam. U sekundarnoj reakciji dolazi do ekspanzije specifičnog klona limfocita T ili B. Stanice s pamćenjem su limfociti koji su se zaustavili u fazi diferencijacije ovisne o antigenu. Pri ponovnom susretu s antigenom potiču se na nastavak diferencijacije u zrele, izvršne stanice [(3)].

Važnu ulogu u imunosnom odgovoru imaju MHC molekule (engl. *major histocompatibility complex*), glikoproteini na površini stanica koji vežu peptide nastale preradom proteina proizvedenih u stanici (MHC klasa I) ili onih proteina unesenih u stanicu (MHC klasa II). Molekule MHC-I nalaze se konstitutivno izražene na svim tjelesnim stanicama s jezgrom. Proteasom (proteolitički kompleks prisutan u većini staničnih tipova) cijepa vlastite i virusne proteine na peptide koji se dalje izlažu na MHC-I molekulama. Limfocit T može prepoznati specifični antigen samo ako je vezan na vlastitu MHC molekulu. Prilikom međudjelovanja limfocita T i MHC-I na predočnim stanicama, receptor limfocita T (TCR, engl. *T cell receptor*) je u kontaktu i s antigenom i sa MHC-I. MHC-I također stupa u međudjelovanje i sa CD8 biljegom izraženim na citolitičkim stanicama T. Ovo međudjelovanje dodatno ograničava i ojačava prepoznavanje antigenih peptida izloženih na APC-ima od strane $CD8^+$/citolitičke stanice T. Važno svojstvo MHC molekula je strukturni polimorfizam što omogućuje specifično vezanje velike palete različitih peptida. MHC-I molekule mogu također izlagati proteine svojstvene tumorima i (pod određenim uvjetima) vanjske antigene unesene u stanicu. Izlaganje vanjskih antigena se naziva unakrsno predočavanje (engl. *cross-presentation*).

Molekule MHC-II nalaze se izražene na limfocitima B, dendritičkim stanicama, monocitima i makrofazima. Vanjski antigeni unose se u stanice fagocitozom. Nakon ulaska u lizosome, antigeni se proteolitički cijepaju u manje dijelove koji će biti izloženi na površinskim MHC-II molekulama. Jedan dio MHC-II molekule međudjeluje sa CD4 biljegom koji je izražen na T_H stanicama čime se osigurava snažnije međudjelovanje između T stanica i APC-a koji nose MHC-II molekule. Pod utjecajem IFN-γ može doći do izražavanja MHC-II molekula i na drugim tipovima stanica osim na APC-ima gdje su konstitutivno izraženi (aktiviranim limfocitima T, nekim endotelnim stanicama).

Uloga limfocita T očituje se u prepoznavanju i uništavanju inficirane stanice i prepoznavanju dijelova antigena koje izlažu antigen-predočne stanice. T stanice dijele se na $CD8^+$ i $CD4^+$ podvrste. $CD8^+$ stanice ubijaju stanice inficirane unutarstaničnim mikrobima dok $CD4^+$ stanice reguliraju stanični i humoralni odgovor. NK T stanice čine mali udio stanica T; imaju na površini NK1.1 (CD161) antigen. NK T stanice prepoznaju glikolipidne antigene predočene na CD1d molekulama. Pretpostavlja se da imaju imunoregulatornu ulogu, budući da izlučuju velike količine citokina kao što su IFN-γ, IL-4, GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage-colony stimulation factor*) i TNF [2].

Svaka stanica limfocita T nosi jedinstveni receptor za antigene (engl. *T cell receptor,* TCR). U prsnoj žlijezdi/timusu (od kuda i naziv limfociti T) odabiru se stanice koje nose funkcionalne TCR. Ovdje se stanice testiraju imaju li dovoljan afinitet za vlastite molekule MHC (što omogućuje prepoznavanje Ag-MHC kompleksa) i da li su autoreaktivne - da li reagiraju na vlastite antigene. Sve stanice koje ne zadovolje navedene pozitivne i negativne kriterije usmjeravaju se u apoptozu [6].

Aktivacija gena koji kontroliraju proliferaciju i diferencijaciju limfocita T započinje međudjelovanjem visokovarijabilne molekule TCR, u kompleksu sa CD3 (pomoćna molekula za provođenje signala), i antigena vezanog na odgovarajuću molekulu MHC. Za potpunu aktivaciju nužan je i ko-stimulacijski signal; vezanje molekule CD28 i liganda CD80 (B7-1) ili CD86 (B7-2) izraženih na stanicama APC. Diferencijacija stanica T započinje od $CD8^-$ $CD4^-$ stanica, preko $CD8^+CD4^+$ stanica, a završava pozitivnom selekcijom i $CD8^+CD4^-$ i $CD8^-CD4^+$ stanica. Funkcionalne podvrste oba tipa stanica nastaju tek nakon izlaganja antigenu.

Naivne $CD4^+$ stanice (T_H stanice) proizvode vrlo niske količine citokina. Nakon stimulacije antigenom, predočenim na stanicama APC, počinju izlučivati IL-2 i prelaze u T_H0,

te konačno diferenciraju u T_H1, T_H2, T_H17, folikularne pomoćničke (TF_H) stanice T, T_H9 i T_H22 stanice i periferne regulacijske stanice T (pTreg) koje se razlikuju od timusnih regulacijskih stanica T (tpTreg) koje se razvijaju u timusu. $CD4^+$ stanice, koje se još nazivaju pomagački T limfociti, aktiviraju humoralnu (B stanice) i staničnu imunost (zakašnjele reakcije preosjetljivosti i slično). T_H1 stanice pomažu staničnu imunost dok T_H2 stanice pomažu humoralni i alergijski imunosni odgovor. T_H1 limfociti sintetiziraju velike koncentracije interleukina 2 (IL-2) i interferona gama (IFN-γ) te sudjeluju u imunoreakciji na unutarstanične patogene, bakterije i viruse, potičući stanični imunosni odgovor. T_H2 limfociti sintetiziraju IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 koji potiču aktivaciju limfocita B i sintezu protutijela. T_H1 i T_H2 stanice često zajedno sudjeluju u obrambenom odgovoru, ali nakon produžene imunizacije dolazi do prevladavanja jednog tipa reakcije. T_H17 stanice su prisutne u ranom prirođenom imunosnom odgovoru pri čemu pomažu u nagomilavanju neutrofila koji eliminiraju patogene. T_H17 stanice sintetiziraju IL-17, IL-17F, IL-22 i IL-21 i imaju značajnu ulogu u obrani od infekcija mukoznih membrana i kože patogenim bakterijama i gljivicama, kao i u autoimunim bolestima gdje potiču mnoge razarajuće upalne odgovore. TF_H stanice iskazuju različite biološke funkcije. T_H9 limfociti sintetiziraju IL-9 i imaju važnu ulogu u imunoreakciji na crijevne parazite, autoimunim bolestima i alergijama. T_H22 limfociti, sintetiziraju IL-22; citokin ključan za održanje homeostaze epitela u probavnom sustavu, jetri i plućima. T regulatorne stanice (Treg) su također $CD4^+$ stanice koje imaju ulogu stišavanja imunoreakcije. Dijele se u dvije grupe: prirodne Treg (izlučuju TGF-β i IL-10) i stečene ili inducirane Treg (glavni proizvod im je IL-10).

$CD8^+$ stanice djeluju citotoksično na stanice inficirane unutarstaničnim patogenima i prema tumorskim stanicama. $CD8^+$ stanice mogu također proizvesti citokinski odgovor tipa 1 i tipa 2. U tom slučaju se označavaju kao citotoksične T stanice tipa 1 i tipa 2. $CD8^+$ stanice uključuju i grupu stanica koje utišavaju imunosni odgovor – supresorske stanice.

Stanice B čine oko 15% cirkulirajućih limfocita, a njihov najvažniji proizvod su imunoglobulini. Stanice B nastaju iz matičnih stanica pod utjecajem IL-17. U koštanoj srži dolazi do diferencijacije i nastanka receptora za antigene. Antigenski receptori su imunoglobulinske molekule koje karakterizira visoka raznolikost. Rekombinacijom nastaju izotipovi imunoglobulina IgG (1-4), IgA (1-2), IgM, IgD i IgE. Kao i kod stanica limfocita T, i na površini limfocita B se nalazi ko-receptorski kompleks koji se sastoji od molekula CD19, CD81 i CD21.

Naivne B stanice proizvode IgM i IgD na svojoj površini ali pod utjecajem T_H stanica i njihovih citokina dolazi do promjene imunoglobulinskih izotipova. Tako npr. IL-10 dovodi do proizvodnje IgG1 i IgG3, dok IL-4 i IL-13 usmjeravaju proizvodnju prema IgE. TGF-β potiče izražaj IgA, a IFN-γ dovodi do izražaja IgG2.

Međudjelovanje stanica limfocita T i B dovodi do promjene izotipa i somatskih mutacija na antigenskim receptorima limfocita B. Limfociti B prethodno vežu odgovarajući antigen, obrade ga i izlažu na površinskim MHC II molekulama. Preuzimanjem antigena povećava se izražaj MHC II, CD80 i CD86 molekula. Tijekom međudjelovanja aktiviranih limfocita T i biljega CD40 izraženog na stanicama B, nastaje signal koji se prevodi preko CD40. Molekule CD40 povratno signaliziraju i aktiviraju stanicu B. što dovodi do promjene izotipa. Promjena izotipa i somatske mutacije su povezane s razvojem memorijskih B stanica. Memorijski odgovor karakteriziran je brzinom i visokom koncentracijom protutijela. Do njega dolazi nakon opetovanog izlaganja antigenu pri čemu se većinom proizvode IgG, IgA i IgE.

Stanice B se mogu aktivirati i bez pomoći T stanica. Aktivirajući antigeni trebaju imati polimernu strukturu s ponavljajućim obrascima (bakterijski lipopolisaharidi, polimerni polisaharidi, polimerni proteini). Takvi antigeni mogu povezati više imunoglobulinskih molekula na površini stanica B i dovesti do nastanka stimulirajućeg signala bez kostimulacijskih molekula. Bez međudjelovanja s limfocitima T većinom nema somatskih mutacija zbog čega je ova vrsta aktivacije slaba .

Limfna tkiva osiguravaju prostor za međudjelovanje limfocita T, APC-a koji izlažu antigene i limfocita B koji imaju specifični imunoglobulinski receptor za odgovarajući antigen. Kemokini privlače ključne stanice u pojedine odjeljke limfnih čvorova nakon čega specifični signali reguliraju otpuštanje odgovarajućih limfocita u cirkulaciju [2].

2.2. Receptori prirođene imunosti

U skupinu receptora odgovornih za prepoznavanje obrazaca (engl. *pattern recognition receptors,* PRR) pripadaju *Toll like* receptori (TLR), *Nod like* receptori (NLR), *Rig-I-like* receptori (RLR), citosolni DNA senzori (CDS) i lektinski receptori C-tipa (CLR).

TLR su jedni od najviše izučavanih PRR-a. Kod čovjeka je opisano 10 različitih vrsta TLR-a. Nalaze se većinom na stanicama odgovornim za aktivaciju i regulaciju imunosnog odgovora, ali i epitelnim i tumorskim stanicama. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10

smješteni su na staničnoj površini dok su TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 smješteni u unutarstaničnim organelama. *Toll like* receptori prepoznaju ligande porijeklom iz bakterija, virusa, parazita i gljivica (lipide, lipoproteine, proteine, nukleinske kiseline) ali i proizvode staničnog stresa tkiva domaćina. Aktivacijom TLR-a pokreću se složeni signalni putovi koji u konačnici dovode do proizvodnje proupalnih citokina, te interferona tipa I i II (IFN tip I i IFN tip II).

Nod like receptori (NLR) i *Rig-I-like* receptori (RLR) nalaze se u citoplazmi. Ovi receptori su topivi proteini koji u citoplazmi traže znakove unutarstanične infekcije [*10*] [*11*].

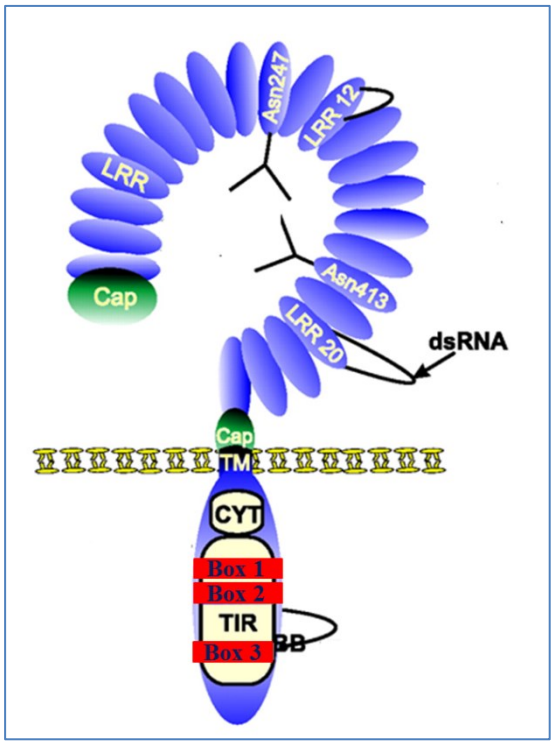
RLR-i su izraženi u većini staničnih tipova. RIG-I (engl. *retinoic acid-inducible gene I product*), MDA5 (engl. *melanoma differentiation associated factor 5*) i LGP2 (engl. *laboratory of genetics and physiology 2 and a homolog of mouse D11lgp2*) su receptori za RNA. Vezanjem virusne RNA ili obrađene vlastite RNA na receptor u citoplazmi pokreće se prirođena imunost i reakcija upale, regulacija upalne reakcije, te u konačnici dolazi do aktivacije i transkripcije IFN tipa I i ekspresije antivirusnih gena koji sudjeluju u unutarstaničnoj kontroli virusne infekcije. RLR-i međudjeluju sa TLR-ima u pokretanju urođene i modulaciji stečene imunosti [*12*].

NLR (engl. *nucleotide – binding oligomerization domain* (NOD) - *containing* l*ike receptors*) su citoplazmatski proteini i imaju ulogu u regulaciji upalnog i apoptotskog odgovora te u obrani od virusa. Općenito, NLR-i imaju središnju ulogu u organizaciji signalnog proteinskog kompleksa inflamasoma. Ligandi i funkcija mnogih NLR-a nisu poznati, zna se da prepoznaju citoplazmatske PAMP i DAMP te potiču imunosni odgovor [*10*], [*11*].

Lektinski receptori tipa C (engl. *C-type lectin receptor,* CLR) prepoznaju i vežu ugljikohidrate. Ovu skupinu čini veliki broj receptora koji se prema smještaju dijele na: CLR vezane na staničnu membranu i topljive CLR. Stanični receptori služe za prepoznavanje fukoze, manoze i glukanskih ugljikohidratnih struktura što im omogućuje prepoznavanje većine humanih patogena. Nalaze se na većini stanica koje fagocitiraju glikoproteine i mikroorganizme. Nakon fagocitoze, antigeni se ili uklanjaju ili predočuju T limfocitima. Jedan od topivih CLR je MBL (engl. *mannose binding lectin*) koji veže ugljikohidratne strukture na površini patogena [*13*].

2.2.1. *Toll like receptori*

Toll like receptori (TLR) su transmembranski proteini tipa I. Sastoje se od izvanstaničnog dijela koji sadrži leucinom bogate ponavljajuće sljedove (engl. *leucine rich repeats*, LRR), transmembranske regije (TM) i citoplazmatske domene koja se naziva TIR domena (Toll-IL-1 receptor domena) (slika 2). Izvanstanična domena ima ulogu u prepoznavanju odgovarajućih PAMP-ova, dok TIR domena aktivira nizvodne signalne putove. U ljudskom organizmu postoji 10 TLR-a [14].



Slika 2. Shematska struktura humanog TLR3. LRR-i (engl. *leucin rich repeats*) su okruženi sa dvije cisteinom bogatim Cap domene. LRR12 i LRR20 imaju dodatne aminokiselinske slijedove koji izlaze iz strukture potkove. Smatra se da je LRR20 odgovaran za vezanje TLR3 liganda, dsRNA. Na unutarnjoj strani potkovičaste strukture nalazi se niz potencijalnih glikozilacijskih mjesta, na ovoj shemi istaknuti su Asn247 i Asn413. Transmembranska domena (TM) sastoji se od jednog α-heliksa. Citoplazmatska domena sastoji se od CYT regije i TIR domene. Unutar TIR domene ističe se ispupčena BB petlja koja veže adaptorne molekule. Preuzeto i prilagođeno prema ref. Vercammen, Staal i Beyaert.[18]

Izvanstanični dio TLR-a (ECD, od engl. *ectodomain*) evolucijski je očuvan, te je građen od 22 do 29 LRR-a [15]. Svaki LRR, najčešće je građen od 24 aminokiseline te se sastoji od leucinom bogatog slijeda i konzerviranog slijeda bogatog hidrofobnim ostatcima [16].

Leucinom bogate ponavljajuće regije imaju strukturu u obliku potkove, pri čemu su hidrofobni ostaci smješteni u unutrašnjosti zavojnice. LRR izravno stupaju u vezu s ligandom [17].

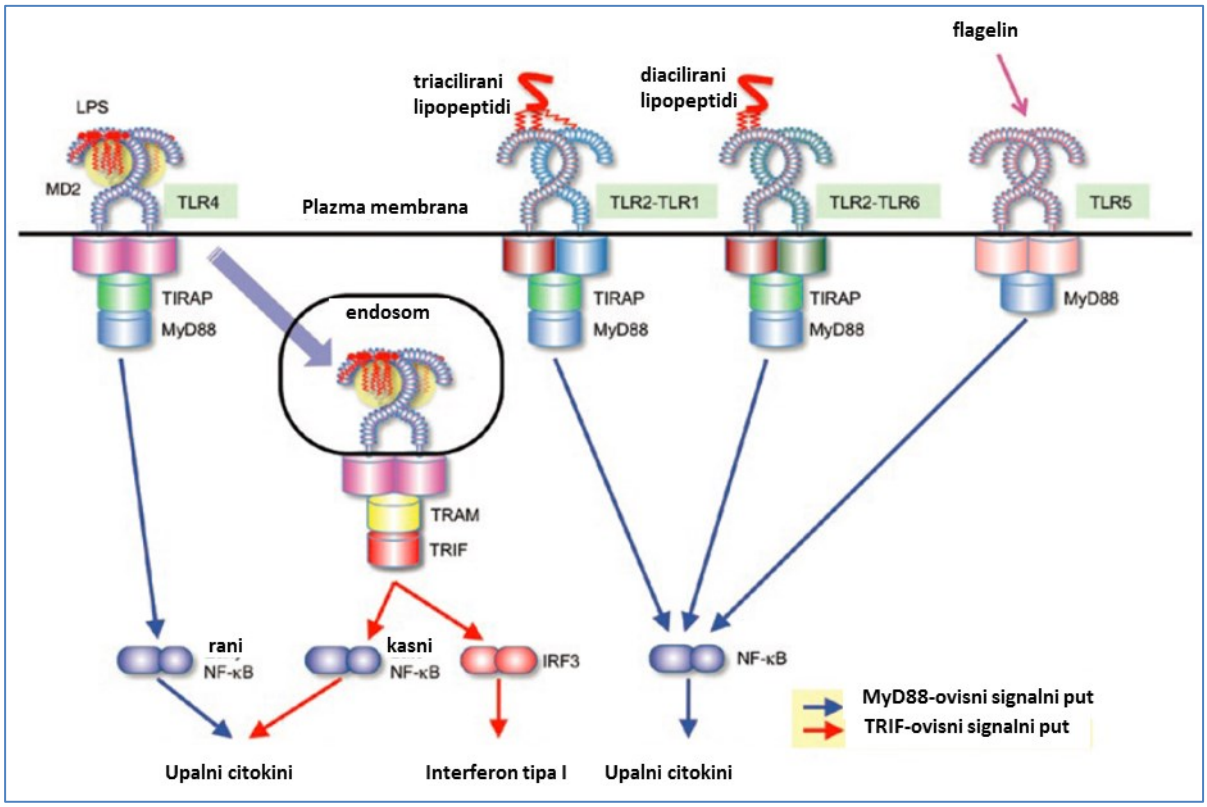
Unutarstanična dio receptora (ICD, od engl. *intracellular domain*) sadrži evolucijski očuvanu TIR domenu. TIR domena ima globularnu strukturu i posreduje u provođenju signala vezanjem adaptorskih proteina s homolognom regijom [19]. Domena se sastoji od 5 paralelnih β-lanaca i 5 α-zavojnica međusobno povezanih sa 5 petlji koje čine slijed građenu od tri motiva, Box1, Box2 i Box3. Box1 vjerojatno sudjeluje u oligomerizaciji receptora i specifičnosti signalnog puta [20]. Box2 ima značajnu ulogu u vezanju adaptornih molekula na receptor. Ovaj motiv sadrži BB petlju u kojoj se nalazi konzervirani slijed aminokiselina koji sadrži prolin i neophodna je za vezanje adaptorne molekule kao što je npr. MyD88 [21]. Kod TLR3 na mjestu prolina je alanin, a signal se prenosi u stanicu MyD88-neovisnim putem. Box3 je vjerojatno uključena u smještaj receptora u stanici i vezanje adaptornih molekula [22, 23].

TLR se dijele prema smještaju u stanici i prema specifičnosti u odnosu na ligande. Obzirom na smještaj u stanici razlikujemo površinske i unutarstanične. Na površini stanice nalaze se TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10.

TLR4 otkriven je kao receptor koji prepoznaje lipopolisaharide (LPS) vanjske membrane Gram-negativnih bakterija. Molekula LBP (engl. *lipid binding protein*) veže LPS nakon čega ga CD14 (topivi protein iz plazme) dostavlja TLR4-MD2 kompleksu (MD2 od engl. *myeloid differentiation factor 2)* (slika 3). Nastali multimer sadrži po dva TLR4-MD2-LPS kompleksa i započinje prijenos signala preko unutarstanične adaptorske molekule [24, 25].

TLR2 tvori heterodimere sa TLR1 i TLR6. TLR2-TLR1 heterodimer prepoznaje triacilirane lipopeptide iz Gram-negativnih bakterija i mikoplazmi dok TLR2-TLR6 prepoznaje diacilirane lipopeptide iz Gram-pozitivnih bakterija i mikoplazmi (slika 3). TLR2 agonisti većinom potiču proizvodnju proupalnih citokina u makrofazima i dendritičkim stanicama, ali mogu poticati i nastanak IFN tipa I u upalnim monocitima kao odgovor na infekciju. U TLR2 podporodicu ubraja se i TLR10. TLR10 tvori heterodimer s TLR2 i prepoznaje triacilirane lipopeptide [26] [27].

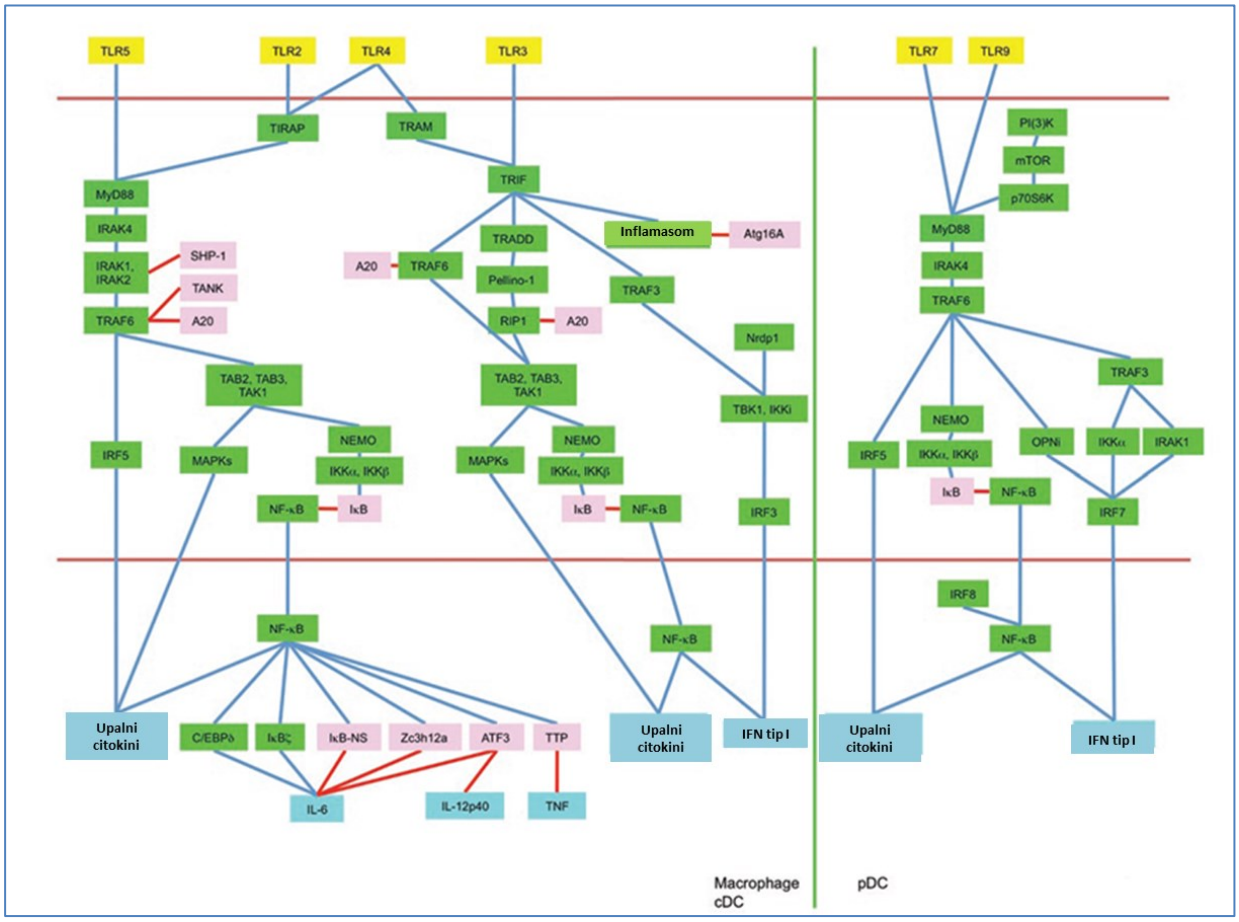
TLR5 prepoznaje flagelin, protein iz bakterijskih flagela (slika 3) [26].



Slika 3. Prepoznavanje liganda/PAMPa i signaliziranje putem TLR-a na površini stanice. TLR4 prenosi signal za ranu aktivaciju NF-κB putem adaptora TIRAP i MyD88. Nakon rane aktivacije TLR4-MD2-LPS kompleks prenosi se u endolizosome gdje se preko adaptora TRAM i TRIF okida kasna aktivacija NF-κB i proizvodnja IFN tipa I preko IRF3. I rana i kasna faza NF-κB aktivacije nužne su za proizvodnju upalnih citokina.
Kratice: PAMP – engl. *pathogen associated molecular patterns*; TLR – engl. *toll like receptor*; NF-κB – engl. *nuclear factor-κB*; TIRAP – engl. *TIR-containing adaptor protein*; MyD88 - engl. *myeloid differentiation primary response gene 88*; MD2 – engl. *myeloid differentiation factor 2,* LPS – lipopolisaharid, TLR ligand; TRAM - engl. *TRIF-Related Adaptor Molecule*; TRIF – engl. *TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-beta*; IFN – interferon; IRF - engl. *interferon regulatory factor*
Preuzeto i prilagođeno prema ref. Kawai i Akira [26]

TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 smješteni su unutar stanice na membrani endoplazmatskog retikuluma (ER), endosoma, lizosoma i endolizosoma. Prepoznaju nukleinske kiseline u unutarstaničnim organelama. Nukleinske kiseline ulaze u stanicu nakon infekcije virusom ili nekim drugim patogenima, ili fagocitozom inficiranih stanica[28]. Također, i vlastite nukleinske kiseline mogu dospjeti u izvanstanični prostor. Međutim djelovanjem endonukleaza budu razgrađene i na taj način ne dospijevaju natrag u unutarstanični prostor odnosno organele. Stoga su receptori koji prepoznaju nukleinske kiseline smješteni unutar

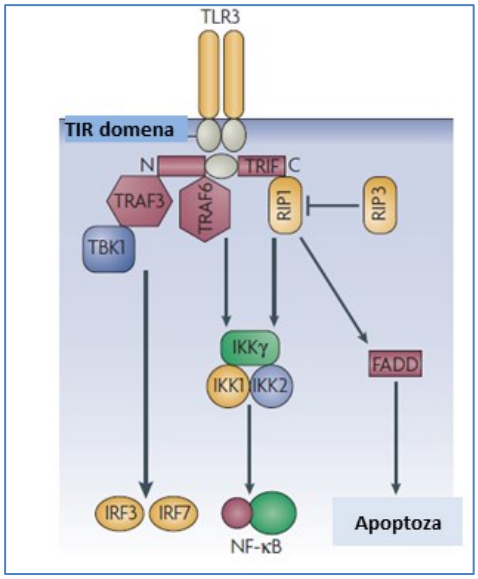
stanice i tako odvojeni od vlastitih nukleinskih kiselina što štiti organizam od autoimunog odgovora [29].



Slika 4. TLR signalni putovi.
Kratice: TLR – engl. *toll like receptor*; TIRAP – engl. *TIR-containing adaptor protein*; TRAM - engl. *TRIF-related adaptor molecule*; MyD88 - engl. *myeloid differentiation primary response gene 88*; IRAK – engl. *IL-1R-associated kinase*; TRAF – engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor*; IRF – engl. *interferon response factor*; TAB - engl. *TAK1-binding* protein; TAK – engl. *transforming-growth-factor-β-activated kinase*; NF-κB - engl. *nuclear factor-κB*; NEMO - IKKγ; IKK - engl. *I kappa B kinase*; TRIF - engl. *TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-beta*; TRADD - engl. *TNFR1 associated death domain protein*; RIP - engl. *receptor interacting protein*; MAPK - engl. *mitogen-activated protein kinase*; PI(3)K - fosfoinozitol 3-OH kinaza; mTOR - engl. *mammalian target of rapamycin*; OPNi - prekursor osteopontina
Preuzeto i prilagođeno prema ref. Kawai i Akira [26]

Vezanjem specifičnog liganda na TLR-e pokreću se složeni signalni putovi koji rezultiraju proizvodnjom različitih citokina i kemokina koji u konačnici posreduju u određenom tipu imunosne reakcije (slika 4). Nakon transporta receptora iz endoplazmatskog retikuluma u

endosomske stanične strukture i proteolitičke obrade receptora dolazi do dimerizacije, stvaranja inaktivnog kompleksa i konačno vezanja liganda. Ključna točka u nastavku prijenosa signala je vezanje adaptornih molekula. Sve adaptorne molekule sadrže TIR domenu. MyD88 je adaptorna molekula koju koriste svi TLR-i, osim TLR3. Adaptorna molekula koja se veže na TLR3 je TRIF (engl. *TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β*) (slika 5, slika 6).

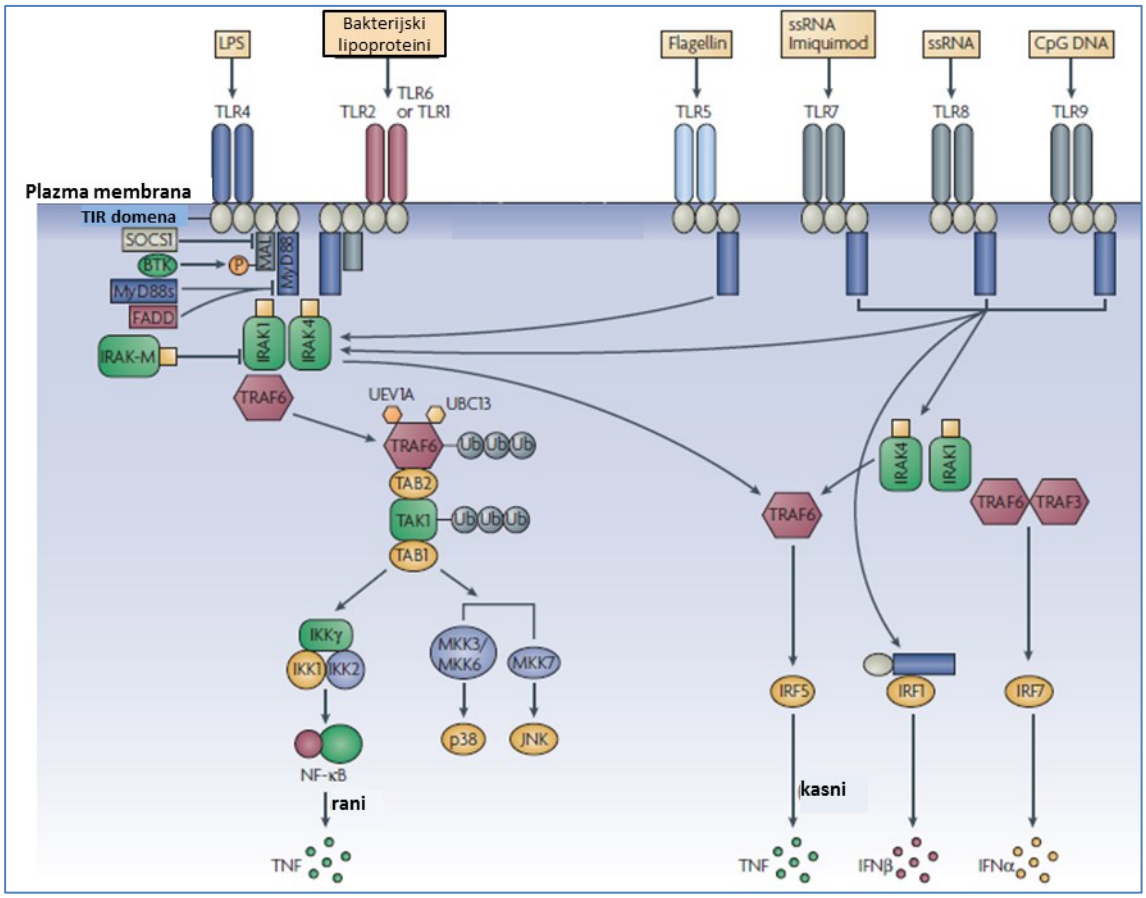


Slika 5. TLR3 signalni putovi.

Kratice: TLR – engl. *toll like receptor*; TRIF – engl. *TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-beta*; TRAF – engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor*; RIP - engl. *receptor interacting protein*; TBK1 – engl. *TANK-binding kinase*; IRF – engl. *interferon response factor*; IKK - engl. *I kappa B kinase*; NF-κB - engl. *nuclear factor-κB*; FADD – engl. *FAS-associated death domain*.
Preuzeto i prilagođeno prema ref. O'Neill i Bowie [30].

U signalnim putovima koji su posredovani adaptornom molekulom MyD88, MyD88 se direktno veže na TIR domenu receptora (slika 3, slika 6). Nakon toga dolazi do privlačenja članova IRAK (engl. *IL-1R-associated kinase*) obitelji. MyD88 prvo privlači IRAK4, zatim IRAK1 i IRAK2. IRAK1 privlači TRAF6 (engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) i ubikvitinacijske faktore UEV1 (engl. *ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant1*) i UBC13 (engl. *ubiquitin-conjugating enzyme 13*). TRAF6 katalizira sintezu poliubikvitinskih lanaca na ciljnim proteinima. Nakon samoubikvitinacije na poziciji Lys63 i ubikvitinacije IRAK1 (na poziciji Lys63) dolazi do privlačenja TAB2 (engl. *TAK1-binding protein 2*) i TAB3 (regulacijske komponente kinaze TAK1 (engl. *transforming-growth-factor-β-activated kinase*)), pri čemu se oslobađa i aktivira TAK1. Poliubikvitinski lanci također privlače NEMO

što omogućava približavanje TAK1 i IKKβ, te fosforilaciju IKKβ. IKK (engl. *I kappa B kinase*) kompleks sastoji se od dvije kinaze IKKα i IKKβ, te regulacijske podjedinice NEMO – IKKγ). Fosforilirani odnosno aktivirani IKKβ fosforilira IκB - inhibitor NF-κB kinaznog kompleksa. Posljedica fosforilacije IκB je razaranje inhibicijskog proteina, te oslobađanje NF-κB. TAK1 također aktivira odnosno fosforilira uzvodne kinaze MAPK obitelji [31-33].



Slika 6. TLR7, TLR8, TLR9 signalni putovi.
Kratice: LPS – lipopolisaharid, TLR4 ligand; ssRNA – jednolančana RNA; CpG DNA - oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; TLR - engl. *toll like receptor*; TIR - Toll-IL-1 receptor domena; MAL – engl. *MyD88-adaptor-like protein*; MyD88 - engl. *myeloid differentiation primary response gene 88*; IRAK – engl. *IL-1R-associated kinase*; TRAF – engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor*; TAB - engl. *TAK1-binding* protein; IKK- engl. *I kappa B kinase*; NF-κB - engl. *nuclear factor-κB*; TNF - engl. *tumor necrosis factor*; MKK – engl. *mitogen-activated protein kinase kinase*; JNK – engl. *c-Jun NH(2)-terminal kinase*; IRF – engl. *interferon response factor*; IFN – interferon
Preuzeto i prilagođeno prema ref. O'Neill i Bowie [30].

Dakle, stimulacija *Toll like* receptora dovodi do aktivacije transkripcijskog čimbenika NF-κB koji je u stanju mirovanja u citoplazmi vezan na inhibicijski faktor IκB. Aktivacijom receptora dolazi do fosforilacije IκB (posredovane IKK kompleksom), oslobađanja NF-κB i

njegove translokacije u jezgru. NF-κB u jezgri inducira transkripciju gena za citokine, kemokine, adhezijske molekule i proteine vezane za apoptozu [34].

2.2.2. Receptori za prepoznavanje nukleinskih kiselina

TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 su u nestimuliranim uvjetima smješteni na membrani endoplazmatskog retikuluma, u obliku monomera. Nakon stimulacije specifičnim ligandom preko Golgijevog aparata odlaze u endosome. Zakiseljavanje endolizosoma je nužno za unos internaliziranih nukleinskih kiselina i dalje međudjelovanje sa TLR7 i TLR9 [26], [14]. Važnu ulogu u procesiranju ima protein UNC93B1 koji veže transmembranske regije receptora i regulira njihov prijenos iz endoplazmatskog retikuluma u endosome [26], [14].

TLR3 prepoznaje dvolančanu RNA (dsRNA). Sintetski ligand TLR3 je analog dsRNA (dvolančana RNA), poliinozin-policitidilična kiselina (poli(I:C)). Prirodni ligandi TLR3 su genomska RNA reovirusa, dsRNA koja nastaje tijekom replikacije jednolančane RNA (ssRNA), određene male interferirajuće RNA, siRNA (engl. *small interfering RNA*) i različite virusne RNA (respiratorni sincicijski virus (RSV), virus encefalomiokarditisa, virus Zapadnog Nila) [24, 35] [36].

TLR7 i TLR8 su receptori za jednolančanu RNA virusnog i bakterijskog porijekla. Snažno aktiviraju urođeni imunološki odgovor nakon infekcije virusom [34].

TLR7 je receptor za jednolančanu RNA (ssRNA) virusnog i bakterijskog porijekla, te za malu interferirajuću RNA (siRNA). Nakon ulaska molekule RNA u stanicu i njezinog prelaska u endolizosome, TLR7 veže specifični ligand i pokreće snažni antivirusni odgovor. TLR7 je izražen u visokoj koncentraciji u plazmocitoidnim dendritičkim stanicama (pDC). pDC-i reagiraju na virusnu infekciju proizvodnjom IFN tipa I i upalnih citokina. U konvencionalnim DC-ima (cDC-ima) TLR7 prepoznaje RNA bakterijskog porijekla što dovodi do proizvodnje IFN tipa I.

TLR8 je receptor filogenetski najsličniji TLR7. Ljudski TLR8 prepoznaje virusnu ssRNA. Najviši nivo ekspresije može se uočiti u monocitima, osobito nakon bakterijske infekcije [26] [14]. Osim virusne RNA, TLR7 i TLR8 prepoznaju i vlastitu RNA unutar kompleksa sa ribonukleoproteinskim (RNP) protutijelima. TLR7 i TLR8 se razlikuju prema nekim osobinama: TLR8 aktivira ssRNA bogata AU slijedovima dok TLR7 aktiviraju GU bogati slijedovi [37]. TLR8 tvori sekundarnu strukturu kako bi prepoznao ssRNA, dok TLR7 ne mora prilagođavati svoju strukturu u svrhu aktivacije [38]. Također je različita zastupljenost

ovih receptora na stanicama; dok je TLR7 većinom izražen na pDC i stanicama limfocita B, TLR8 je izražen na monocitima, cDC i neutrofilima [37]. Također, postoje i literaturni podaci koji ukazuju i na svojstvo TLR8 izraženog na THP-1 stanicama da stvara heterodimere s TLR2, što mu omogućava prepoznavanje uzročnika lajmske borelioze, *Borrelia burgdorferi* [39].

TLR9 prepoznaje nemetilirane CpG DNA slijedove koji su znatno češći u bakterija i virusa nego u sisavaca. Sintetski CpG oligonukleotidi (ODN) također su TLR9 ligandi, aktiviraju stanice DC, makrofage i stanice limfocita B pokrećući snažan T_H1 odgovor. TLR9 prepoznaje sintetski ODN i ako se sastoji samo od šećernih ostataka DNA, 2'-deoksiriboze, vezanih fosfodiesterskom vezom. Dakle, CpG motiv nije presudan za prepoznavanje ODN-a ako okosnicu čini fosfodiesterska veza. Ako je u okosnici molekule ODN fosforotioatna veza (opisano na slici 8), tada CpG motiv utječe na prepoznavanje [40]. TLR9 je snažno izražen u pDC gdje omogućava prepoznavanje infekcije virusnom DNA.

Prirodni i sintetski ligandi nakon vezanja na *Toll like* receptore okidaju specifične signalne putove. Prijenos signala putem TLR3 započinje adaptornom molekulom TRIF što rezultira proizvodnjom IFN tipa I i upalnih citokina u makrofazima i klasičnim stanicama cDC. TRIF stupa u međudjelovanje s TRAF6 i aktivira TAK1 mehanizmom ubikvitinacije, tj. kataliziranjem sinteze poliubikvitinskog lanca vezanog na Lys63. Poliubikvitin na Lys63 veže se na ubikvitin-vezujuću domenu TAB2 i TAB3 koji aktiviraju TAK1. Poliubikvitinski lanci na Lys63 iz TRAF6 vežu se također na ubikvitin-vezujuću domenu NEMO-a. Ubikvitin-vezujuća domena NEMO-a ima važnu regulacijsku ulogu. Također, protein TRIF međudjeluje i s adaptornom molekulom RIP1 (engl. *receptor interacting protein 1*). RIP1 se, nakon stimulacije TLR3 receptora, poliubikvitinira na Lys63, što je također potrebno za aktivaciju NF-κB. Adaptor TRADD (engl. *TNFR1 associated death domain protein*) veže RIP1. U konačnici, TRIF tvori multiproteinski signalni kompleks sa TRAF6, TRADD, Pellino1 i RIP1 za aktivaciju TAK1. TAK1 se uz pomoć NEMO-a pozicionira uz IKK kompleks pri čemu fosforilira i aktivira IKKβ što za posljedicu ima fosforilaciju i razgradnju proteina IκB i aktivaciju odnosno oslobađanje NF-κB. TAK1 također aktivira i MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) signalne putove [26] [14].

Poznate su neke molekule koje kontroliraju proizvodnju IFN tipa I i upalnih citokina u pDC-ima (slika 4). OPNi (prekursor osteopontina) je TLR9 inducibilni protein koji se nalazi u citoplazmi i djeluje kao komponenta MyD88-IRF7 kompleksa. Fosfoinozitol 3-OH kinaza

(PI(3)K) potiče prijelaz IRF7 u jezgru; dok su mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) i p70S6K, supstrati PI(3)K, čija inhibicija remeti međudjelovanje MyD88 i TLR9. IRF5 je dio MyD88 kompleksa i kontrolira indukciju IL-6 i IL12p40; IRF8, vjerojatno zajedno s NF-κB kontrolira indukciju citokina ovisnu o TLR9 [26].

2.3. TLR-i kao terapijski ciljevi

Receptori urođene imunosti, i njihove adaptorne molekule, interesantni su kao mete ciljane terapije jer sudjeluju u složenim signalnim putovima uključenim u različitim patološkim stanjima; od infekcije i upale, do autoimunih bolesti i nastanka tumora. *Toll like* receptori imaju izuzetno važnu ulogu u regulaciji prirođene imunosti i upale. Njihova sposobnost da pokreću i usmjeravaju upalu učinila ih je ciljem raznih terapijskih pristupa. Veliki broj molekula koje moduliraju djelovanje TLR-a istražuje se u kliničkim ispitivanjima, dok je određen broj već odobren kao terapija (imikvimod u obliku kreme) [41].

Mukoza dišnog sustava je glavno područje sučeljavanja patogena i obrambenog sustava domaćina. Tijekom bakterijske ili virusne infekcije dolazi do aktivacije TLR-a na površini makrofaga. Aktivacijom makrofaga povećava se njihova fagocitna aktivnost, sposobnost oksidacijskog izgaranja i izlučivanje proupalnih citokina. Posljedica izlučivanja citokina i kemokina je privlačenje drugih upalnih stanica u dišne putove. Nakupljanjem neutrofila i NK stanica aktivira se prirođeni imunosni odgovor, dok dendritičke stanice prelaskom u limfne čvorove potiču diferencijaciju naivnih T stanica i pokreću specifičnu imunost. Na ovaj način se aktivacijom TLR-a na površini makrofaga omogućava obrana organizma od respiratornih infekcija [42].

U alergijskim bolestima TLR-i imaju dvostruku ulogu u smislu regulacije imunosnog odgovora. Aktivacija nekih *Toll-like* receptora dovodi do senzibilizacije i prestanka tolerancije, ali također mogu uzrokovati i toleranciju na nepatogene alergene iz zraka. Kod pacijenata s astmom i alergijskim rinitisom uočena je promjena ekspresije i funkcije TLR-a u odnosu na ostatak populacije. Ova promjena može biti razlogom povećanoj podložnosti respiratornim infekcijama. Također je dokazano da je oštećena funkcija TLR-a reverzibilna i da se može popraviti odgovarajućim lijekovima. Rezultati kliničkih ispitivanja u kojima su TLR terapijski cilj, pokazuju kako je moguće zaustaviti alergijski odgovor pokretanjem tolerancije ili preusmjeravanjem imunosnog odgovora iz dišnog sustava [43].

U terapiji tumora dva su pristupa u kojima se primjenjuju TLR agonisti: modulacija imunosnog odgovora na tumore putem djelovanja na TLR izražene na stanicama imunosnog sustava, odnosno regresija tumora putem djelovanja na TLR izražene na samim stanicama tumora. Aktivacija TLR-a na samim stanicama tumora na žalost može djelovati i protumorski kao što je najčešće slučaj pri aktivaciji TLR7, TLR8 i TLR9.

Kod pacijenata oboljelih od tumora prisutna je promijenjena/oslabljena aktivacija stanica T. Uzrok ove promjene je imunosupresija, smanjena ekspresija tumorskih antigena ili disfunkcija antigen-predočnih stanica. Cilj terapije je poboljšanje funkcije dendritičkih stanica (stanice iz porodice APC-a), te aktivacija T odnosno B stanica.

Dendritičke stanice se dijele na mijeloidne ili konvencionalne (mDC ili cDC) i plazmocitoidne. mDC izražavaju TLR1 do TLR8. Njihova aktivacija dovodi do: povećanja izražavanja staničnih biljega (CD80, CD86, MHC I i II, CCR7), proizvodnje proupalnih citokina i kemokina (TNF, IL-1, IL-6, MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α) te do aktivacije antigen-specifičnih $CD8^+$ i $CD4^+$ T stanica. Mijeloidne DC povećavaju kapacitet za unos antigena i predočavanje antigena odgovarajućim stanicama T. Plazmocitoidne DC izražavaju samo TLR7 i TLR9. Aktivacijom TLR-a na pDC-ima povećava se proizvodnja IFN tipa I i kemokina, aktivacija te broj stanica T i aktivacija stanica NK [(44)].

Terapija tumora temeljena na aktivaciji TLR smatra se područjem koje je nužno dodatno istraživati zbog potencijalnog protumorskog djelovanja agonista. TLR7 i TLR8 su prekomjerno izraženi na stanicama karcinoma pluća gdje sudjeluju u upali, rastu tumora, preživljenju i metastaziranju. Stimulacijom ovih receptora povećava se otpornost na kemoterapiju. Aktivacija dovodi do povećanja lučenje proupalnih citokina (IL-6, IL-8, GM-CSF, IL-1α, IL-12) putem transkripcijskog čimbenika NFκB, povećanja sinteze antiapoptotskog proteina Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), povećanja sinteze VEGFR (engl. *vascular endothelial growth factor*) uključenog u angiogenezu te povećane ekspresije kemokinskih receptora povezanih sa pokretljivošću stanica [(45, 46)]. TLR9 je izražen na stanicama karcinoma dojke i želuca; stimulacijom se povećava invazivnost tumora [(47-50)]. Stimulacija TLR9 na stanicama karcinoma pluća povećava proizvodnju IL-8, IL-1 i IL-6 što ubrzava rast tumora [(45)]. Na stanicama humanog karcinoma ovarija aktivacija TLR9 povećava invazivnost i pokretljivost stanica [(51, 52)]. Protumorski učinak također ima i aktivacija TLR9 na epitelnim stanicama karcinoma prostate i na stanicama hepatocelularnog karcinoma [(52, 53)].

Iz navedenog možemo zaključiti da je uloga TLR-a u nastanku i liječenju tumorskih bolesti dvojaka. Stimulacija pojedinog TLR-a može dovesti do inducirane smrti stanice ali i do veće spodobnosti metastaziranja i progresije bolesti. Stoga je terapiju potrebno prilagoditi vrsti i specifičnostima pojedinog tumora. Jedan od pristupa budućnosti bio bi karakterizacija stanica tumora svakog pacijenta, pri čemu bi se odredio ekspresijski profil TLR-a i mogući učinak terapije na tumor. Također treba uzeti u obzir sposobnost agonista da djeluju na stanice imunosnog sustava koje su prisutne u tumorskom okruženju [(54)].

2.3.1. Sintetski modulatori za TLR3

Brojne sintetske molekule koje su agonisti TLR-a se istražuju ili već primjenjuju u terapiji alergija, upala, infekcija ili tumora. Primjer sintetskog agonista za TLR3 u terapiji upale je PIKA, kemijski stabilizirani analog poli(I:C). Pokazano je da intranazalna primjena dovodi do privlačenja intersticijskih makrofaga, neutrofila i pDC-a u pluća, te do povišenja razine TNF-α, IFN-γ, kemoatraktanta za keratinocite i IFN-β. Ove promjene dovode do značajnog smanjenja broja virusa u plućima [(42)].

Također, pokazano je da aktivacija TLR3 sliči virusnoj infekciji pri čemu se mijenja imunološki odgovor, a dišni putovi pokazuju značajke upale, povećane osjetljivosti i bronhospazam. U skladu s navedenim, inhibitori TLR3 se istražuju kao lijekovi za alergije. Sintetski TLR3 inhibitori smanjuju izlučivanje TNF-α, IL-8, TSLP (engl. *thymic stromal lymphopoietin*) u stanicama epitela dišnih putova, imaju bronhodilatacijski učinak, sprječavaju T_H2 tip upale pluća kod primata (nije testirano na ljudima) i infiltraciju upalnih stanica u dišne puteve kod majmuna [(43)].

Poli(I:C) je molekula koja se do sada najviše istraživala u polju liječenja zaraznih bolesti i tumora. Rezultat djelovanja poli(I:C) je aktivacija DC-a i usmjeravanje NK prema ubijanju stanica tumora. U ispitivanjima na glodavcima dokazano je da produžava preživljenje jedinki koje imaju tumor. Čini se da je terapeutski učinak poli(I:C) posljedica poticanja proizvodnje protutijela, međusobne aktivacije stanica te stimulacije protutumorskih $CD8^+$ stanica i antigen specifičnih $CD4^+$ stanica. Poli(I:C) je jedan od najjačih sintetskih pobuđivača proizvodnje IFN tipa I, koji je važan za sazrijevanje DC stanica i razvoj imunosnog odgovora posredovanog $CD4^+$ T stanicama [(44)]. S gledišta antitumorske terapije, važno je svojstvo poli(I:C) da aktivacijom TLR3 u stanicama T omogućava diferencijaciju u memorijske stanice bez kostimulacije posredovane APCima i CD4 biljegom, a upravo je

nedostatak kostimulacijskih signala svojstvo tumorskog okruženja. Nadalje, aktivacija TLR3 na velikom broju različitih tumorskih stanica dovodi do stanične smrti. Objavljeni su rezultati istraživanja na humanim stanicama karcinoma ždrijela, hepatocelularnog karcinoma, primarnog karcinoma pluća nemalih stanica, karcinoma prostate i melanoma. Stimulacijom humanih mijeloma stanica u kulturi uočena je povećana apoptoza, povećano izlučivanje IFN tipa I i usporen rast stanica. IFN tipa I može usmjeriti imunosni odgovor u T_H1 smjeru i na taj način pojačati protutumorsko djelovanje. TLR3 aktivacija također može utjecati i na migracijska svojstva stanica karcinoma [(54)].

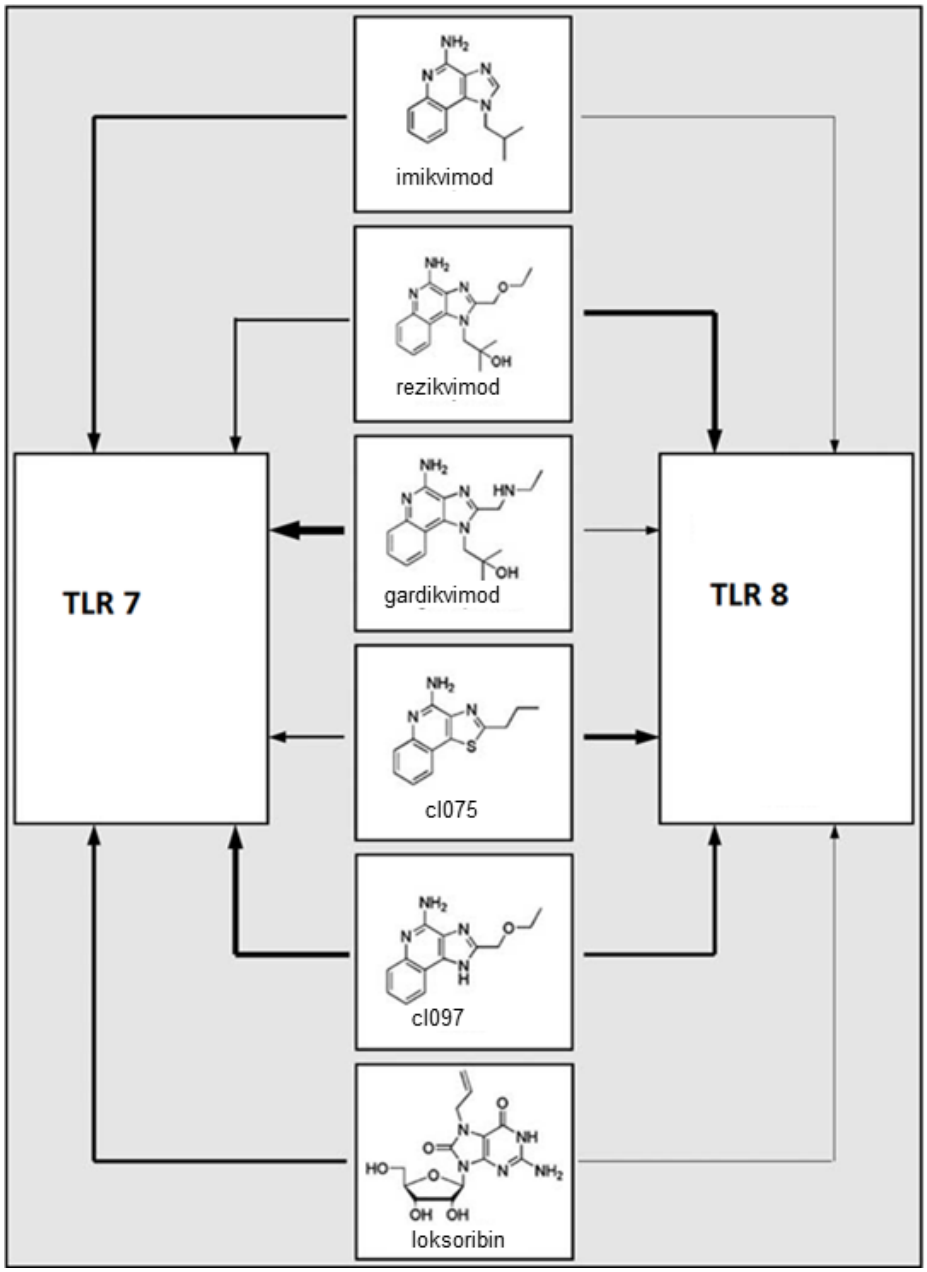
2.3.2. Sintetski modulatori za TLR7/8

Imikvimod se istaknuo tijekom istraživanja antitumorskog djelovanja malih molekula iz porodice imidazokinolina. Imidazokinolini su agonisti TLR7 i TLR8. FDA (*Food and Drug Administration*) je 1997. godine odobrio primjenu imikvimoda u liječenju genitalnih bradavica. Na životinjskom modelu je pokazano da pri infekciji herpes simplex virusom-2 (HSV-2) intravaginalna primjena imikvimoda smanjuje učestalost nastanka lezija. Osim protuvirusnog djelovanja imikviod se koristi i u terapiji karcinoma, posebice kod karcinoma bazalnih stanica koji je uzrokovan humanim papiloma virusom [(42)]. Imikvimod (R837, 1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-4-amin), je analog nukleotida, relativne molekularne mase 240,3, za kojeg se pokazalo da jače aktivira TLR7 u odnosu na TLR8 (slika 7). Stimulacija stanica koje izražavaju TLR7 i TLR8 dovodi do aktivacije transkripcijskog čimbenika NF-κB i posljedične proizvodnje IFN-α, TNF-α, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, G-CSFa, GM-CSFa, CCL3, CCL4, CCL2 [(55, 56)]. Imikvimod također modulira i STAT-1 (engl. si*gnal transducer and activator of transcription 1*) signalne putove što dovodi do povećanja proizvodnje proupalnih citokina i pokretanja apoptoze u različitim tipovima stanica. Ovaj učinak temelji se na povećanju ekspresije „*death*“ receptora CD95 i smanjenju ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2 [(34)]. Nedavno je dokazano da lokalna primjena TLR7 agonista posreduje pri sustavnim promjenama i mijenja sastav stanica i citokina u dišnom sustavu. Kod miševa liječenih imikvimodom došlo je do smanjenja broja alveolarnih makrofaga, B stanica i proizvodnje TNF-α, uz istovremeno povećanje broja DC-a i NK stanica u plućima te povećanje IL-10 [(43)].

Rezikvimod (R848, Mr=314,4, 4-amino-2-(etoksimetil)-a,a-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]kinolin-1-etanol)), također iz porodice imidazokinolina, je aktivator TLR7 i TLR8 koji dovodi do pojačane proizvodnje citokina, aktivacije makrofaga i izraženije stanične imunosti u odnosu na imikvimod (slika 6) [34]. Kod sustavne primjene rezikvimoda (na mišjem modelu astme) uočeno je zaustavljanje pregradnje dišnih putova, smanjenje akutne astme i usmjeravanje upalnog odgovora u T_H1 smjeru. Sve to rezultiralo je dugotrajnom zaštitom od astme u eksperimentalnom modelu [43].

Gardikvimod (imidazokinolin, Mr=313,4) preko TLR7 aktivira NF-κB (oko deset puta snažnije u odnosu na imikvimod) (slika 7). U visokim koncentracijama aktivira TLR8. CL075 (3M-002, derivat tiozolokinolona, Mr=243,3), koji se inače smatra TLR8-specifičnim agonistom aktivira mijeloidne DC, monocite i monocitne DC te dovodi do povećanja proizvodnje proupalnih citokina i kemokina, posebice TNF-α, IL-12 i MIP-1α (CCL3) (slika 7). U humanim perifernim mononuklearnim stanicama krvi pokreće proizvodnju TNF-α i IL-12 preko TLR8. Molekula 3M-001 (imidazokinolin) je specifični TLR7 agonist (slika 7). Aktivira pDC, B stanice i monocite te dovodi do povećanja proizvodnje IFN-α i interferonom reguliranih kemokina – I-TAC (CXCL11), IP-10 (CXCL10). Loksoribin (L-nukleozid, derivat gvanozina, Mr=339,3) uglavnom djeluje na imunonosni sustav preko TLR7 (slika 7).

Djelovanje imidazokinolinskih agonista TLR7 i TLR8 moguće je modulirati dodatkom modificiranih ODN-a pri čemu se smanjuje aktivacija TLR7, a pojačava aktivacija TLR8 [34].



Slika 7. Sintetski agonisti TLR7/8. Debljina strelica označava intenzitet stimulacije. Preuzeto i prilagođeno prema ref. M.P. Schön i M. Schön [34].

2.3.3. Sintetski modulatori za TLR9

Djelovanje sintetskih TLR9 liganada (CpG ODN) na infekciju proučavano je na Balb/c miševima zaraženim parazitom *Leishmania major*. Lišmanioza je smrtonosna infekcija koju karakterizira T_H2 imunološki odgovor, predominantna aktivacija limfocita B i proizvodnja protutijela koja posreduju pri uklanjanju patogenog parazita. Primjenom CpG ODN-a u terapiji dolazi do promjene imunosnog odgovora, do skretanja prema T_H1 reakciji i aktivacije antigen specifičnih $CD8^+$ citolitičkih T stanica. *In vitro* je uočeno da CpG oligonukleotidi koji

imitiraju bakterijsku DNA aktiviraju APC, podižu ekspresiju B7-1 i B7-2 staničnih biljega, te povećavaju izlučivanje TNF-α, IL-1, IL-6 i IL-12 [42, 57]. U mišjem modelu astme, sintetski TLR9 agonisti u dišnim putovima djeluju tako da smanjuju eozinofiliju i proizvodnju IL-4, IL-5 i IgE, a povećavaju razinu IL-10 u bronhoalveolarnom ispirku. Nadalje, inhibiraju razgradnju epitela dišnih putova na način da smanjuju aktivnost metaloproteinaza. CpG ODN- i povećavaju učinkovitu predodžbu antigena. TLR9 ligandi smanjuju respiratorne alergije tako što dovode do tolerancije na pelud ili fungalne alergene nakon subkutane primjene ili nakon izlaganja sluznice. Djeluju profilaktički i terapijski kod postojećih i novonastalih astma/alergijskih rinitisa i imaju dugoročno djelovanje, neovisno o dobi. Na žalost kod postojećih teških alergijskih upala dišnih putova, terapija CpG ODN nije dovela do smanjenja T_H2 odgovora niti do smanjenja AHR-a (engl. *airway hyperresponsiveness*). Isti raspon djelotvornosti može se uočiti i kod djece [43].

CpG oligonukleotidi su u terapiji tumora do sada testirani na ljudima kao monoterapija ili kao dodatak kemoterapiji. Neovisno o načinu primjene nisu pokazali dovoljnu učinkovitost. Klinička ispitivanja u ranoj fazi I pokazala su da se CpG ODN vrlo dobro podnose u dozama koje dovode do aktivacije stanica NK, podizanja razine proupalnih citokina i smanjenja broja T_{reg} stanica u odvodnim limfnim čvorovima. U skladu s navedenim opažanjem terapija TLR9 agonistima se dodaje uz terapiju peptidima ili proteinima koji imaju svojstva antigena [44]. Nekoliko istraživanja je pokazalo da aktivacija TLR9 na $CD4^+$ T stanicama produljuje njihovo vrijeme života, pa tako i njihovo protutumorsko djelovanje. Zanimljiv zaključak je dobiven nakon stimulacije $CD4^+$ T stanica štakora s CpG ODN; stanice su slabije odgovarale na supresivne signale koje su dobivale od T_{reg} stanica. Ovo opažanje je značajno, kada se zna da T_{reg} stanice imaju ulogu u pomaganju rasta tumora. Aktivacija s TLR9 ligandom također povećava broj $CD4^+$ i $CD8^+$ T stanica tako što povećava ekspresiju IL-2 i IL-2 receptora. Za aktivaciju preko TLR9 nije potreban kostimulacijski signal, što je također važno u tumorskom okruženju. Aktivacija TLR9 na mišjim $CD4^+$ T stanicama također je povezana sa smanjenjem apoptoze nastale nakon radijacije γ zrakama i sa povećanom brzinom popravka DNA. Nadalje, opaženo je da pri aktivaciji TLR9 na stanicama tumora može doći do dvojakog odgovora. Tako na humanim glioma stanicama aktivacija dovodi do smanjenja proliferacije i povećanja osjetljivosti na toksične učinke radijacijske terapije, ali i na povećanje invazivnosti. Pozitivni učinci su svakako antiproliferativno i proapoptotsko djelovanje [54].

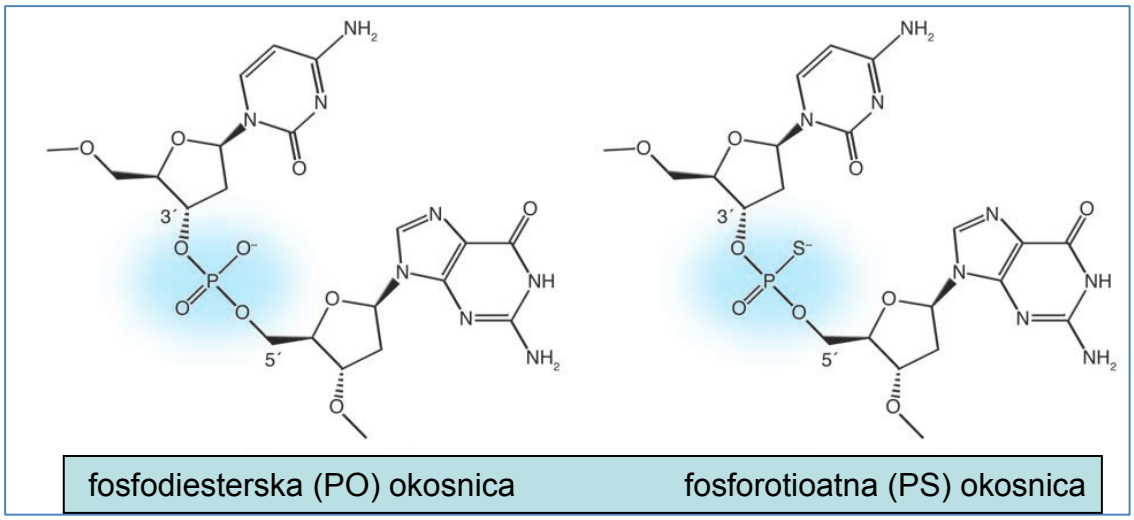
Tablica 1. Klase ODN-a - Velika slova u ODN slijedovima označavaju 3'-PS veze, mala slova u ODN slijedovima označavaju 3'-PO veze, podvučeno označava palindrome; masna slova označavaju CpG motive za koje se smatra da najviše doprinose imunosnoj stimulaciji; PO – fosfodiester; PS - fosforotioat [58]

Klasa ODN-a	Primjer	Strukturna svojstva	Imunološki učinci
A (inducira IFN-**α**). naziva se i D tip	GGgggac**g**at**cg**tcgGGGGG (ODN 2216)	Poli G regija na 3'- ili/i 5'-krajevima, obično su PS modificirane veze između nukleotida na 3'- i 5'-krajevima da bi se postigla otpornost na djelovanje nukleaza; centralni dio ODN-a u kojem su CpG motivi mora imati PO veze	Inducira snažnu sekreciju IFN-α kod pDC-a i umjerenu sekreciju kostimulacijskih molekula; Inducira slabu aktivaciju B stanica
B (aktivira **B** stanice) naziva se i K tip	T**CG**T**CG**TTTTGT**CG**TTTTGT**CG**TT (CPG 7909 ili PF-3512676 ili ODN 2006)	Cijela okosnica ima PS modifikaciju; nema značajne sekundarne strukture; na 5'-kraju se nalazi CpG motiv koji je važan za stimulaciju humanog TLR9	Vrlo snažno inducira proliferaciju i diferencijaciju B stanica Inducira ekspresiju kostimulacijskih molekula na pDC-ima i skromnu sekreciju IFN-α
C (engl. ***c****ombined activities* – kombinirana djelovanja)	T**CG**T**CG**TTTTCGGCGCGCGCCG (ODN 2395)	Cijela okosnica ima PS modifikaciju; na 5'-kraju nalazi se jedan ili više CpG motiva, palindrom u sredini ili na 3'-kraju omogućava formiranje dupleksa ili strukture ukosnice	Snažno inducira proliferaciju i diferencijaciju B stanica Inducira sekreciju IFN-α i ekspresiju kostimulacijskih molekula na pDC-ima

Sintetski ligandi za TLR 9 dijele se u tri skupine; na DNA koja sadržava CpG slijedove, na DNA koja ih ne sadržava i na ligande koji ne sadržavaju DNA. DNA koja sadrži CpG slijedove oponaša bakterijsku ili virusnu DNA. Originalni CpG motiv unutar imunostimulacijskog oligonukleotida (CpG ODN) je heksamer koji se sastoji od centralnog CpG dinukleotida okružen purinima na 5'-kraju i pirimidinima na 3'-kraju. Postoje tri glavne klase strukturno i fenotipski različitih CpG ODN-a (Tablica 1.). ODN-i klase A imaju poli G slijedove na 5'- i/ili 3'- kraju, u kojima su gvanozini povezani fosforotioatnim vezama (slika 8). Takvi dijelovi tvore strukture višeg reda – G tetrade, dok se u središnjem dijelu nalaze fosfodiesterski vezani CpG motivi. ODN-i klase A, kao posljedica navedenog slijeda odnosno

strukture, formiraju kompleksne strukture. ODN-i iz skupine B imaju sve fosforotioatne veze u okosnici i ne tvore kompleksne strukture višeg reda, međutim moguće ih je prisiliti na stvaranje viših struktura pri čemu mijenjaju biološku aktivnost i ponašaju se kao ODN-i iz skupine A [59]. Jedistvena struktura ODN-a klase C, CpG na 5'-kraju i palindromski slijed na 3'-kraju, omogućava nastanak dupleksa u endosomima i vezanje na TLR9.

Istraživanje na stanicama humanih PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) i stanicama slezene iz miševa pokazalo je da kod fosforotioatnih ODN-a klase B različite vrste prepoznaju različiti nukleotidni slijed; razlikuju se slijedovi koje prepoznaju mišje i ljudske imunosne stanice. Ako iste stanice stimuliramo ODN-om klase B koji ima fosfodiestersku okosnicu nije zamjećena specifičnost u odnosu na slijed [60-62].



Slika 8. Okosnice nativne i modificirane DNA: Supstitucijom kisikovog atoma sumporom povećana je *in vivo* stabilnost ODN-a, vrijeme poluživota je produženo sa nekoliko minuta na dva dana. Preuzeto i prilagođeno prema ref. Krieg [58]

U Tablici 2. navedeni su TLR 9 ligandi: DNA koja ne sadrži CpG motive i ligandi koji ne sadrže DNA [63].

Tablica 2. TLR9 ligandi koji ne sadrže CpG motive

DNA koja ne sadrži CpG motive	
ODN 1668GC	5'-TCCATGACGTTCCTGATGCT
NAOS-1	5'-GCTCATGAGCTTCCTGATGCTG
AP-1	5'-GCTTGATGACTCAGCCGGAA
PD-AT-bogati sljedovi	
AT5ACL	5'-TATAATTTTTACCAACTAGC
LGAT243	5'-TTAACAATTTTTACCCAAGA
PS-T-bogati sljedovi	
ODN 1982	5'-T∗C∗C∗A∗G∗G∗A∗C∗T∗T∗C∗T∗C∗T∗C∗A∗G∗G∗T∗T
PD-IC- bogati sljedovi	
IC31	5'-ICICICICICICICICICICIC
TLR 9 ligandi koji ne sadržavaju DNA	
Hemozoin (hem polimer)	
Hemozoin + genomska DNA plazmodiuma	

∗ označava fosforotioatnu vezu, AT-bogati sljedovi su podvučeni

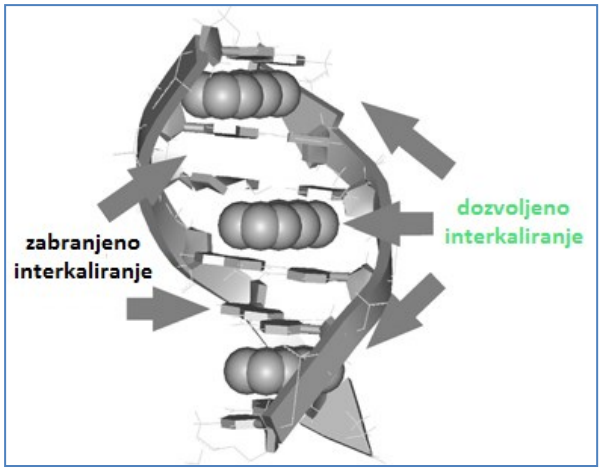
2.4. Fenantridini i načini međudjelovanja s nukleinskim kiselinama

2.4.1. Načini međudjelovanja malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama

Ravnotežna međudjelovanja (nastaju nekovalentni kompleksi) malih organskih molekula i nukleinskih kiselina u otopini mogu se podijeliti u tri osnovna tipa: interkaliranje, elektrostatsko međudjelovanje i vezanje u mali utor dvolančanih uzvojnica DNA ili RNA. Elektrostatsko međudjelovanje nastaje između polikationskih molekula i negativno nabijenih fosfata iz okosnice polinukleotida. Utor–vezujući spojevi vežu se u manji utor dvostruke uzvojnice RNA ili DNA. Raspored pozitivnih naboja utor-vezujućih molekula omogućava međudjelovanje s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida dok oblikom molekula odgovara obliku utora dvostrukih uzvojnica DNA i RNA. Općenito, vezanje u mali utor karakterizira specifičnost prema slijedu za razliku od interkaliranja i elektrostatskih međudjelovanja [64].

Interkaliranje je umetanje planarnih aromatskih molekula između parova baza unutar DNA ili RNA (slika 9). Dvolančani i neki jednolančani polinukleotidi u vodenim otopinama tvore helikalne strukture. Vrlo stabilne helikalne strukture nastaju zahvaljujući, najvećim

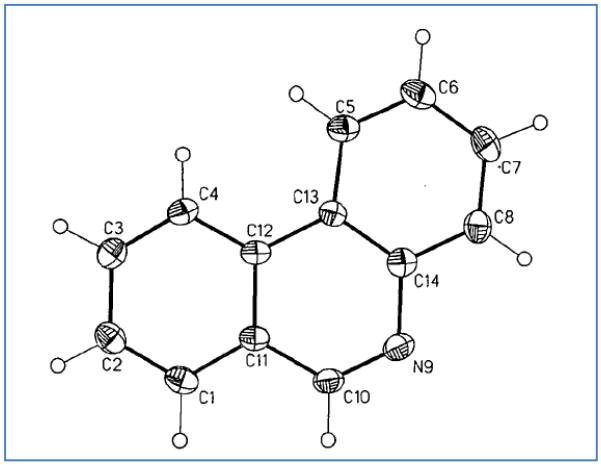
dijelom, aromatskim međudjelovanjima između baza. Interkaliranje značajno stabilizira i ukrućuje nukleotidni lanac te produljuje, deformira i odvija uzvojnicu. Prema dosadašnjim istraživanjima, jedna od karakteristika interkaliranja je princip "isključenja susjeda". Ovaj princip kaže da se aromatske molekule ne mogu interkalirati između dva uzastopna susjedna para baza [64].



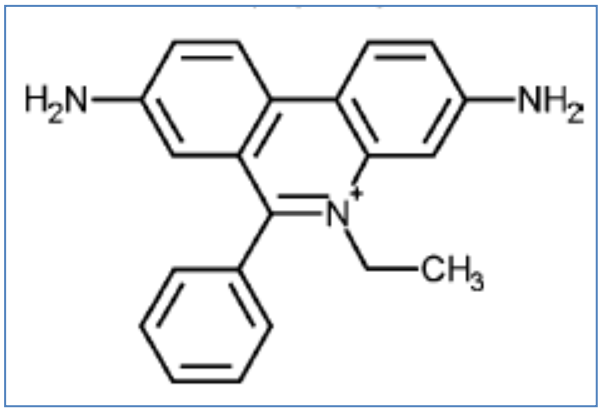
Slika 9. Prikaz interkaliranja i principa "isključenja susjeda". Preuzeto i prilagođeno prema ref. Piantanida [64].

2.4.2. Fenantridini

Fenantridini su heterociklički aromatski ugljikovodici, sastoje se od dva benzenska i jednog piridinskog prstena (slika 10). Najpoznatiji derivat fenantridina je 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinijev bromid, etidij-bromid (slika 11).



Slika 10. Struktura molekule fenantridina. Preuzeto i prilagođeno prema ref. Brett, Rademacher i Boese [65].



Slika 11. Struktura molekule etidij-bromida. Preuzeto i prilagođeno prema ref. Horowitz i Hud [66].

Etidij-bromid sintetiziran je 1952. godine i korišten je kao lijek za tripanosomijazu (*Trypanosoma brucei*) – bolest spavanja. Etidij-bromid se koristi u laboratorijima kao uobičajena boja za dvolančanu DNA i RNA. Također, ima poznato protutumorsko, protuvirusno i protuparazitsko djelovanje [67-71]. Međutim, primjena etidij-bromida u liječenju ljudi onemogućena je zbog mutagenog djelovanja u modelnim sustavima. Ipak, aktivna tvar se i dalje koristi u veterinarskoj medicini za liječenje tripanosomijaze goveda [72].

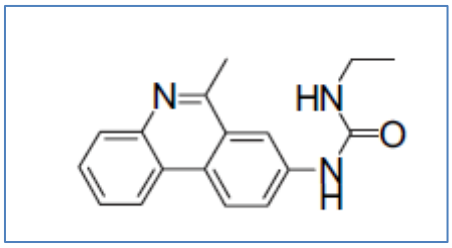
Biološka aktivnost molekule najvjerojatnije je posljedica vezanja na nukleinske kiseline. Etidij-bromid se veže na dvolančane DNA i RNA u ovisnosti o ionskoj jakosti okoline. Pri niskoj ionskoj jakosti veže se elektrostatskim međudjelovanjima na površinu nukleinskih kiselina, dok pri višim vrijednostima ionske jakosti (fiziološki uvjeti) interkalira između parova baza. Antivirusno djelovanje etidija, na primjeru virusa HIV-a, temelji se na inhibiciji osnovnih faza životnog ciklusa virusa kao što su inhibicija reverzne transkripcije, sinteze RNA, sinteze proteina, pakiranja virusa i niza drugih [73]. Na primjer, antiparazitsko djelovanje u slučaju infekcije parazitom *Trypanosoma brucei* temelji se na inhibiciji sinteze DNA (interkaliranjem između parova baza u DNA) i selektivnoj linearizaciji male kružne DNA u mitohondrijima *T. brucei* [74].

Tijekom povijesti, struktura etidij-bromida mijenjala se u svrhu povećanja afiniteta za DNA i ciljanog vezanja na određene nukleotidne slijedove [75-77]. Međutim, povećanjem afiniteta se u većini slučajeva povećava toksičnost i mutagenost. Prve modifikacije molekule etidij-bromida odnosile su se na varijacije alkilnog lanca, naime uvođene su metilna, propilna i druge grupe, umjesto etilne. Egzociklički amini etidija supstituirani su drugim grupama, sa svrhom smanjenja afiniteta prema DNA i posljedičnog smanjenja mutagenosti [73].

Kod molekula koje imaju sposobnost vezanja na površinu DNA i RNA očekuje se povećanje afiniteta vezanja uvođenjem dodatnog pozitivnog naboja. Stoga su sintetizirani gvanidino i urea derivati etidija, pri čemu su dvostruko pozitivno nabijeni gvanidino derivati imali manji afinitet vezanja za dvolančanu DNA u odnosu na urea derivate. Različiti urea derivati etidija imali su širok raspon afiniteta vezanja prema DNA i pokazivali su različite modele vezanja (površinsko i interkaliranje) [73].

2.4.3. 1-Etil-3-(6-metilfenantridin-8-il)urea – M-199

Molekula M-199, kemijskog naziva 1-etil-3-(6-metilfenantridin-8-il)urea do sada je analizirana u smislu vezanja na dvolančane DNA i RNA (slika 12). Prema spektroskopskoj karakterizaciji molekule M-199, nije primjećeno da dolazi do molekularnih međudjelovanja ili agregacije u otopini, pri koncentracijama od 1 μmol dm^{-3} do 10 μmol dm^{-3}.



Slika 12. Struktura molekule M-199. Preuzeto i prilagođeno prema ref. Radić Stojković i Piantanida [78].

Dodatak poli A–poli U i poli dA–poli dT uzrokovao je snažno povećanje fluorescencije dok je dodatak ct-DNA (engl. *calf thymus DNA*) i poli G–poli C doveo do značajnog gašenja fluorescencije. Eksperimentima termalne denaturacije utvrđeno je da M-199 učinkovitije stabilizira dvolančanu RNA u odnosu na dvolančanu DNA. Slabiji stabilizacijski učinak na poli dA–poli dT u odnosu na ct-DNA vjerojatno je posljedica posebne uvijene strukture poli dA–poli dT koja se treba izrazito odviti da bi došlo do interkaliranja. Pri izvođenju spektroskopskih analiza koje se temelje na cirkularnom dikroizmu, dodatak M-199 u otopine polinukleotida (ct-DNA, poli A–poli U) doveo je do pada intenziteta CD spektara navedenih polinukleotida. Također, zapažen je pozitivni inducirani CD spektar (ICD) na valnoj duljini većoj od 300 nm koji govori u prilog tomu da je duža os fenantridinske jedinice približno okomita na dužu os parova nukleobaza, ali je u ravnini sa slijedećim parom baza. Takvi rezultati u skladu su sa voluminoznim skupinama uree koje su vezane na položaj 8 na

fenantridinskom prstenu. Zbog toga je manje vjerojatna orijentacija kod koje bi duža os fenantridinske jedinice bila paralelna s dužom osi para nukleobaza [78].

Na temelju rezultata ispitivanja vezanja molekule M-199 na dvolančane DNA i RNA može se zaključiti da je interkaliranje glavni način vezanja na polinukleotide. Eksperimentima temperaturnog mekšanja utvrđeno je da M-199 stabilizira dvolančane RNA i DNA, dok je tijekom fluorimetrijskih titracija zabilježen visok afinitet vezanja M-199 na ispitivane polinukleotide. Konačno su u prilog interkaliranja, kao načina međudjelovanja s polinukleotidima, poslužili i rezultati CD titracije gdje je uočen slabi pozitivni ICD (inducirani CD) spektar [78].

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Ispitanici

U ovom istraživanju korišteni su uzorci krvi dobrovoljnih davatelja. Uzorci krvi su prikupljeni u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Odjel za promidžbu i uzimanje krvi, u Zagrebu. Svi ispitanici bili su informirani o provedenom istraživanju i dali su pisani pristanak za izolaciju i analizu perifernih mononuklearnih stanica iz uzoraka krvi i provođenje predloženih pokusa.

3.2. Izolacija perifernih mononuklearnih stanica iz krvi čovjeka

Aparatura:

- centrifuga (Eppendorf, Njemačka)

Pribor:

- BD Vacutainer epruvete (Becton Dickinson Plymouth, UK)
- sterilne pipete (TPP, Švicarska)
- sterilne konične tube Falcon, 50 ml (Thermo Fischer Scientific, SAD)

Kemikalije:

- Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, SAD)
- fiziološka otopina (Natrii chloridi infundibile, otopina za infuzija, sterilna, apirogena, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska)
- RPMI medij (RPMI 1640 *medium*, GIBCO, Nizozemska)
- FBS (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- ODN 2006 (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ODN 2216 (Sigma Aldrich, Njemačka)

- R848 (Axxora Enzo Life Sciences, SAD)
- LPS (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Poli(I:C) (InvivoGen, SAD)

Postupak:

Periferne mononuklearne stanice iz krvi izolirane su metodom centrifugiranja u gradijentu gustoće u Ficoll-Paque prema komercijalnom protokolu MACS, Miltenyi Biotec. Puna krv je skupljena u BD Vacutainer epruvete obložene heparinom (ukupno 15 mL krvi). U 50 mL tube dodana je svježa krv i fiziološka otopina u omjeru 1:3. Otopina stanica (35 mL) nadslojena je na 15 mL Ficoll-Paquea u koničnoj tubi volumena 50 mL. Centrifugirano je 40 minuta pri 400 g, bez kočnica, na rotoru s pokretnim spremnicima, na sobnoj temperaturi. Središnji sloj, u kojem se nalaze mononuklearne stanice (limfociti, monociti, trombociti) pažljivo je prenesen u novu koničnu tubu volumena 50 mL, dodana je fiziološka otopina do vrha, pomiješano je i centrifugirano 10 minuta pri 300 g, na sobnoj temperaturi. Supernatant je bačen, ponovno je dodana fiziološka otopina do 50 mL, pomiješano je i centrifugirano 15 minuta pri 200 g, na sobnoj temperaturi. Zadnji korak je ponovljen kako bi se do kraja uklonili trombociti. Talog stanica resuspendiran je u mediju RPMI 1640 obogaćenom s 10% seruma fetusa goveda, FBS-a (engl. *fetal bovine serum*) i 1% L-glutamina

U radu sa perifernim mononuklearnim stanicama korišteni su sljedeći sintetski ligandi: ODN 2006, ODN 2216, R848, LPS i Poli(I:C).

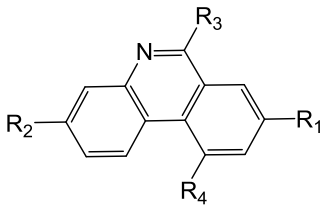
3.3. Derivati fenantridina

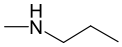
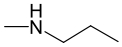
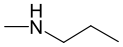
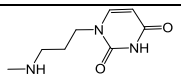
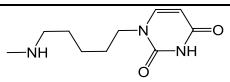
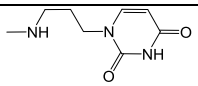
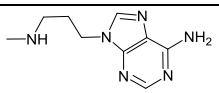
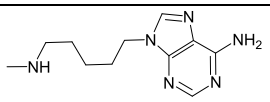
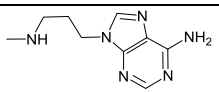
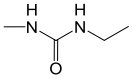
U ovom istraživanju korišteno je sedamnaest različitih derivata fenantridina sintetiziranih na Institutu Ruđer Bošković, u Zavodu za organsku kemiju i biokemiju. U Tablici 3. navedeni su oznake spojeva i koncentracije matičnih otopina u dimetil-sulfoksidu (DMSO). U Shemi 1. navedene su struktura, molekularna masa i kemijska formula pojedinog derivata.

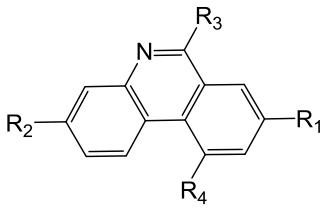
Tablica 3. Oznake testiranih derivata fenantridina i koncentracije njihovih matičnih otopina

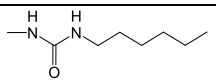
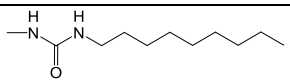
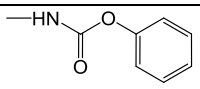
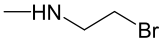
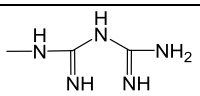
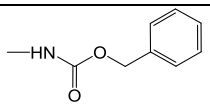
Oznaka	Koncentracija matične otopine
FL	20 mmol dm^{-3}
DL	20 mmol dm^{-3}
FC3U	20 mmol dm^{-3}
FC5U	20 mmol dm^{-3}
DU	20 mmol dm^{-3}
FC3A	20 mmol dm^{-3}
FC5A	20 mmol dm^{-3}
DA	20 mmol dm^{-3}
M-199	40 mmol dm^{-3}
M-197	40 mmol dm^{-3}
M-198	40 mmol dm^{-3}
M-150	40 mmol dm^{-3}
M-46	40 mmol dm^{-3}
M-182	20 mmol dm^{-3}
M-113	40 mmol dm^{-3}
A170F	20 mmol dm^{-3}
X-218	20 mmol dm^{-3}

Shema 1. Strukture i molekularne mase testiranih derivata fenantridina



Oznaka spoja	R1	R2	R3	R4	*M*r, formula
FL		—H	—CH_3	—H	$C_{17}H_{18}N_2$ 250,3
DL			—CH_3	—H	$C_{20}H_{25}N_3$ 307,4
FC3U		—H	—CH_3	—H	$C_{21}H_{20}N_4O_4$ 360,4
FC5U		—H	—CH_3	—H	$C_{23}H_{24}N_4O_2$ 388,5
DU		R1=R2	—CH_3	—H	$C_{28}H_{29}N_7O_4$ 527,6
FC3A		—H	—CH_3	—H	$C_{22}H_{21}N_7$ 383,5
FC5A		—H	—CH_3	—H	$C_{24}H_{25}N_7$ 411,5
DA		R1=R2	—CH_3	—H	$C_{30}H_{31}N_{13}$ 573,6
M-199		—H	—CH_3	—H	$C_{17}H_{17}N_3O$ 279,3



Oznaka spoja	R1	R2	R3	R4	*M*r, formula
M-197		—H	—CH_3	—H	$C_{21}H_{25}N_3O$ 335,4
M-198		—H	—CH_3	—H	$C_{24}H_{31}N_3O$ 377,5
M-150		—H	—CH_3	—H	$C_{21}H_{16}N_2O_2 \cdot H_2O \cdot$ HCl 382,8
M-46		—H	—CH_3	—H	$C_{16}H_{15}BrN_2$ 315,2
M-182		—H	—CH_3	—H	$C_{16}H_{16}N_6 \cdot 2HCl$ 365,3
M-113		—H	—CH_3	—H	$C_{22}H_{18}N_2O_2$ 342,4
A170F		—H	—CH_3	—H	$C_{14}H_9NO$ 207,2
X-218	—H	—H	—H	—NH_2	$C_{13}H_{10}N_2$ 194,2

3.4. Ispitivanje učinka derivata fenantridina na rast stanica u *in vitro* uvjetima primjenom metil-tiazolil-tetrazolij (MTT) testa

Aparatura:

- čitač mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska)

Pribor:

- mikrotitarske pločice sa 96 jažica (Greiner, Njemačka)
- sterilni nastavci i odgovarajuće pipete (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne plastične posude (TPP, Švicarska)

Kemikalije i biološki materijal:

- 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolij-bromid) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- dimetil-sulfoksid (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- HEK293 stanice, (ATCC, SAD)
- DMEM medij (Sigma-Aldrich, UK)
- FBS (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- penicilin (Life Technologies, SAD)
- streptomicin (Life Technologies, SAD)

Postupak:

MTT test koristi se za određivanje utjecaja testirane molekule na inhibiciju rasta stanica. U testu se određuje aktivnost sukcinat-dehidrogenaze u mitohondrijima živih stanica. Aktivna sukcinat-dehidrogenaza reducira žutu tetrazolijsku komponentu ((3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolij-bromid) MTT) u netopljivi ljubičasti formazan. U precipitat se dodaje dimetil-sulfoksid (DMSO) nakon čega se određuje optička gustoća (apsorbancija na valnoj duljini 570 nm) koja je direktno proporcionalna broju živih stanica.

Test je izveden na humanoj staničnoj kulturi HEK293 (stanice bubrega embrija čovjeka). HEK293 stanice uzgajane su u monosloju u tekućoj podlozi DMEM (od engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), obogaćenoj s 10% seruma fetusa goveda, FBS-a (engl.

fetal bovine serum). U podlogu je dodan 2 mmol dm^{-3} L-glutamin, te 100 U/mL penicilina i 100 μg/mL streptomicina (Life Technologies, SAD). Stanice su uzgajane u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5% CO_2 na 37 °C, u sterilnim plastičnim posudama.

Na mikrotitarske pločice sa 96 jažica nasađeno je 1 x 10^4 stanica/mL. Stanice su inkubirane 72 sata sa fenantridinskim derivatima koji su testirani. Nazivi spojeva i matične koncentracije navedeni su u poglavlju 3.1.. U MTT testu spojevi su testirani u desetorostrukim razrjeđenjima u pet različitih koncentracija od 10 nmol dm^{-3} do 100 μmol dm^{-3}. Nakon inkubacije, uklonjen je supernatant i dodana je otopina MTTa 20 μg/40 μL. Nakon 4 sata inkubacije dodano je 160 μL DMSOa te je na čitaču mikrotitarskih pločica očitana apsorbancija na valnoj duljini 570 nm. Mjerenje u svakoj točki izvedeno je četiri puta, izvedena su dva odvojena eksperimenta.

Također je testirano otapalo (DMSO), tako da mu je prilagođena koncentracija u mediju za uzgoj stanica i mjerena je optička gustoća stanica koje nisu izložene djelovanju testiranih molekula nakon 72 sata od nasađivanja na mikrotitarske pločice.

Cilj ovog testa je odrediti stanični rast neposredno prije (0. sat) i 72 sata nakon obrade s kemijskim spojevima.

Rezultati su izraženi kao GI_{50}, koncentracija spoja potrebna za 50% inhibicije rasta stanica. Svaki rezultat je srednja vrijednost mjerenja u dva odvojena eksperimenta.

Preživljenje stanica (PG, engl. *percentage of growth*) određuje se pomoću krivulja rasta, a izračunava pomoću sljedećih izraza:

Ako je: $(\text{sr.vr. } OD_{test} - \text{sr.vr.}OD_{tzero}) \geq 0$, tada je:

$PG = 100 \text{ x } (\text{sr.vr. } OD_{test} - \text{sr.vr.}OD_{tzero}) / (\text{sr.vr. } OD_{ctrl} - \text{sr.vr.}OD_{tzero})$

Ako je: $(\text{sr.vr. } OD_{test} - \text{sr.vr.}OD_{tzero}) < 0$, tada je:

$PG = 100 \text{ x } (\text{sr.vr. } OD_{test} - \text{sr.vr.}OD_{tzero}) / \text{sr.vr.}OD_{tzero}$

Gdje je:

sr. vr. OD_{tzero} = srednja vrijednost mjerenja optičkih gustoća prije izlaganja stanica ispitivanom spoju (0. sat);

sr. vr. OD_{test} = srednja vrijednost mjerenja optičkih gustoća nakon izlaganja stanica ispitivanom spoju (72 sata);
sr. vr. OD_{ctrl} = srednja vrijednost mjerenja optičkih gustoća stanica koje nisu izlagane ispitivanom spoju, nakon 72 sata.

Vrijednost GI_{50} izračunali smo iz krivulje ovisnosti o dozi, pomoću linearne regresijske analize testiranih koncentracija za PG vrijednosti ispod i iznad referentne vrijednosti (50 za GI_{50}).

Ako su u testiranoj staničnoj liniji svi rezultati na testiranim koncentracijama iznad referentne vrijednosti, tada je rezultat izražen kao najviša testirana koncentracija i označeni su simbolom ">" ispred vrijednosti koncentracije.

Mjerenjem negativnog rasta koji se odnosi na dio krivulje ispod nule možemo razlikovati citotoksični od inhibicijskog učinka.

3.5. ELISA test

Aparatura:

- čitač mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska)

Pribor:

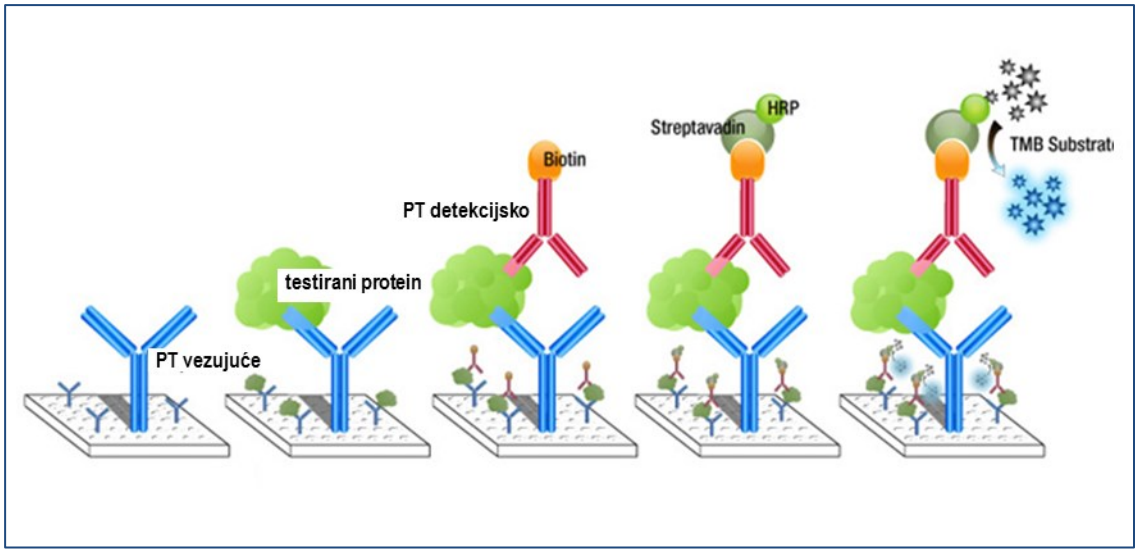
- mikrotitarske pločice sa 96 jažica (Greiner, Njemačka)
- odgovarajuće pipete i nastavci (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije:

- Human IL-6, IL-8, IL-1β, IFN- α i TNF-α ELISA Ready-SET-Go komplet (eBiosciences, SAD)

Postupak:

ELISA *(engl. enzyme linked immunosorbent assay)* je metoda određivanja koncentracije proteina pomoću obilježenih protutijela. U ovom radu korišteni su komercijalno dostupni ELISA kompleti za određivanje koncentracije humanih IL-6, IL-8, IL-1β, IFN- α i TNF-α u navedenim eksperimentalnim uvjetima (Human IL-6, IL-8, IL-1β, IFN- α i TNF-α ELISA Ready-SET-Go; eBiosciences, SAD).



Slika 12. *Sandwich ELISA* (iz kataloga Epitomics, c-Jun ELISA kit antibody RabMAb).

Sandwich ELISA metoda temelji se na vezanju testiranog poteina između dva protutijela (slika 12). Prvo protutijelo (vezujuće protutijelo) veže se na pločicu nakon čega se na njega veže testirani protein. Nakon vezanja proteina dodajemo drugo protutijelo čiji epitop se nalazi na slobodnom kraju testiranog proteina. U navedenim komercijalnim kompletima sekundarno odnosno detekcijsko protutijelo obilježeno je biotinom. Dodatkom avidina obilježenog peroksidazom iz hrena (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) dolazi do specifične reakcije s biotinom. Dodatkom supstrata za vezani enzim oslobađa se boja. Intenzitet obojenja je proporcionalan koncentraciji testiranog proteina.

Mikrotitarske pločice sa 96 jažica inkubirane su preko noći s otopinom primarnih protutjela (protutjela za vezanje testiranog proteina), pri temperaturi od 4 °C. Nakon prekonoćne inkubacije pločica je isprana tri puta otopinom pufera za ispiranje (dolazi s kompletom). Nakon svakog koraka ponavljali smo ispiranje tri puta, osim u koraku prije dodavanja supstrata kad ispiremo pet puta. Površina jažica blokira se 1 sat otopinom za blokiranje (iz kompleta) na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja nanosimo uzorak koji

inkubiramo 2 sata, također na sobnoj temperaturi. Nakon vezanja uzorka, nanosimo sekundarna protutijela (protutijela za detekciju) te ih inkubiramo 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja dodajemo avidin – HRP. Nakon pola sata inkubacije dodajemo supstrat za peroksidazu – tetrametilbenzidin (TMB). Reakcijom TMB-a i peroksidaze nastaje plavo obojenje. Reakcija se zaustavlja, nakon 15 minuta, dodatkom otopine za zaustavljanje reakcije (1 mol dm^{-3} fosfatna kiselina iz kompleta). Nastaje žuto obojenje otopine. Intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski na 450 nm. Vrijednosti apsorbancije na 570 nm smatraju se šumom i oduzimaju se od A450.

3.6. Rad s kulturama stanica

Aparatura:

- Inkubator Jouan EB 18 (Jouan, Francuska)
- mikroskop

Pribor:

- mikrotitarske pločice sa 24 jažice (Greiner, Njemačka)
- sterilni nastavci i odgovarajuće pipete (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne plastične posude (TPP, Švicarska)

Kemikalije i biološki materijal:

- THP-1 stanice (ATCC, SAD)
- HEK 293 stanice (ATCC, SAD)
- DMEM medij (Sigma-Aldrich, UK)
- RPMI medij (RPMI 1640 *medium*, GIBCO, Nizozemska)
- FBS (Sigma, SAD)
- L-glutamin (Sigma Aldrich, Njemačka)
- penicilin (Life Technologies, SAD)
- streptomicin (Life Technologies, SAD)
- forbol-12-miristat-13-acetat (PMA, Sigma Aldrich, Njemačka)

- ODN 2006 (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ODN 2216 (Sigma Aldrich, Njemačka)
- R848 (Axxora Enzo Life Sciences, SAD)
- Poli(I:C) (InvivoGen, SAD)
- CL097 (InvivoGen, SAD)

Postupak:

U radu su korištene stanične linije THP-1 (monociti iz periferne krvi čovjeka oboljelog od akutne monocitne leukemije) i HEK293 (stanice bubrega embrija čovjeka). HEK293 stanice su uzgajane u tekućoj podlozi DMEM (od engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), obogaćenoj s 10% seruma fetusa goveda, FBS-a (engl. *fetal bovine serum*). Tekuća podloga je sadržavala 1% L-glutamin te 1% penicilina / streptomicina. Stanice su rasle u sterilnim plastičnim posudama u inkubatoru pri 37 °C, uz 5% CO_2 i vlagu. Stanice THP-1 uzgajane su u rasponu koncentracija 0,2 do 0,7 x 10^6 stanica/mL u mediju RPMI 1640 s 10% FBS-a, 1% L-glutamina te 1% penicilina / streptomicina, pri 37 °C, uz 5% CO_2 i vlagu. Obzirom na činjenicu da stanice THP-1 nisu odgovarale na stimulaciju poznatim TLR9 ligandima bilo ih je potrebno diferencirati. Prema literaturnim podacima diferencijacija i sazrijevanje monocita u smjeru makrofaga može se potaknuti nizom reagensa. U ovom radu THP-1 stanice diferencirane su forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA). THP-1 stanice su tijekom diferencijacije kultivirane na pločicama s 24 jažice (1 x 10^5 po jažici) u mediju s PMA (10 ng/mL medija), tijekom 18 sati. Stanice su nakon diferencijacije isprane i inkubirane sa svježe pripremljenim medijem koji je sadržavao navedene koncentracije testirane molekule, odnosno poznatog liganda.

U radu sa navedinim staničnim linijama korišteni su slijedeći sintetski ligandi: ODN 2006, ODN 2216, CL097, R848 i Poli(I:C).

3.7. UZGOJ KOMPETENTNIH BAKTERIJA *Escherichia coli* DH5α

Aparatura:

- spektrofotometar UV/VID (Cecil Instruments, SAD)

- centrifuga (Eppendorf 5810R, Njemačka)
- hladnjak -80 °C (GFL, Njemačka)

Pribor:

- sterilni nastavci i odgovarajuće pipete (Eppendorf, Njemačka)
- polipropilenske epruvete od 1,5 mL i 15 mL (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije i biološki materijal:

- Luria-Bertani (LB, Sigma Aldrich, Njemačka)
- $CaCl_2$ (Sigma Aldrich, Njemačka)
- glicerol (Kemika, Hrvatska)

Postupak:

U svrhu umnažanja plazmidnih konstrukata korišten je soj bakterija *Escherichia coli* DH5α. Bakterije su uzgajane preko noći u tekućem mediju Luria-Bertani do eksponencijalne faze rasta (OD_{590}=0,33). Prekonoćna kultura prebačena je u polipropilenske epruvete i ostavljena 10 minuta na ledu. Bakterije su centrifugirane dva puta na istim uvjetima – 6000 g, 5 minuta, 4 °C. Nakon prvog centrifugiranja, talog bakterija nježno je resuspendiran u autoklaviranoj 50 mmol dm^{-3} otopini $CaCl_2$ i ostavljen 20 minuta na ledu. Nakon drugog centrifugiranja talog je ponovno nježno resuspendiran u otopini A (50 mmol dm^{-3} $CaCl_2$, 5 mL glicerola, 20 mL QH_2O, autoklavirano) i ostavljen preko noći na ledu. Alikvoti su skladišteni na -80 °C do daljnje upotrebe.

3.8. Transformacija stanica bakterija plazmidnim vektorima

Aparatura:

- termoblok (Thermomixer Comfort Eppendorf, Njemačka)
- tresilica (Forma Scientific, SAD)
- bakterijski inkubator Jouan EB 18 (Jouan, Francuska)

Pribor:

- mikrotitarske pločice sa 24 jažice (Greiner, Njemačka)
- sterilni nastavci i odgovarajuće pipete (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije i biološki materijal:

- Luria-Bertani (LB, Sigma Aldrich, Njemačka)
- agar (Fluka, SAD)
- ampicilin (Sigma Aldrich, Njemačka)

Postupak:

Suspenzija kompetentnih bakterija (100 μL) pomiješana je sa plazmidnom DNA (1 - 10 ng) i ostavljena na ledu 30 minuta. Nakon inkubacije bakterije su podvrgnute temperaturnom šoku: 20 sekundi na 42 °C te kratka inkubacija na ledu 2 minute. U epruvetu s bakterijskom smjesom dodano je 950 μL tekućeg hranjivog medija LB bez antibiotika, te inkubirano 1 sat na 37 °C, uz trešnju. Nakon sat vremena dio suspenzije bakterija (100 μL) nasađen je na krutu bakterijsku podlogu (2,5% LB prah, 1,5% agar) s odgovarajućim antibiotikom (100 μg/mL ampicilina). Poslije prekonoćne inkubacije na 37 °C, pojedinačne kolonije bakterija nasađene su u 5 mL tekuće podloge LB s odgovarajućim antibiotikom te inkubirane preko noći na 37 °C, uz trešnju.

3.9. Izolacija plazmidne DNA iz kulture bakterija pomoću *Plasmid Midi Kit*-a (Qiagen)

Aparatura:

- tresilica (Forma Scientific, SAD)
- centrifuga (Eppendorf 5810R, Njemačka)

Pribor:

- Plasmid Midi Kit (Qiagen, Njemačka)
- sterilni nastavci i odgovarajuće pipete (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije i biološki materijal:

- Luria-Bertani (LB, Sigma Aldrich, Njemačka)
- agar (Fluka, SAD)
- ampicilin (Sigma Aldrich, Njemačka)
- izopropanol (GramMol, Hrvatska)
- etanol (GramMol, Hrvatska)
- agar (Fluka, SAD)
- ampicilin (Sigma Aldrich, Njemačka)

Postupak:

Suspenzija pozitivnih kolonija (5 μL) pomiješana je sa tekućim hranjivim medijem (25 mL) i antibiotikom i ostavljena preko noći na 37 °C uz trešnju. Talog bakterija resuspendiran je u 4 mL hladnog pufera P1 iz kompleta (50 mmol dm^{-3} Tris·Cl, pH 8,0; 10 mmol dm^{-3} EDTA; 100 μg/mL RNaza A) te je dodano 4 mL pufera P2 iz kompleta (200 mmol dm^{-3} NaOH, 1% SDS (w/v)). Suspenzija je nježno protresena i ostavljena na sobnoj temperaturi 5 minuta. Na suspenziju je dodano 4 mL ohlađenog pufera 3 iz kompleta (3,0 mol dm^{-3} kalij acetat, pH 5,5). Pufer 3 dovodi do taloženja genomske DNA, proteina, staničnog otpada i SDS-a. Smjesa je centrifugirana na 20 000 g, 30 minuta pri 4 °C. Supernatant s plazmidnom DNA nanesen je na kolone *QIAGEN-tip 100* ekvilibrirane puferom QBT iz kompleta (750 mmol dm^{-3} NaCl, 50 mmol dm^{-3} MOPS, pH 7,0; 15%-tni izopropanol, 0,15%-tni Triton X-100). Nakon nanošenja supernatanta na kolonu i vezanja DNA, kolone su isprane s 20 mL pufera QC iz kompleta (1 mol dm^{-3} NaCl; 50 mmol dm^{-3} MOPS pH 7; 15%-tni izopropanol), DNA je isprana s 5 mL pufera QF iz kompleta (1,25 mol dm^{-3} NaCl; 50 mmol dm^{-3} Tris-Cl, pH 8,5; 15%-tni izopropanol). Precipitacija DNA izvedena je dodatkom 3,5 mL izopropanola. Uzorak je nakon kratkotrajne trešnje centrifugiran 30 minuta pri 15 000 g, na 4 °C. Supernatant je bačen, a talog je ispran s 2 mL 70%-tnog etanola i centrifugiran 15 min pri 15 000 g, na 4 °C. Talog DNA je osušen i otopljen u 50 μL TE pufera iz kompleta (10 mmol dm^{-3} TRIS x HCl, pH 8,0, 1 mmol dm^{-3} EDTA).

Kvaliteta izolirane DNA provjerena je elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze i spektofotometrijskim određivanjem koncentracije DNA na valnoj duljini 260 nm.

3.10. Elektroforeza u gelu agaroze

Aparatura:

- Sustav za elektroforezu BIO RAD PowerPac 200 (BIO RAD, SAD)
- Kadica za elektroforezu BIO RAD WIDE MINI-SUB CELL GT (BIO RAD, SAD)
- Sustav za detekciju i fotografiranje gelova UVIsave (UVITEC, Engleska)

Pribor:

- odgovarajuće pipete i nastavci (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije:

- etidij-bromid (Sigma Aldrich, Njemačka)
- molekularni biljeg «*Lambda DNA-Bst II Digest*» (New England BioLabs, Engleska)

Otopine:

- 1% gel agaroze

Agaroza (Sigma Aldrich, Njemačka)	1 g
1 x TAE pufer	do 100 ml

- 50 x TAE pufer

TRIS (Kemika, Hrvatska)	224 g
Octena kiselina (Kemika, Hrvatska)	57,1 mL
Na_2-EDTA (Kemika, Hrvatska), 0,5%, pH 7,5	100 mL
Destilirana voda	do 1 L

- Pufer za nanošenje na gel

Bromfenol modrilo 2% (Sigma Aldrich, Njemačka)	0,5 mL
Glicerol 50% (Kemika, Hrvatska)	10 mL
10 x TAE pufer	5 mL

Destilirana voda	do 100 ml

Postupak:

Kvaliteta izolirane plazmidne DNA analizirana je elektroforezom u 1%-tnom gelu agaroze otopljene u puferu 1xTAE. Prije polimerizacije u gel je dodan etidij-bromid (1 μg/mL), a uzorci su bili pomiješani s puferom za nanošenje na gel. Paralelno sa uzorcima, na gelove je nanošen i molekularni biljeg, «*Lambda DNA-Bst II Digest*». Elektroforeze su trajale 40 minuta pri naponu od 60 V. Za detekciju odsječaka i fotografiranje gelova korišten je sustav UVIsave.

3.11. Stabilna transfekcija stanica u kulturi

Aparatura:

- hladnjak -80 °C (GFL, Njemačka)
- spremnik s tekućim dušikom
- inkubator Jouan EB 18 (Jouan, Francuska)
- mikroskop

Pribor:

- mikrotitarske pločice sa 24 jažice (Greiner, Njemačka)
- mikrotitarske pločice sa 96 jažica (Greiner, Njemačka)
- sterilni nastavci i odgovarajuće pipete (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije:

- tripsin (Sigma Aldrich, Njemačka)
- DMEM medij (Sigma-Aldrich, UK)
- Lipofectamine LTX (Life Technologies, SAD)
- neomicin (Sigma Aldrich, Njemačka)

Postupak:

Transfekcija je proces uvođenja strane DNA u stanicu eukariota pomoću plazmidne DNA bakterija. Ova metoda poslužila je za određivanje TLR receptora preko kojeg signalizira molekula M-199 i za određivanje utjecaja molekule M-199 na prijenos signala pomoću poznatih liganada za TLR9 i TLR3. U radu je korišten komercijalni transfekcijski reagens *Lipofectamine LTX*, kojeg čine kationski lipidi pomoću kojih se željeni plazmidi unose u stanice HEK293.

Stanice su 24 sata prije transfekcije tripsinizirane i nasađene u mikrotitarske pločice s 24 jažica, 1 x 10^5 stanica po jažici (za potrebe luciferaznog testa). Stanice visoke konfluentnosti transfecirane su prema uputama proizvođača. U ovom radu, u svrhu stabilne transfekcije stanica, korišteni su ekspresijski vektori: pcDNA3_TLR3, pcDNA3_TLR7, pcDNA3_TLR8, pcDNA3_TLR9 (poklon Mustafa Diken, TRON, Njemačka).

Po svakoj jažici u kojoj smo izvodili transfekciju, pomiješano je 500 ng plazmidne DNA (150 ng konstrukta s genom za TLR3, TLR7, TLR8 ili TLR9 i 350 ng praznog konstrukta pCI) u 100 μL medija DMEM bez seruma. U smjesu je dodano po 1 μL *Lipofectamine LTX* reagensa, nježno je promiješano i ostavljeno 30 minuta na sobnoj temperaturi kako bi nastali kompleksi DNA i reagensa. Po 100 μL smjese (DMEM/*Lipofectamine LTX*/plazmidna DNA) dodano je u svaku jažicu sa stanicama, nježno je promiješano.

Nakon 48 sati stanice su tripsinizirane i razrijeđene u pet različitih razrjeđenja (1:5, 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000) u mediju u koji je dodan neomicin (0,5 g/L). Tako razrijeđene stanice nasađene su na mikrotitarske pločice s 96 jažica. Tijekom slijedeća 2 - 3 tjedna, medij s antibiotikom mijenjan je svaka 2 - 3 dana. Nakon pojave rezistentnih kolonija, rezistentni klonovi nasađeni su na mikrotitarske pločice s 24 jažica (100 μL) te je stanična kultura postepeno propagirana u mediju s neomicinom (0,5 g/L), do konfluentnosti od 75%. Alikvoti odabranih klonova čuvani su u tekućem dušiku.

3.12. Dual-Glo luciferazni test

Aparatura:

- Inkubator Jouan EB 18 (Jouan, Francuska)
- tresilica (Forma Scientific, SAD)

- hladnjak -80 °C (GFL, Njemačka)
- luminometar (Fluoroskan ascent FL, Thermo, Finska)

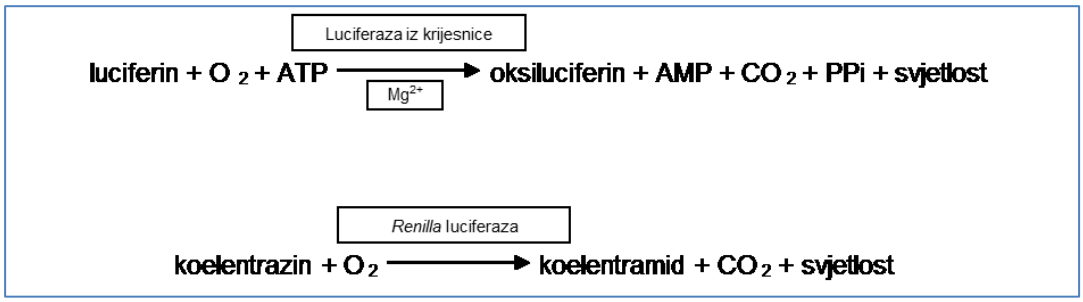
Pribor:

- mikrotitarske pločice sa 96 jažica (Greiner, Njemačka)
- bijele mikrotitarske pločice sa 96 jažica (Greiner, Njemačka)
- sterilni nastavci i odgovarajuće pipete (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije:

- komplet *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega, SAD)

Luciferazni reporterski sustavi često su korišteno oruđe za proučavanje ekspresije i regulacije gena na razini transkripcije. Reporterski sustavi koji koriste konstrukte s ugrađenim genom za luciferazu temelje se na svojstvu ovog oksidacijskog enzima, a to je bioluminiscencija ili emitiranje svjetlosti. Najčešće je korištena luciferaza iz krijesnice. Krijesnice emitiraju svjetlost koja nastaje u kemijskoj reakciji u kojoj iz luciferina uz pomoć luciferaze nastaje oksiluciferin.



Slika 14. Reakcije katalizirane luciferazom iz krijesnice i *renilla* luciferazom

Analiza koja koristi luciferazni reporterski sustav temelji se na kloniranju regulatorne regije za ispitivani gen uzvodno od gena za luciferazu u ekspresijskom vektoru. Kada proučavamo određeni receptor i njegovu aktivaciju tada je pogodno koristiti vezno mjesto za transkripcijski čimbenik koji nastaje okidanjem ispitivanog receptora. Aktivacijom receptora dolazi do povećane ekspresije ili oslobađanja transkripcijskog čimbenika, a samim tim do povećanja bioluminiscencije. Sustav se može aktivirati i kao posljedica nekog općenitog učinka, kao što je smrt stanice, inhibicija rasta ili neujednačeni broj nasađenih stanica. Da bi

izbjegli lažno pozitivne rezultate uvodimo kontrolni reporterski sustav u svrhu normalizacije rezultata eksperimentalnog sustava. Ako dolazi do porasta bioluminiscencije u oba sustava, tada možemo govoriti o općem utjecaju, međutim ako raste bioluminiscencija samo u eksperimentalnom sustavu tada je riječ o aktivaciji ili ekspresiji ispitivanog gena. U ovom radu korišten je *Dual-Glo Luciferase Assay System*. Navedeni komercijalni komplet sastoji se od dva različita supstrata za enzime luciferazu iz krijesnice (*Photinus pyralis*) i *renilla* luciferazu (porijeklom iz morske maćuhice, *Renilla reniformis*). Luciferaza iz krijesnice katalizira oksidaciju luciferina u oksiluciferin uz oslobađanje svjetlosti valne duljine 550-570 nm. Enzim *renilla* luciferaza katalizira oksidaciju koelentrazina u koelenteramid uz oslobađanje svjetlosti valne duljine 480 nm (slika 14). Dodavanjem supstrata ovim enzimima oslobađa se svjetlost koja se mjeri na luminometru. U našim pokusima kao kontrolni konstrukt korišten je plazmid pRL-TK s ugrađenim genom za *renilla* luciferazu pod promotorom gena za timidin-kinazu virusa herpes simpleks (HSV). Stanice HEK293 prirodno ne eksprimiraju većinu *Toll-like* receptora ali eksprimiraju sve nizvodne molekule TLR-signalnog puta. U ovom istraživanju korišten je luciferazni test u svrhu ispitivanja uloge pojedinih TLR-a nakon aktivacije stanica molekulom M-199. HEK293 stanice transfecirane su naizmjenično sa četiri različita plazmida u koje su uklonirani geni za TLR7, TLR8, TLR9 i TLR3. Mjerena je aktivacija gena za luciferazu iz krijesnice, koji je smješten iza promotora sa 5 veznih mjesta za transkripcijski čimbenik NF-κB (Stratagene, SAD), nakon stimulacije ispitivanim/potencijalnim ligandom, ali i poznatim aktivatorima navedenih receptora.

Stabilno transfecirane stanice HEK293 nasađene su u plastične mikrotitarske ploče s 96 jažica. Nakon 24 sata istovremeno su transfecirane sa tri različita konstrukta, 50 ng eksperimentalnog konstrukta *firefly* luciferaze (5xNF-κB-luc), 50 ng kontrolnog konstrukta *renilla* luciferaze (pRL-TK) i 400 ng praznog konstrukta pCI u transfekcijsku smjesu (ukupno 500 ng DNA). 24 sata nakon transfekcije, stanice su stimulirane ili ko-stimulirane specifičnim ligandima, odnosno smjesom liganda i male molekule. Stimulacija je izvedena preko noći, pri 37 °C u inkubatoru. Stimulacija je prekinuta uklanjanjem tekućeg medija i dodavanjem 50 μL pasivnog pufera za lizu stanica iz kompleta (Glo Lysis Buffer, 1X), 30 minuta na -80 C. Uzorak je do analize čuvan na -80°C. Oslobođena bioluminiscencija mjerena je na luminometru (Fluoroskan ascent FL, Thermo, Finska), u bijelim komercijalno dostupnim mikrotitarskim pločama s 96 jažica (Greiner, Njemačka). U 50 μL lizata stanica je dodano isto toliko otopine supstrata za luciferazu iz krijesnice. Mjerenje aktivnosti luciferaze učinjeno je

prema protokolu koji je unaprijed određen programom instrumenta. Nakon toga je smjesi dodano 50 μL otopine supstrata za *renilla* luciferazu, te je mjerenje provođeno pod istim uvjetima. Rezultati su izraženi kao omjer očitane bioluminiscencije (krijesnica/*renilla*), nakon dodavanja supstrata za eksperimentalni i kontrolni plazmid. Dobivena vrijednost je vrijednost relativne luciferazne aktivnosti za analizirane stanice.

3.13. Spektrofotometrija

Aparatura:

- spektrofotometar Varian Cary Bio 100 (Varian, Australija)

Pribor:

- kvarcne kivete duljine optičkog puta 1 cm, volumena 1 mL
- odgovarajuće pipete i nastavci (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije:

- fosfatni pufer, I = 0,01 mol dm^{-3}, pH = 7,0

NaH_2PO_4 x H_2O (Kemika, Hrvatska)	0.54 g
Na_2HPO_4 x 7 H_2O (Kemika, Hrvatska)	1,64 g

Odvagnuli smo NaH_2PO_4 x H_2O i Na_2HPO_4 x 7 H_2O, te smo dobivenu količinu otopili u 1000 mL destilirane vode.

Postupak:

U svrhu određivanja stabilnosti i koncentracije ispitivanog spoja snimljeni su UV/Vis spektri u kvarcnim kivetama duljine optičkog puta 1 cm, volumena 1 mL, na Varian Cary Bio 100 spektrofotometru. Eksperimenti su izvedeni dodavanjem određenog volumena ishodišne otopine spoja u 1 mL pufera (fosfatni pufer, I = 0,01 mol dm^{-3}, pH = 7,0). Spektri su snimljeni u rasponu valnih duljina od 220 do 500 nm.

3.13.1. Fluorescencijska spektroskopija

Aparatura:

- fluorimetar Varian Cary Eclipse (Varian, Australija)

Pribor:

- kvarcne kivete duljine optičkog puta 1 cm, volumena 1 mL
- odgovarajuće pipete i nastavici (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije:

- fosfatni pufer, I = 0,01 mol dm^{-3}, pH = 7,0
  - priprema opisana pod 3.13.
- fosfatni pufer, I = 0,01 mol dm^{-3}, pH = 5,7

  NaH_2PO_4 x H_2O (Kemika, Hrvatska) 1,30 g

  Na_2HPO_4 x 7 H_2O (Kemika, Hrvatska) 0,17 g

  Odvagnuli smo NaH_2PO_4 x H_2O i Na_2HPO_4 x 7 H_2O, te smo dobivenu količinu otopili u 1000 mL destilirane vode.

Postupak:

Fluorescencijski spektri snimani su na fluorimetru Varian Cary Eclipse u rasponu valnih duljina od 400 do 600 nm. Titracije su se izvodile u puferu (fosfatni pufer, I = 0,01 mol dm^{-3}, pH 7,0 i pH 5,7) s početnom koncentracijom spoja, c = 2,4 μmol dm^{-3}, na temperaturi od 25 °C. Eksperimenti su izvedeni dodavanjem određenog volumena oligodeoksinukleotida u ishodišnu otopinu spoja u 2 mL pufera. Po svakom dodatku oligodeoksinukleotida, nakon 1 do 2 minute inkubacije tijekom koje dolazi do uravnoteženja kompleksa liganda i spoja, snimljen je spektar. Spektar spoja je bio korigiran za razrjeđenje zbog dodatka oligodeoksinukleotida. Titracija je trajala do zasićenja, odnosno dok više nije bilo promjena u emisijskim spektrima spoja po dodatku oligodeoksinukleotida. Obrada fluorimetrijskih titracija ispitivanog spoja s oligodeoksinukleotidima (intenziteti emisije na jednoj valnoj duljini) je napravljena u programu Origin, dok su rezultati daljnje obrađeni nelinearnom regresijskom analizom Scatchardove izoterme također u programu Origin.

Na temelju toga dobiveni su parametri log$K$s (konstanta vezanja), omjer koncentracija vezanog spoja i veznih mjesta na polinukleotidu (*n)*.

3.13.2. Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD spektroskopija)

Aparatura:

- CD spektrofotometar JASCO J-815, Jasco Analytical Instruments (Jasco, Japan)

Pribor:

- kvarcne kivete duljine optičkog puta 1 cm, volumena 1 mL
- odgovarajuće pipete i nastavci (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije:

- fosfatni pufer, I = 0,01 mol dm^{-3}, pH = 7,0
- fosfatni pufer, I = 0,01 mol dm^{-3}, pH = 5,7
    - priprema opisana pod 3.13 i 3.13.1.

Postupak:

CD spektri su snimljeni pomoću JASCO J-815 CD spektrofotometra, uz konstantan protok N_2 (g). Mjerenje je izvođeno u rasponu valnih duljina od 220 do 450 nm. Eksperimenti su izvedeni dodavanjem određenog volumena ishodišne otopine spoja u otopinu oligodeoksinukleotida u 2 mL pufera. Svaki spektar je sniman tri puta. Spektri su uprosječeni kako bi se dobila konačna krivulja, pri standardnoj osjetljivosti instrumenta i brzini snimanja od 200 nm/min. Od svakog snimljenog spektra je trebalo ručno oduzeti prethodno snimljenu baznu liniju, koju je činio čisti pufer (fosfatni pufer, I = 0,01 mol dm^{-3}, pH 7,0 i pH 5,7). Početna koncentracija oligodeoksinukleotida je bila c = 30 μmol dm^{-3} u titracijama sa ODN 2006 i c = 50 μmol dm^{-3} u titracijama sa ODN 2216, a titriralo se spojevima u omjerima r = 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 i 0,6. Spektri su obrađeni u programu Origin.

3.14. Statistička obrada podataka

Tijekom izvođenja MTT testa mjerenje je u svakoj točki izvedeno četiri puta. Svaki rezultat je srednja vrijednost mjerenja u dva odvojena eksperimenta. Vrijednost GI_{50} izračunali smo iz krivulje ovisnosti o dozi, pomoću linearne regresijske analize.

Sve analize uzoraka metodom ELISA provedene su najmanje dva puta, u duplikatu, a luciferaznim testom najmanje dva puta u triplikatu. Prikazani su rezultati reprezentativnih pokusa. Rezultati analize ELISA testa (sadržaj interleukina u supernatantu) i luciferaznog testa (relativni intenzitet oslobođene svjetlosti) izraženi su kao aritmetička sredina ± standardno odstupanje (SD, engl. *standard deviation*) reprezentativnog pokusa. Statistička razlika između ispitivanih skupina i kontrole, napravljena je korištenjem Studentovog *t*-testa u programu Microsoft Excel 2010.

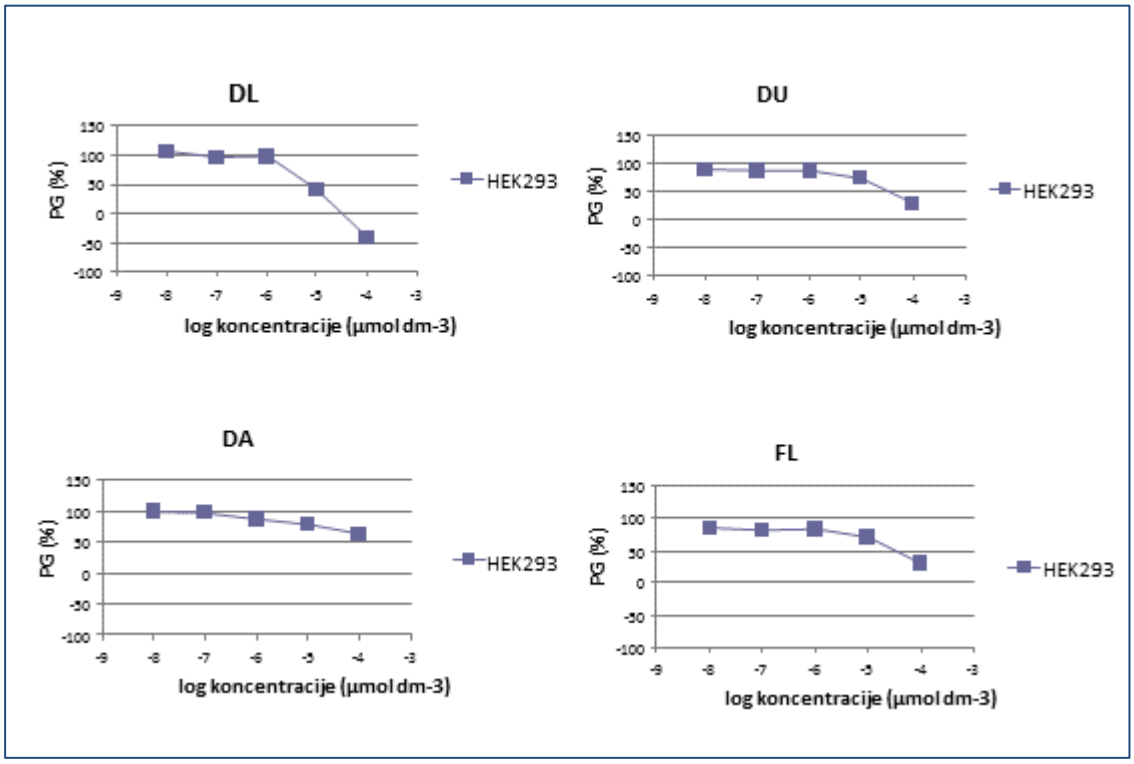
Mjerenja UV/VIS spektra, fluorescencijskih i CD spektara izvođena su u triplikatu. Rezultati analize fluorimetrijskih titracija ispitivanog spoja s oligodeoksinukleotidima obrađeni su u programu Origin, te su obrađeni nelinearnom regresijskom analizom Scatchardove izoterme također u programu Origin.

§ 4. REZULTATI

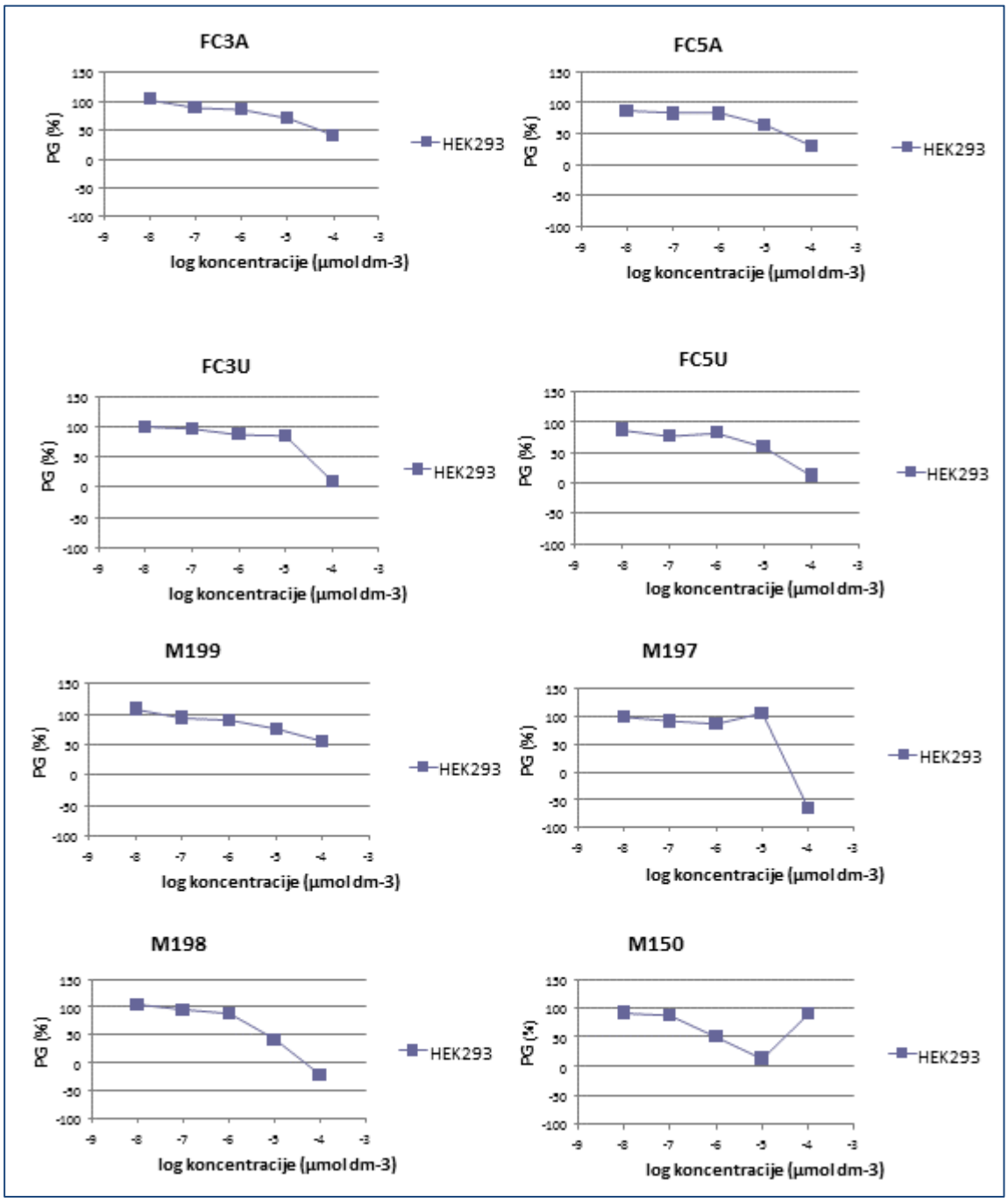
4.1. Rezultati analize ispitivanja učinka derivata fenantridina na rast stanica u *in vitro* uvjetima - MTT test

Pomoću MTT testa odredili smo citotoksičnost testiranih spojeva odnosno inhibiciju rasta stanica obrađenih pojedinim spojem (slika 15 a, 15 b i 15 c). Cilj ove analize bio je odrediti spojeve koji imaju najmanji citotoksični učinak na stanice. Naime poznato je da produkti razgradnje stanice mogu stimulirati receptore urođene imunosti. Kako je cilj našeg rada bio ispitati imunostimulacijsko djelovanje spojeva željeli smo na ovaj način odabrati spojeve s najmanjom razinom citotoksičnosti.

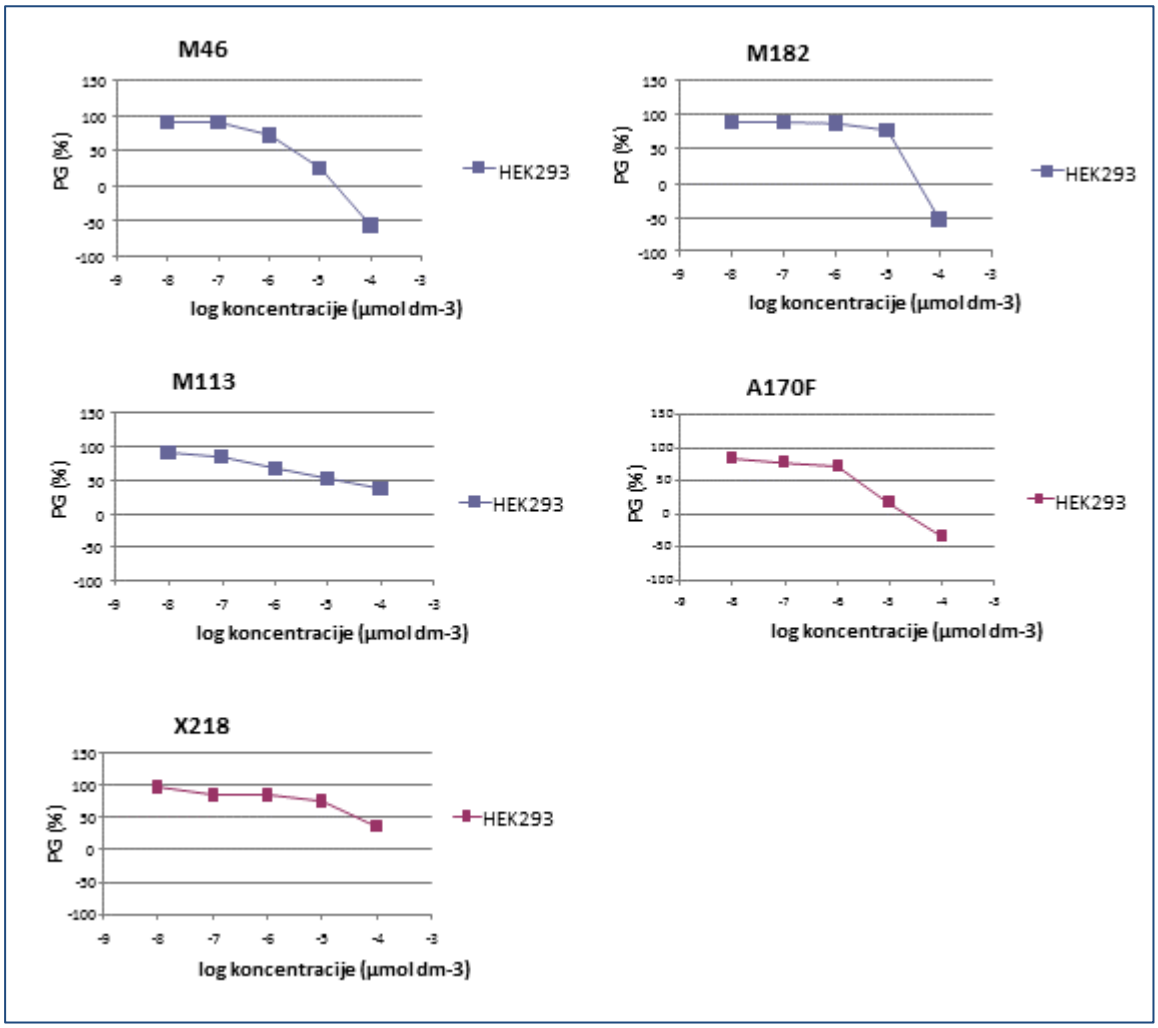
Testirano je 17 molekula, derivata fenantridina (shema 1).



Slika 15.a Ovisnost postotka rasta stanica (PG) o koncentraciji testiranih spojeva. Stanice su ispitivane u dva odvojena pokusa, u svakoj točki su izvedena po četiri mjerenja, n=8. Inkubacija sa testiranim fenantridinima je trajala 72 sata, nakon dodatka reagensa očitana je apsorbancija na valnoj duljini 570 nm.
Kratice: HEK293 = stanice bubrega embrija čovjeka; DL = $C_{20}H_{25}N_3$;
DU = $C_{28}H_{29}N_7O_4$; DA = $C_{30}H_{31}N_{13}$; FL = $C_{17}H_{18}N_2$



Slika 15.b Ovisnost postotka rasta stanica (PG) o koncentraciji testiranih spojeva. Stanice su ispitivane u dva odvojena pokusa, u svakoj točki su izvedena po četiri mjerenja, n=8. Inkubacija sa testiranim fenantridinima je trajala 72 sata, nakon dodatka reagensa očitana je apsorbancija na valnoj duljini 570 nm.
Kratice: HEK293 = stanice bubrega embrija čovjeka;
FC3A = $C22H_{21}N_7$; FC5A = $C_{24}H_{25}N_7$; FC3U = $C_{21}H_{20}N_4O_4$; FC5U = $C_{23}H_{24}N_4O_2$;
M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$; M-197 = $C_{21}H_{25}N_3O$; M-198 = $C_{24}H_{31}N_3O$;
M-150 = $C_{21}H_{16}N_2O_2$ x H_2O x HCl



Slika 15.c Ovisnost postotka rasta stanica (PG) o koncentraciji testiranih spojeva. Stanice su ispitivane u dva odvojena pokusa, u svakoj točki su izvedena po četiri mjerenja, n=8. Inkubacija sa testiranim fenantridinima je trajala 72 sata, nakon dodatka reagensa očitana je apsorbancija na valnoj duljini 570 nm.
Kratice: HEK293 = stanice bubrega embrija čovjeka; M-46 = $C_{16}H_{15}BrN_2$;
M-182 = $C_{16}H_{16}N_6$ x 2HCl; M-113 = $C_{22}H_{18}N_2O_2$;
A170F = $C_{14}H_9NO$; X-218 = $C_{13}H_{10}N_2$

Na slikama 15 a, 15 b i 15 c možemo uočiti da spojevi DL, M-197, M-198, M-46, M-182 i A170F pokazuju citotoksični učinak pri koncentracijama između 10^{-4} do 10^{-5} mol dm^{-3}. Ostali spojevi pokazuju vrijednosti PG-a više od 50% pri koncentracijama 10^{-6} mol dm^{-3} i pri nižim koncentracijama..

Vrijednosti GI_{50} izračunate su linearnom regresijskom analizom testiranih koncentracija za PG vrijednosti ispod i iznad referentne vrijednosti (50%). U Tablici 4.

označeni su spojevi koji imaju GI_{50} vrijednosti ispod 20 μmol dm^{-3}. Naime u ispitivanjima imunostimulacijskog djelovanja derivata fenantridina, spojeve smo testirali u koncentracijama 5 i 10 μmol dm^{-3}. Kod svih molekula čija je vrijednost GI_{50} veća od 20 μmol dm^{-3}, odnosno dvostruko veća od testirane možemo pretpostaviti da citotoksični učinak neće predstavljati poticaj za imunosni odgovor i samim tim dovesti do lažno pozitivnog imunostimulacijskog učinka.

Tablica 4. Testirani fenantridini

Molekula		GI_{50} [μmol dm^{-3}]
		HEK 293
1.	DL	6,87 ± 0,47
2.	DU	34,42 ± 0,15
3.	DA	>100
4.	FL	31,91 ± 6,99
5.	FC3A	56,29 ± 39,96
6.	FC5A	23,56 ± 0,37
7.	FC3U	30,30±11,35
8.	FC5U	15,30 ± 4,75
9.	M-199	>100
10	M-197	20,62±3,81
11.	M-198	12,96 ± 27,5
12	M-150	0,90 ± 0,78
13	M-46	2,68 ± 1,38
14.	M-182	16,25 ± 4,77
15.	M-113	11,15 ± 2,18
16.	A170F	2,51 ± 0,46
17.	X-218	42,69 ± 7,87

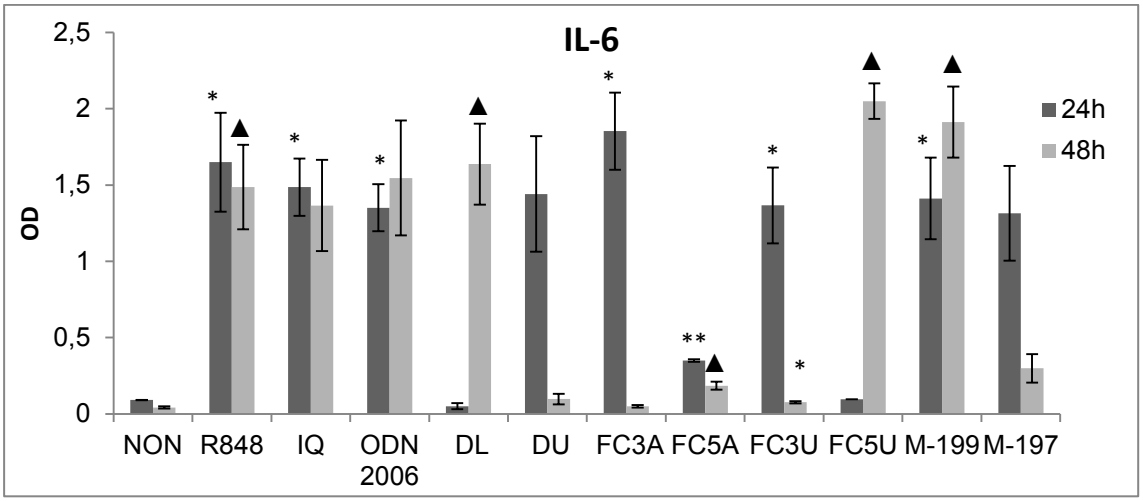
GI_{50}, koncentracija koja dovodi do 50% inhibicije rasta stanica
Kratice: HEK293 = stanice bubrega embrija čovjeka; FL = $C_{17}H_{18}N_2$;
DL = $C_{20}H_{25}N_3$; FC3U = $C_{21}H_{20}N_4O_4$; FC5U = $C_{23}H_{24}N_4O_2$; DU = $C_{28}H_{29}N_7O_4$; FC3A = C22H21N7; FC5A = $C_{24}H_{25}N_7$; DA = $C_{30}H_{31}N_{13}$; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$; M-197 = $C_{21}H_{25}N_3O$; M-198 = $C_{24}H_{31}N_3O$; M-150 = $C_{21}H_{16}N_2O_2$ x H_2O x HCl,
M-46 = $C_{16}H_{15}BrN_2$; M-182 = $C_{16}H_{16}N_6$ x 2HCl; M-113 = $C_{22}H_{18}N_2O_2$;
A170F = $C_{14}H_9NO$; X-218 = $C_{13}H_{10}N_2$

4.2. Rezultati analize razine citokina u nasloju humanih mononuklearnih stanica periferne krvi stimuliranih testiranim fenantridinima

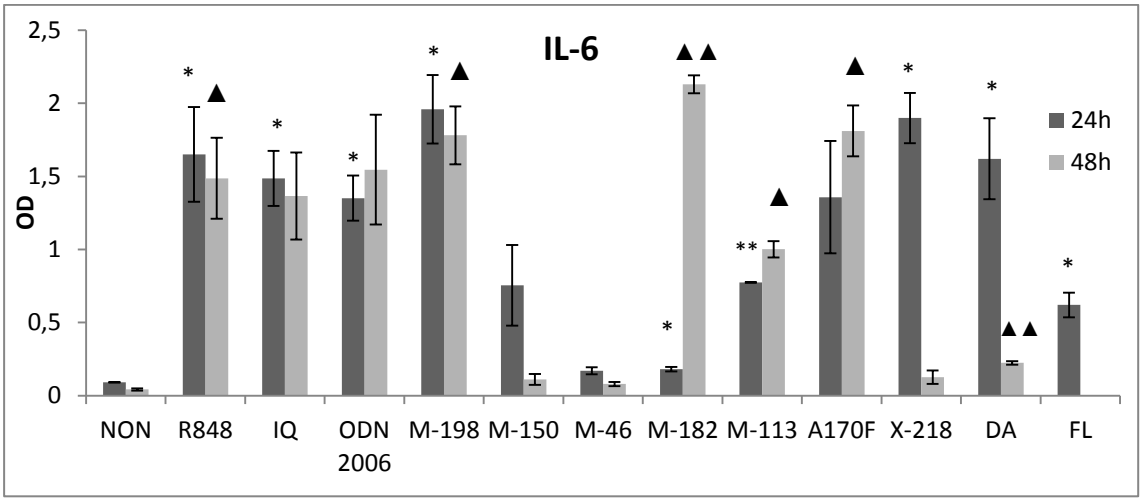
U svrhu ispitivanja imunostimulacijskog djelovanja derivata fenantridina (navedenih u Tablici 3.) izvedeni su testovi stimulacije humanih mononuklearnih stanica izoliranih iz periferne krvi. Rezultat izolacije stanica PBMC je smjesa limfocita (stanice T, stanice B i stanice NK), monocita i dendritičkih stanica. Dakle u stanicama PBMC su prisutne stanice na kojima se nalazi glavnina ispitivanih receptora, monociti na kojima su većinom izraženi TLR8 i pDC na kojima su većinom izraženi TLR7 i TLR9. Nakon stimulacije PBMC-a u supernatantu smo metodom ELISA-e određivali IL-6 i IFN-α. IL-6 je jedan od proupalnih citokina koji nastaje kao produkt aktivacije transkripcijskog čimbenika NF-κB, dok IFN-α nastaje aktivacijom IRF7 i IRF3.

4.2.1. Rezultati analize razine IL-6 u supernatantu stanica PBMC

Stanice PBMC izolirane iz krvi zdravog davatelja obrađene su 24 sata, odnosno 48 sati, testiranim spojevima. Testirani potencijalni ligandi bili su razrijeđeni na koncentraciju 10 μmol dm^{-3} u mediju za uzgoj stanica (RPMI). Nakon stimulacije supernatant je analiziran testom ELISA u svrhu određivanja razine IL-6 i IFN-α. Kao pozitivna kontrola korišteni su supernatanti stanica stimulirani rezikvimodom (R848, dominantno TLR8 ligand), imikvimodom (TLR7 ligand) i ODN 2006 (TLR9 ligand). Rezultati ispitivanja pokazuju porast izlučivanja IL-6 u supernatantu stanica stimuliranih kontrolnim ligandima, nakon 24 odnosno 48 sati (slika 16 a i 16 b). Stanice koje su bile inkubirane u uvjetima bez liganda pokazale su minimalnu razinu IL-6. Porast razine IL-6 nakon 24 sata i nakon 48 sati možemo uočiti u supernatantima stanica stimuliranih sa M-199, M-198, M-113 i A170F. Također, u supernatantu stanica stimuliranih sa FCSA može se primjetiti vrlo mali porast razine u obje vremenske točke. Nakon stimulacije s preostalim testiranim spojevima mogu se uočiti slijedeći rezultati: porast razine IL-6 u supernatantu nakon 24 sata nakon kojega slijedi značajni pad razine nakon 48 sati (DU, FC3A, FC3U, M-197, M-150, X218, DA i FL); nema odgovora nakon 24 sata stimulacije ali dolazi do značajnog porasta nakon 48 sati (DL, FC5U i M-182); treći tip odgovora uočen je kod uzorka M-46, nije došlo do porasta razine niti nakon 24 sata niti nakon 48 sati.

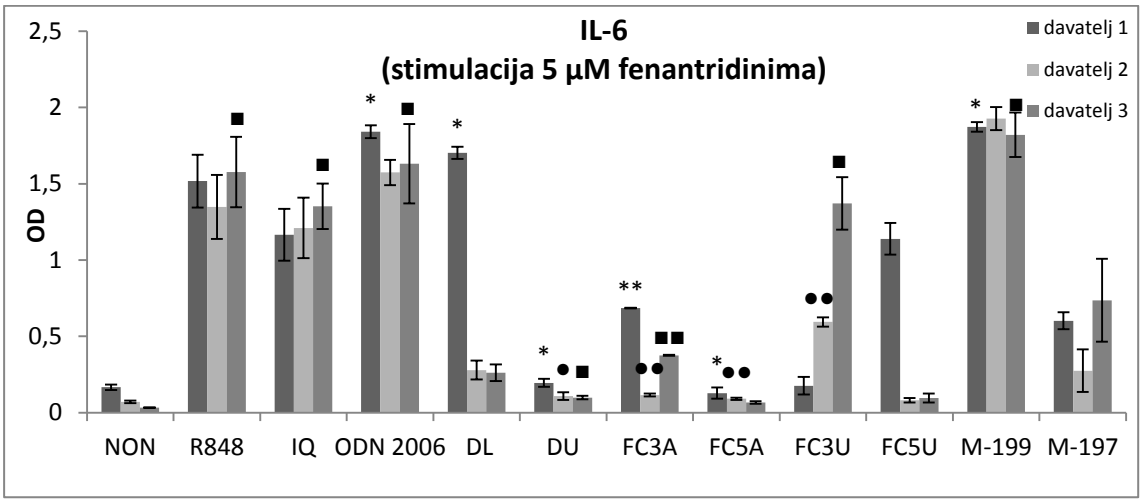


Slika 16.a Relativni sadržaj IL-6 u supernatantu PBMC-a stimuliranih različitim fenantridinima, 24 i 48 sati. Stanice su pripremljene u duplikatu, n=2, apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike između nestimuliranih stanica i stanica stimuliranih 24 sata prikazane su s: **P*<0,05; ***P*<0,01; statistički značajne razlike između nestimuliranih stanica i stanica stimuliranih 48 sati prikazane su s: ▲*P*<0,05.
Kratice: IL-6 (Interleukin 6); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; R848 = rezikvimod; IQ = imikvimod;
ODN 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; DL = $C_{20}H_{25}N_3$;
DU = $C_{28}H_{29}N_7O_4$; FC3A = C22H21N7; FC5A = C24H25N7;
FC3U = $C_{21}H_{20}N_4O_4$; FC5U = $C_{23}H_{24}N_4O_2$; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$;
M-197 = $C_{21}H_{25}N_3O$; SD = standardno odstupanje

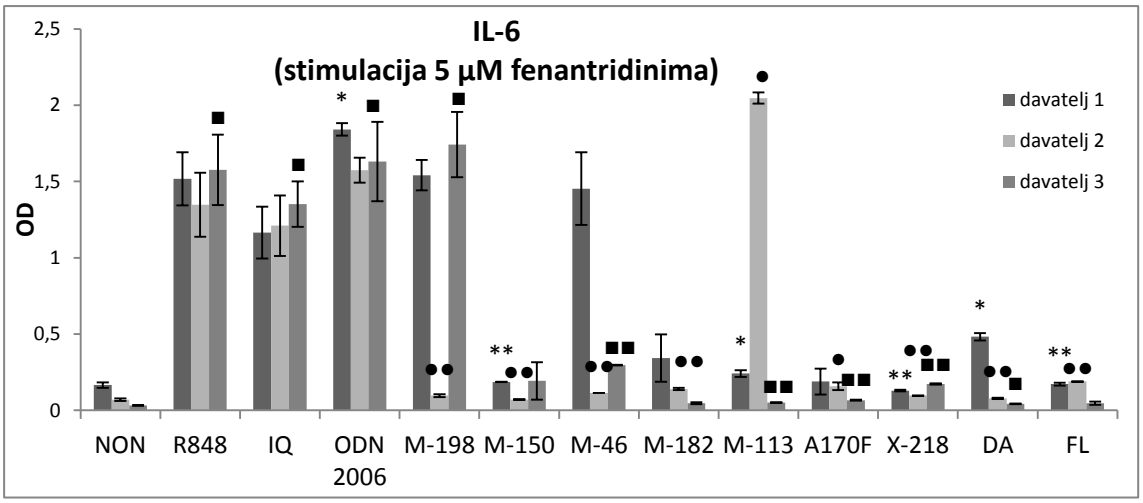


Slika 16.b Relativni sadržaj IL-6 u supernatantu PBMC-a stimuliranih različitim fenantridinima, 24 i 48 sati. Stanice su pripremljene u duplikatu, n=2, apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike između nestimuliranih stanica i stanica stimuliranih 24 sata prikazane su s: **P*<0,05; ***P*<0,01; statistički značajne razlike između nestimuliranih stanica i stanica stimuliranih 48 sati prikazane su s: ▲*P*<0,05; ▲▲*P*<0,01.
Kratice: IL-6 (Interleukin 6); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; R848 = rezikvimod; IQ = imikvimod;
ODN 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom;
M-198 = $C_{24}H_{31}N_3O$; M-150 = $C_{21}H_{16}N_2O_2$ x H_2O x HCl, M-46 = $C_{16}H_{15}BrN_2$;
M-182 = $C_{16}H_{16}N_6$ x 2HCl; M-113 = $C_{22}H_{18}N_2O_2$; A170F = $C_{14}H_9NO$;
X-218 = $C_{13}H_{10}N_2$; DA = $C_{30}H_{31}N_{13}$; FL = $C_{17}H_{18}N_2$; SD = standardno odstupanje

Nakon što smo utvrdili da neki od testiranih spojeva uspješno aktiviraju stanice PBMC i nakon 24 sata, odabir je nastavljen na stanicama PBMC-a izoliranih iz tri različita zdrava davatelja. Stanice su obrađene 24 sata, a testirani spojevi bili su razrijeđeni u koncentraciji od 5 μmol dm^{-3} (slika 17 a i 17 b). Rezultati ispitivanja pokazuju porast izlučivanja IL-6 u supernatantima stanica stimuliranih kontrolnim ligandima (R848, imikvimod, ODN 2006) kod sva tri davatelja. Stanice koje su bile inkubirane u uvjetima bez liganda pokazale su nisku razinu IL-6. Porast razine IL-6 kod sva tri davatelja nakon 24 sata stimulacije možemo uočiti u supernatantu stanica stimuliranih sa M-199. U supernatantima stanica stimuliranih sa spojevima DU, FCSA, M-150, M-182, A170F, X218 i FL može se primjetiti vrlo mali porast razine IL-6 kod sva tri davatelja. Kod preostalih uzoraka dolazi do porasta razine IL-6 u supernatantima pojedinih davatelja, pri čemu ne možemo jasno tumačiti da li je to posljedica utjecaja testiranih spojeva ili vanjskih čimbenika kao što je individualni imunološki status i slično (DL, FC3A, FC3U, FC5U, M-197, M-198, M-46, M-113 i DA).



Slika 17.a Relativni sadržaj IL-6 u supernatantu PBMC-a stimuliranih različitim fenantridinima. Stanice su 24 sata inkubirane s ligandima te su pripremljene u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice prikazane su s: **P*<0,05; ***P*<0,01 (davatelj 1); •*P*<0,05; ••*P*<0,01 (davatelj 2); ▪*P*<0,05; ▪▪*P*<0,01 (davatelj 3).
Kratice: IL-6 (Interleukin 6); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; R848 = rezikvimod; IQ = imikvimod;
ODN 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; DL = $C_{20}H_{25}N_3$;
DU = $C_{28}H_{29}N_7O_4$; FC3A = C22H21N7; FC5A = C24H25N7;
FC3U = $C_{21}H_{20}N_4O_4$; FC5U = $C_{23}H_{24}N_4O_2$; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$;
M-197 = $C_{21}H_{25}N_3O$; SD = standardno odstupanje

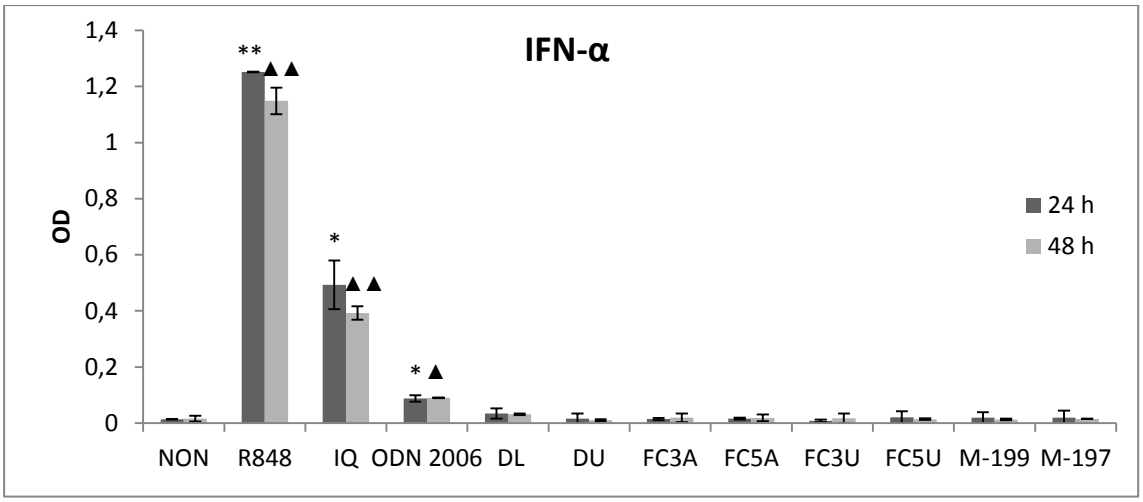


Slika 17.b Relativni sadržaj IL-6 u supernatantu PBMC-a stimuliranih različitim fenantridinima. Stanice su 24 sata inkubirane s ligandima te su pripremljene u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice prikazane su s: **P*<0,05; ***P*<0,01 (davatelj 1); •*P*<0,05; ••*P*<0,01 (davatelj 2); ▪*P*<0,05; ▪▪*P*<0,01 (davatelj 3).
Kratice: IL-6 (Interleukin 6); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*);
NON = nestimulirane stanice; R848 = rezikvimod; IQ = imikvimod;
ODN 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom;
M-198 = $C_{24}H_{31}N_3O$; M-150 = $C_{21}H_{16}N_2O_2$ x H_2O x HCl, M-46 = $C_{16}H_{15}BrN_2$;
M-182 = $C_{16}H_{16}N_6$ x 2HCl; M-113 = $C_{22}H_{18}N_2O_2$; A170F = $C_{14}H_9NO$;
X-218 = $C_{13}H_{10}N_2$; DA = $C_{30}H_{31}N_{13}$; FL = $C_{17}H_{18}N_2$; SD = standardno odstupanje

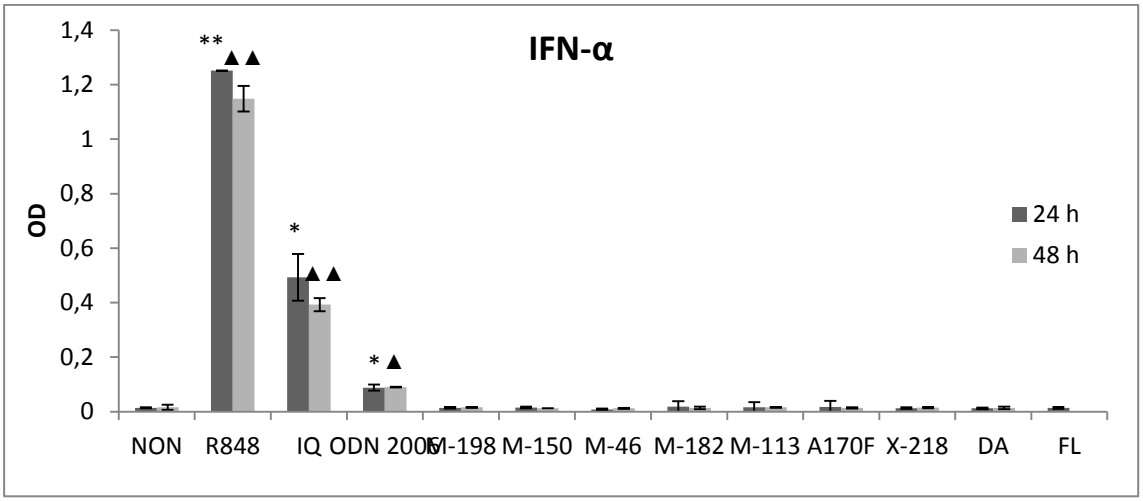
Nakon testiranja 17 fenantridinskih derivata stabilan porast izlučivanja IL-6 uočen je kod molekule M-199. Možemo zaključiti da je stimulacija stanica PBMC ligandom M-199 dovela do porasta razine IL-6 u supernatantu stanica koje su bile stimulirane tijekom različitog vremena (24 i 48 sati) te u supernatantu stanica PBMC izoliranih iz tri različita zdrava darivatelja. Tijekom pokusa u kojima su korišteni različiti darivatelji i tijekom pokusa u kojem je varirana duljina stimulacije korištene su dvije koncentracije liganda (5 i 10 µM); u obje testirane koncentracije spoj je pokazao stimulacijsko djelovanje.

4.2.2. Rezultati analize razine IFN-α

Kako bi detaljnije ispitali potencijalno imunostimulacijsko djelovanje testiranih spojeva, stanice PBMC jednog davatelja stimulirane su 24 sata odnosno 48 sati testiranim molekulama. Potencijalni ligandi bili su razrijeđeni na koncentraciju 10 μmol dm^{-3} u mediju za uzgoj stanica (RPMI). Supernatanti su nakon stimulacije analizirani ELISA testom za određivanje razine IFN-α. Kao pozitivna kontrola korišteni su: rezikvimod (R848), imikvimod (IQ) i ODN 2006.



Slika 18.a Relativni sadržaj IFN-α u supernatantu PBMC-a stimuliranih različitim fenantridinima, 24 i 48 sati. Stanice su pripremljene u duplikatu, n=2, apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike između nestimuliranih stanica i stanica stimuliranih 24 sata prikazane su s: **P*<0,05; **P*<0,01; statistički značajne razlike između nestimuliranih stanica i stanica stimuliranih 48 sati prikazane su s: ▲*P*<0,05; ▲▲*P*<0,01. Statistički su obrađeni samo uzorci stimulirani poznatim liganadima.
Kratice: IFN-α (Interferon α); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; R848 = rezikvimod; IQ = imikvimod;
ODN 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; DL = $C_{20}H_{25}N_3$;
DU = $C_{28}H_{29}N_7O_4$; FC3A = C22H21N7; FC5A = C24H25N7;
FC3U = $C_{21}H_{20}N_4O_4$; FC5U = $C_{23}H_{24}N_4O_2$; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$;
M-197 = $C_{21}H_{25}N_3O$; SD = standardno odstupanje



Slika 18.b Relativni sadržaj IFN-α u supernatantu PBMC-a stimuliranih različitim fenantridinima, 24 i 48 sati. Stanice su pripremljene u duplikatu, n=2, apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike između nestimuliranih stanica i stanica stimuliranih 24 sata prikazane su s: **P*<0,05; ***P*<0,01; statistički značajne razlike između nestimuliranih stanica i stanica stimuliranih 48 sati prikazane su s: ▲*P*<0,05; ▲▲*P*<0,01. Statistički su obrađeni samo uzorci stimulirani poznatim liganadima.
Kratice: IL-6 (Interleukin 6); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; R848 = rezikvimod; IQ = imikvimod;
ODN 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom;
M-198 = $C_{24}H_{31}N_3O$; M-150 = $C_{21}H_{16}N_2O_2$ x H_2O x HCl, M-46 = $C_{16}H_{15}BrN_2$;
M-182 = $C_{16}H_{16}N_6$ x 2HCl; M-113 = $C_{22}H_{18}N_2O_2$; A170F = $C_{14}H_9NO$;
X-218 = $C_{13}H_{10}N_2$; DA = $C_{30}H_{31}N_{13}$; FL = $C_{17}H_{18}N_2$; SD = standardno odstupanje

Rezultati ovih analiza pokazali su da niti jedan od testiranih spojeva ne dovodi do povećanog izlučivanja IFN-α u supernatantima.

Kao pozitivna kontrola korišteni su supernatanti stanica stimuliranih rezikvimodom (R848, dominantno TLR8 ligand), imikvimodom (TLR7 ligand) i ODN 2006 (TLR9 ligand). Rezultati ispitivanja pokazuju porast izlučivanja IFN-α u supernatantu stanica stimuliranih kontrolnim ligandima, i nakon 24 i nakon 48 sati (slika 18 a i 18 b). Najveći porast uočen je nakon stimulacije rezikvimodom, manji porast nakon stimulacije imikvimodom i najmanji nakon stimulacije s ODN 2006. Kod stanica koje su bile inkubirane u uvjetima bez liganda nije porasla razina IFN-α. Kod svih sedamnaest testiranih spojeva nije došlo do porasta razine IFN-α u supernatantu nakon 24 sata niti nakon 48 sati stimulacije.

Molekula M-199 (1-etil-3-(6-metilfenantridin-8-il)urea) odabrana je za daljnje istraživanje. Nakon uvodne faze ispitivanja možemo zaključiti da je stimulacija stanica

PBMC ligandom M-199 dovela do porasta razine IL-6 u supernatantu stanica koje su bile stimulirane tijekom različitog vremena (24 i 48 sati) te u supernatantu stanica PBMC izoliranih iz tri različita zdrava darivatelja. Porast razine IFN-α nije uočen nakon stimulacije testiranim spojevima.

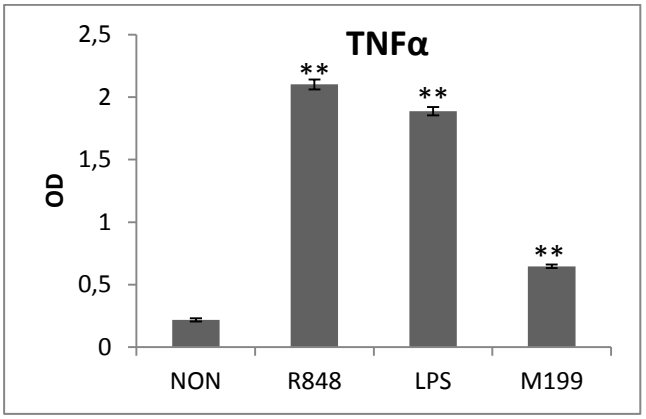
4.3. Ispitivanje djelovanja molekule M-199 na izlučivanje IL-8, TNF-α i IL-1β

Obzirom na činjenicu da niti jedan od testiranih spojeva, pa tako ni M-199, ne pokreće stimulaciju stanica PBMC preko IRF-signalnog puta, na što ukazuju rezultati razine IFN-α u supernatantu stimuliranih stanica, detaljnije smo ispitali potencijalni učinak spojeva putem NF-kB signalnog puta. Odabranom molekulom M-199 stimulirali smo stanice PBMC kako bismo odredili utjecaj na izlučivanje skupine proupalnih citokina koji su pod regulacijom transkripcijskog čimbenika NF-κB, TNF-α, IL-8 i IL-1β.

4.3.1. Učinak na izlučivanje TNF-α

U svrhu određivanja utjecaja spoja M-199 na izlučivanje citokina TNF-α u supernatantu, stanice su obrađene molekulom M-199 u koncentraciji od 5 μmol dm^{-3}. Stimulacija je trajala 24 sata.

Kao pozitivna kontrola korišten je R848 i LPS (lipopolisaharidi vanjske membrane Gram-negativnih bakterija – ligand za TLR4).

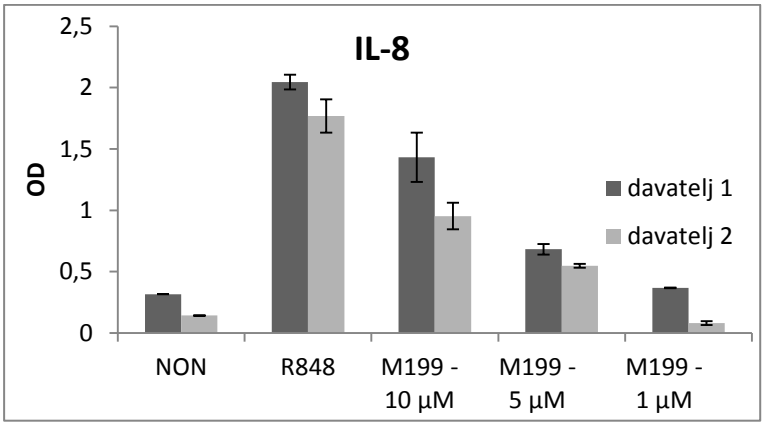


Slika 19. Relativni sadržaj TNF-α u supernatantu PBMC-a. Stanice su 24 sata inkubirane s ligandima te su pripremljene u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice prikazane su s $^{**}P<0,01$.
Kratice: TNF-α (engl. *tumor necrosis factor α*); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; R848 = rezikvimod; LPS = lipopolisaharid; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$; SD = standardno odstupanje

M-199 dovodi do blagog porasta razine TNF-α u supernatantu, pri čemu smo izračunali da postoji statistička značajnost između nestimuliranih uvjeta i uzorka koji je stimuliran s M-199 (slika 19). Očekivani porast razine TNF-α može se uočiti nakon stimulacije sa R848 i LPS. U supernatantu stanica koje su inkubirane bez liganda možemo uočiti minimalnu razinu TNF-α.

4.3.2. Učinak na izlučivanje IL-8

Kako bi ispitali da li je odgovor stanica PBMC na testirani spoj ovisan o koncentraciji spoja, stanice smo obradili padajućim koncentracijama spoja M-199: 10 μmol dm^{-3}, 5 μmol dm^{-3} i 1 μmol dm^{-3} (slika 20). Utjecaj koncentracije liganda na izlučivanje IL-8 istraživan je na stanicama PBMC izoliranim iz dva različita zdrava darivatelja. Stimulacija je trajala 24 sata. Kao pozitivna kontrola korišteni su supernatanti stanica stimulirani rezikvimodom. Dodatna svrha ove analize bila je potvrda imunostimulacijskog djelovanja spoja.

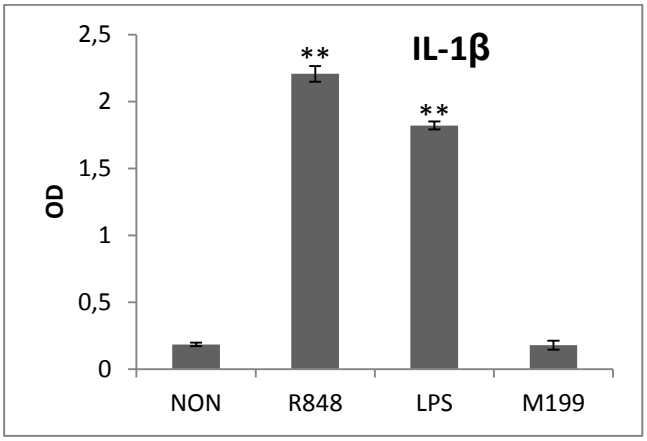


Slika 20. Relativni sadržaj IL-8 u supernatantu PBMC nakon 24 sata stimulacije. U prvom stupcu je prikazan sadržaj IL-8 u supernatantu stanica koje nisu stimulirane, u drugom stupcu je sadržaj nakon stimulacije sa R848, 10 ng/mL, u trećem, četvrtom i petom stupcu prikazan je sadržaj nakon stimulacije sa 10 µmol dm^{-3}, 5 µmol dm^{-3} i 1 µmol dm^{-3} koncentracijom spoja M-199. Stanice su pripremljene u duplikatu, n=2, apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), $OD = A_{450} – A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD.
Kratice: IL-8 (Interleukin 8); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; R848 = rezikvimod; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$; SD = standardno odstupanje

Na slici 20 možemo vidjeti da spoj M-199 potiče izlučivanje IL-8 i da je taj utjecaj ovisan o dozi. Naime padanjem koncentracije spoja M-199 u otopini tijekom stimulacije dolazi do pada relativnog sadržaja IL-8 u supernatantu PBMC-a. Rezultati ispitivanja također pokazuju porast izlučivanja IL-8 u supernatantu stanica stimuliranih kontrolnim ligandom, kod oba davatelja. Stanice koje su bile inkubirane u uvjetima bez liganda pokazale su minimalnu razinu IL-8.

4.3.3. Učinak na izlučivanje IL-1β

U istom pokusu (navedeno pod 4.3.2.) određena je razina IL-1β u supernatantu stanica obrađenih molekulom M-199 u koncentraciji 10 µmol dm^{-3} (slika 21).
Kao pozitivna kontrola korišten je R848 i LPS (lipopolisaharidi vanjske membrane Gram-negativnih bakterija – ligand za TLR4).

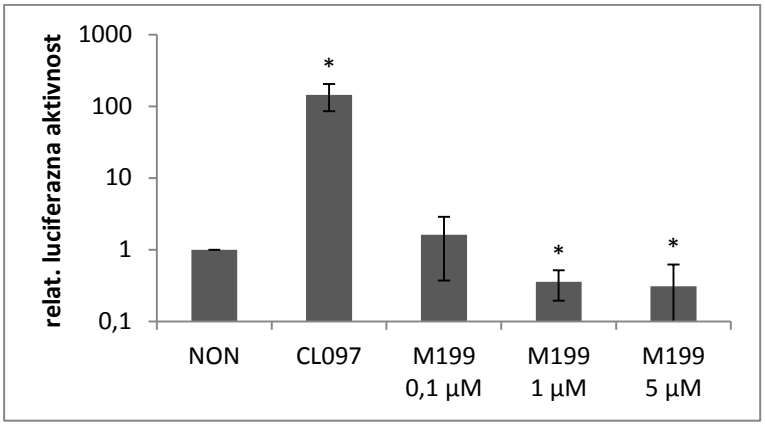


Slika 21. Relativni sadržaj IL-1β u supernatantu PBMC-a. Stanice su 24 sata inkubirane s ligandima te su pripremljene u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice prikazane su s $^{**}P<0,01$.
Kratice: IL-1β (Interleukin 1β); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; R848 = rezikvimod; LPS = lipopolisaharid; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$; SD = standardno odstupanje

Nakon stimulacije testiranom molekulom možemo uočiti da nema porasta razine IL-1β.

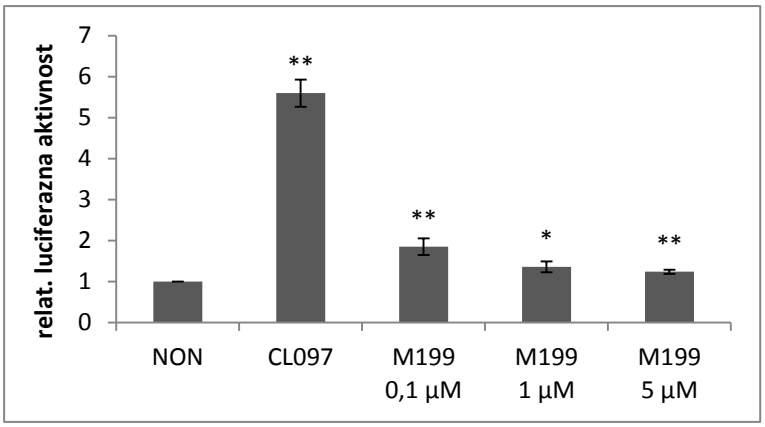
4.4. Rezultati ispitivanja djelovanja molekule M-199 na aktivaciju NF-κB transkripcijskog čimbenika

Obzirom da smo u dosadašnjim pokusima pokazali da testirani spoj ima imunostimulacijsko djelovanje na stanice perifernih mononukleara iz krvi, svrha ovih pokusa bila je ispitati potencijalne mete testiranog spoja. Naime, u ovom pokusu ispitivali smo da li spoj M-199 može stimulirati stanice HEK293 koje su stabilno transfecirane sa genom za TLR7 ili TLR8. Cilj je bio pokazati da je imunostimulacija koja se događa nakon obrade PBMC sa spojem M-199 posljedica vezanja spoja na jedan od ispitivanih *Toll like* receptora. Rezultati analize sa stanicama transfeciranim sa genom za TLR7 odnosno TLR8 pokazali su da imunostimulacijska aktivost spoja M-199 nije posljedica vezanja na navedene receptore.



Slika 22. Rezultati relativne luciferazne aktivnosti HEK293 stanica transfeciranih s genom za TLR7: stupac 1 – ne stimulirane stanice; stupac 2 – stanice stimulirane poznatim ligandom za TLR7 i TLR8, CL097; stupac 3 – stanice stimulirane spojem M-199 u koncentraciji 0,1 µmol dm^{-3}; stupac 4 - stanice stimulirane spojem M-199 u koncentraciji 1 µmol dm^{-3}; stupac 5 - stanice stimulirane spojem M-199 u koncentraciji 5 µmol dm^{-3}. Stanice su preko noći inkubirane s ligandima te su pripremljene u triplikatu, n=3. Oslobođena bioluminiscencija mjerena je na luminometru (Fluoroskan ascent FL, Thermo, Finska). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Zbog velikih razlika u relativnoj luciferaznoj aktivnosti, rezultati su prikazani u logaritamskoj skali. Statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice prikazane su s *P<0,05.
Kratice: HEK293 = stanice bubrega embrija čovjeka; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$;
CL097 = 3M-002, derivat tiozolokinolona; SD = standardno odstupanje

Nas slici 22 vidimo da HEK293 stanice stabilno transfecirane sa genom za TLR7 pokazuju značajan porast relativne luciferazne aktivnosti nakon stimulacije sa poznatim ligandom za TLR7/TLR8, CL097. Nakon stimulacije sa M-199 (0,1 µmol dm^{-3}, 1 µmol dm^{-3}, 5 µmol dm^{-3}) relativna luciferazna aktivnost je u području vrijednosti koje očitavamo na nestimuliranim stanicama – nema značajnog porasta.



Slika 23. Rezultati relativne luciferazne aktivnosti HEK293 stanica transfeciranih s genom za TLR8: stupac 1 – ne stimulirane stanice; stupac 2 – stanice stimulirane poznatim ligandom za TLR7 i TLR8, CL097; stupac 3 – stanice stimulirane spojem M-199 u koncentraciji 0,1 µmol dm^{-3}; stupac 4 - stanice stimulirane spojem M-199 u koncentraciji 1 µmol dm^{-3}; stupac 5 - stanice stimulirane spojem M-199 u koncentraciji 5 µmol dm^{-3}. Stanice su preko noći inkubirane s ligandima te su pripremljene u triplikatu, n=3. Oslobođena bioluminiscencija mjerena je na luminometru (Fluoroskan ascent FL, Thermo, Finska). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice prikazane su s **P*<0,05; ***P*<0,01.
Kratice: HEK293 = stanice bubrega embrija čovjeka; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$;
CL097 = 3M-002, derivat tiozolokinolona; SD = standardno odstupanje

HEK293 stanice stabilno transfecirane sa genom za TLR8 pokazuju porast relativne luciferazne aktivnosti nakon stimulacije sa poznatim ligandom za TLR7/TLR8, CL097. Relativna luciferazna aktivnost, nakon stimulacije sa CL097, je značajno veća kod HEK293 stanica koje izražavaju TLR7. Nakon stimulacije sa M-199 (0,1 µmol dm^{-3}, 1 µmol dm^{-3}, 5 µmol dm^{-3}) relativna luciferazna aktivnost je u području vrijednosti koje očitavamo na nestimuliranim stanicama (slika 23).

4.5. Ispitivanje međudjelovanja molekule M-199 sa sintetskim TLR9 i TLR3 ligandima

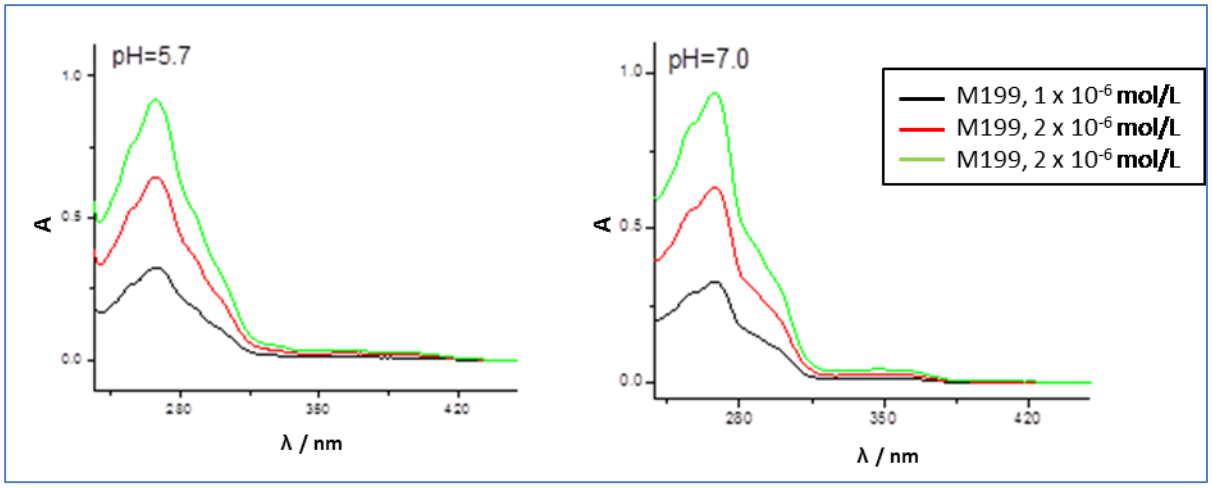
Fizikalno-kemijskim metodama odredili smo da li dolazi do međudjelovanja molekule M-199 i poznatih liganada za TLR9 (ODN 2216 i ODN 2006). U *in vitro* pokusima na kulturama stanica pokušali smo pokazati da međudjelovanja ispitivanih molekula u otopini utječu na stimulaciju poreko TLR9. Utjecaj molekule M-199 na poznati ligand za TLR3 ispitali smo samo na *in vitro* staničnom modelu.

4.5.1. Rezultati spektroskopih analiza

U sklopu ispitivanja fizikalno kemijskih svojstava određena je topljivost spoja M-199. Spoj je slabo topljiv u vodi, temeljna otopina je zbog toga pripremljena u DMSO-u (c = 76,2 mM). Svi dalji eksperimenti izvedeni su uz korištenje navedene otopine.

U UV-Vis spektroskopiji utvrđeno je da dolazi do linearnog porasta apsorbancije s povećanjem koncentracije spoja M-199 do koncentracije 30 µmol dm^{-3} (slika 24).

Absorpcijski maksimumi i odgovarajući molarni ekstinkcijski koeficijenti (ε) navedeni su u Tablici 5.



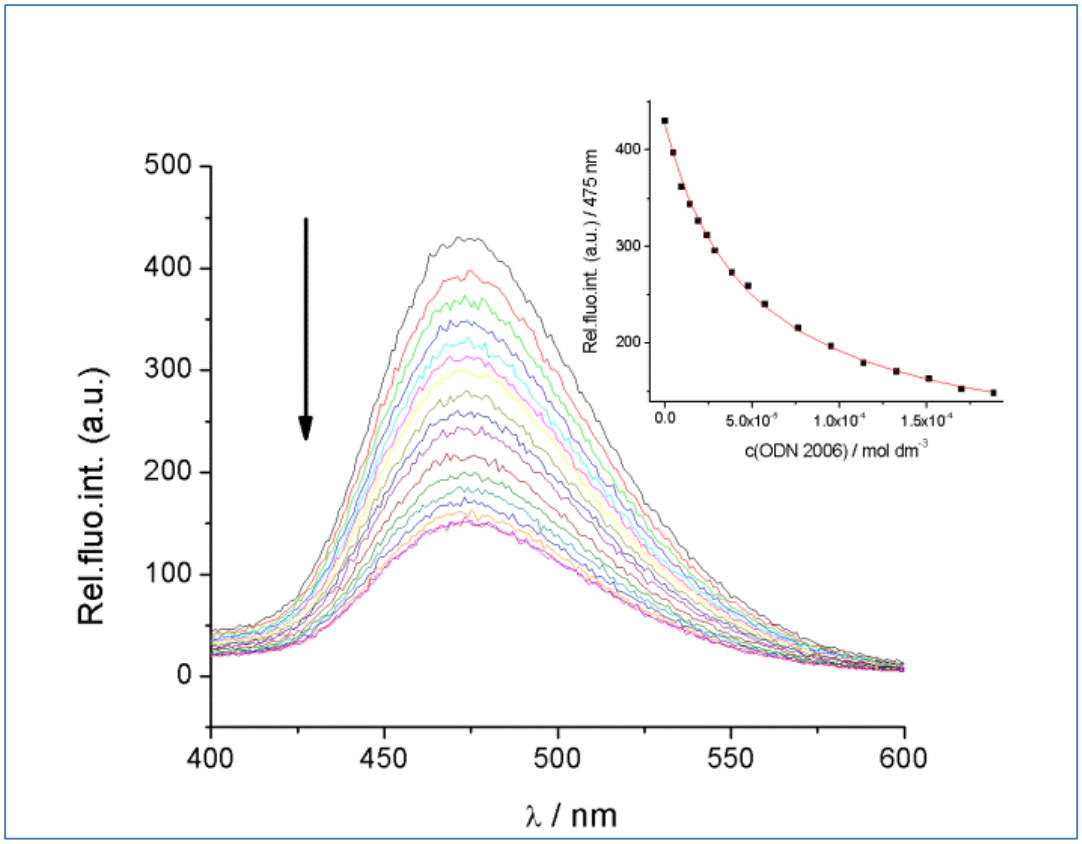
Slika 24. UV/Vis spektri otopina spoja M-199 u rasponu koncentracija od 10 do 30 µmol dm^{-3}, u fosfatnom puferu (I = 0,01 mol dm^{-3}) pH 5,7 i 7,0.

Tablica 5. Valne duljine apsorpcijskih maksimuma i molarni ekstincijski koeficijenti

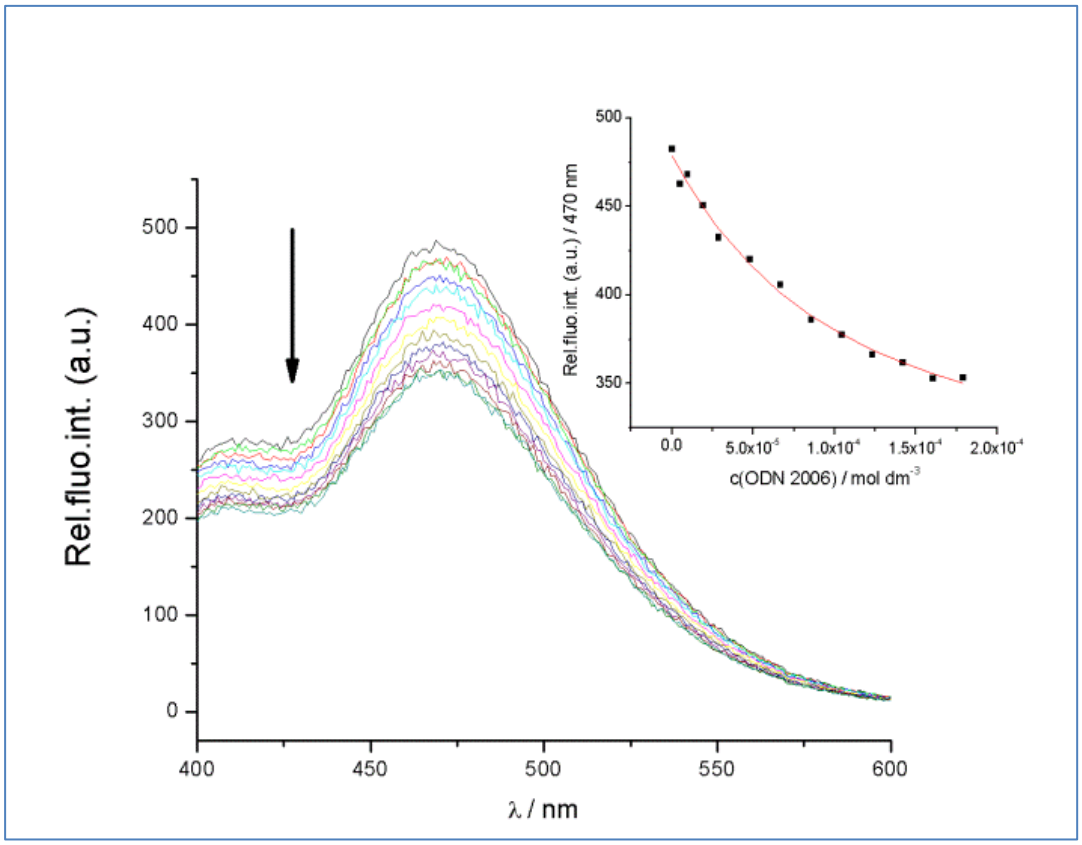
pH	λ_{max} / nm	$\varepsilon \times 10^3$ / mmol^{-1} cm^2
5,7	268	29,7 ± 1,3
7,0	268	30,6 ± 0,01

4.5.1.1 Ispitivanje međudjelovanja sintetskog TLR9 liganda ODN 2006 i molekule M-199 pomoću fluorescencijske titracije

Dodatkom ODN 2006 u vodenu otopinu spoja M-199 primijećeno je gašenje fluorescencije na obje testirane pH-vrijednosti. Snažnije gašenje vidljivo je na pH 5,7, a slabije na pH 7,0 (Slike 25. i 26.).



Slika 25. lijevo: promjene u fluorescenscijskom spektru spoja M-199 (c = 2,4 μmol dm^{-3}) nakon titracije s ODN 2006 ($c = 4{,}8 \times 10^{-6} - 1{,}9 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, λ_{exc} = 325 nm); desno gore: ovisnost absorbancije spoja M-199 (na valnoj duljini λ_{max} = 475 nm) o koncentraciji ODN 2006, u fosfatnom puferu (I = 0,01 mol dm^{-3}) pH 5,7.



Slika 26. lijevo: promjene u fluorescenscijskom spektru spoja M-199 (c = 2,4 μmol dm^{-3}) nakon titracije s ODN 2006 ($c = 4{,}8 \times 10^{-6} - 1{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, λ_{exc} = 325 nm); desno gore: ovisnost absorbancije spoja M-199 (na valnoj duljini λ_{max} = 470 nm) o koncentraciji ODN 2006, u fosfatnom puferu (I = 0,01 mol dm^{-3}) pH 7,0.

Tablica 6. Konstante vezanja (logKs)[a] i omjeri n[b] ([vezani spoj]/[oligodeoksinukleotid fosfat] izračunati iz fluorescencijske titracije spoja M-199 s ODN 2006, u fosfatnom puferu (I = 0,01 mol dm^{-3}) pH 5,7 i 7,0.

pH	I/I_0[c]	log Ks	n
5,7	0,2	4,5	0,68
7,0	0,6	5,4	0,06

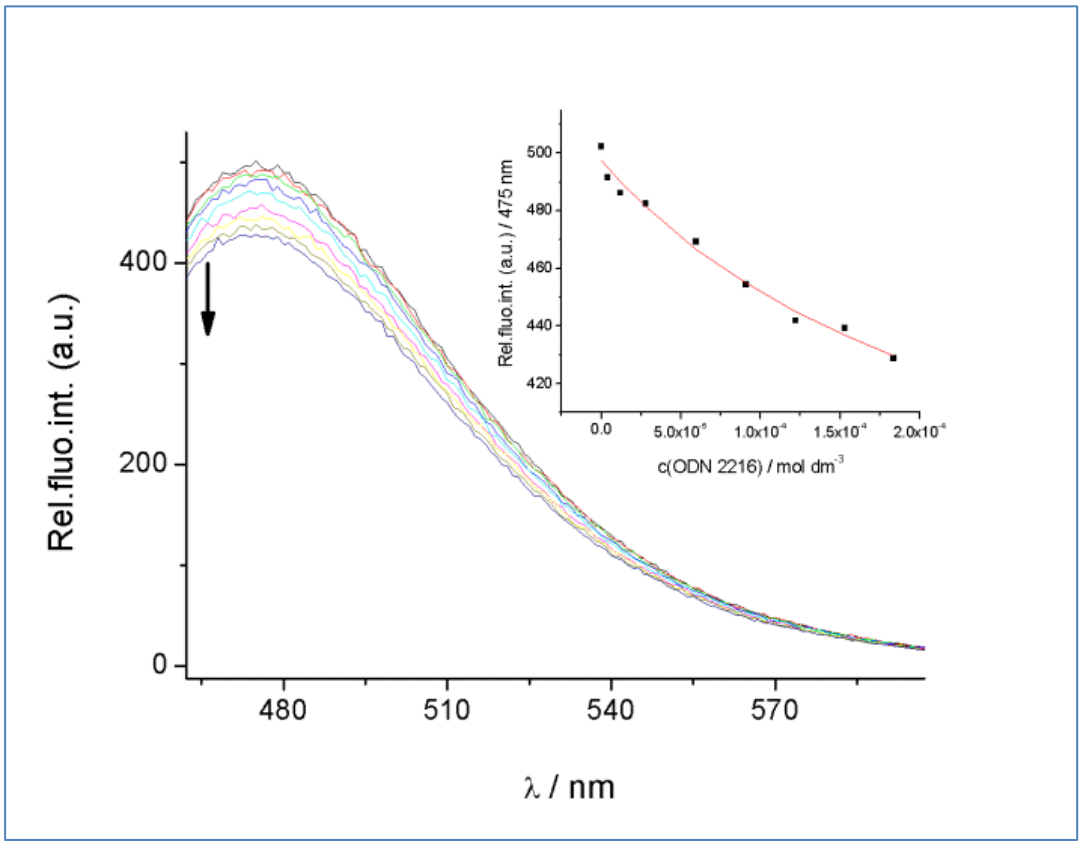
[a] podaci dobiveni tijekom titracije obrađeni su pomoću Scatchardove jednadžbe;
[b] točnost vrijednosti n je ± 10 – 30%, s tim u skladu vrijednosti konstante vezanja (logKs) izražene su s istom točnošću;
[c] I_0 – početni intenzitet flurescencije otopine spoja M-199, I – intenzitet fluorescencije otopine kompleksa M-199/ODN 2006 izračunat iz Scatchardove jednadžbe [(79)].

Konstante vezanja i omjeri $n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{oligodeoksinukleotid fosfat}]}$ dobiveni obradom podataka fluorimetrijske titracije Scatchardovom jednadžbom navedeni su u Tablici 6. Spektralne

promjene koje nastaju tijekom titracije sa ODN 2006 bile su manje izražene u neutralnim uvjetima u usporedbi sa slabo kiselim uvjetima. Pri obje pH-vrijednosti, molekula M-199 pokazuje sličan afinitet prema ODN 2006, iako se može zamijetiti nešto jače vezanje pri neutralnim uvjetima u usporedbi sa vezanjem u blago kiselim uvjetima (slika 25 i 26).

4.5.1.2. Ispitivanje međudjelovanja sintetskog TLR9 liganda ODN 2216 i molekule M-199 pomoću fluorescencijske titracije

Dodatkom ODN 2216 u vodenu otopinu spoja M-199 na pH-vrijednosti 5,7 primijećeno je slabo gašenje fluorescencije, dok na pH-vrijednosti 7,0 nisu zamijećene značajne promjene spektra M-199 tijekom titracije (slika 27).



Slika 27. lijevo: promjene u fluorescenscijskom spektru spoja M-199 (c = 2,4 μmol dm^{-3}) nakon titracije s ODN 2216 ($c = 4{,}0 \times 10^{-6} - 1{,}8 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}, λ_{exc} = 325 nm); desno gore: ovisnost absorbancije spoja M-199 (na valnoj duljini λ_{max} = 475 nm) o koncentraciji ODN 2216, u fosfatnom puferu (I = 0,01 mol dm^{-3}) pH 5,7.

Tablica 7. Konstante vezanja (log*Ks*)[a] i omjeri *n*[b] ([vezani spoj]/[oligodeoksinukletid fosfat] izračunati iz fluorescencijske titracije spoja M-199 s ODN 2216, u fosfatnom puferu (*I* = 0,01 mol dm^{-3}) pH 5,7 i 7,0.

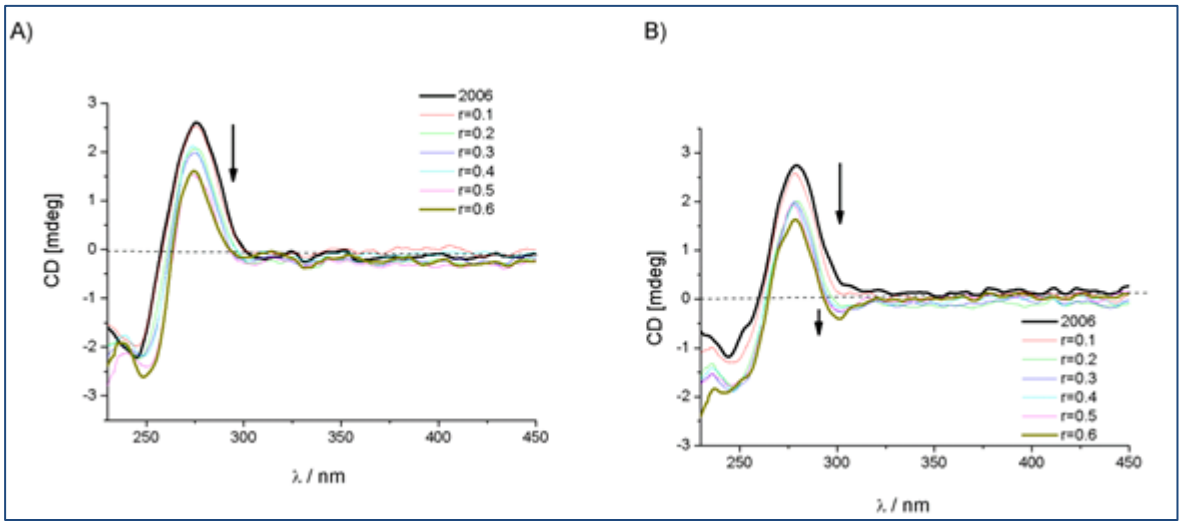
pH	I/I_0[c]	log *Ks*	*n*
5,7	0,73	4,04	0,44
7,0	-[d]	-[d]	-[d]

[a] podaci dobiveni tijekom titracije obrađeni su pomoću Scatchardove jednadžbe;
[b] točnost vrijednosti n je ± 10 – 30%, s tim u skladu vrijednosti konstante vezanja (log*Ks*) izražene su s istom točnošću;
[c] I_0 – početni intenzitet flurescencije otopine spoja M-199, *I* – intenzitet fluorescencije otopine kompleksa M-199/ODN 2216 izračunat iz Scatchardove jednadžbe (79)
[d] promjene fluorescencije spoja M-199 tijekom titracije s ODN 2216 bile su premale što onemogućava izračun konstanti vezanja prihvatljive točnosti.

Konstante vezanja i omjeri $n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{oligodeoksinukleotid fosfat}]}$ dobivene obradom podataka fluorimetrijske titracije Scatchardovom jednadžbom navedeni su u Tablici 7. Spektralne promjene koje nastaju tijekom titracije s ODN 2216 pri neutralnim uvjetima nisu bile značajne u usporedbi s promjenama koje su nastale u slabo kiselim uvjetima. Promjene spektra spoja M-199, koje nastaju titracijom sa ODN 2216 pri pH-vrijednosti 5,7, bile su dovoljnog intenziteta za izračun konstante vezanja zadovoljavajuće točnosti (slika 27).

4.5.1.3. Ispitivanje međudjelovanja sintetskog TLR9 liganda ODN 2006 i molekule M-199 pomoću CD titracije

CD spektroskopija je odabrana kao metoda pomoću koje se može dobiti uvid u konformacijske promjene sekundarne strukture polinukleotida koje su posljedica vezanja malih molekula (80, 81). Vezanjem akiralnih malih molekula na polinukleotide može nastati inducirani CD spektar (ICD) iz kojeg se mogu dobiti korisne informacije o vrsti međudjelovanja male molekule s DNA ili RNA (80). Istraživani spoj, M-199, je akiralan i ne posjeduje intrinzički CD spektar.



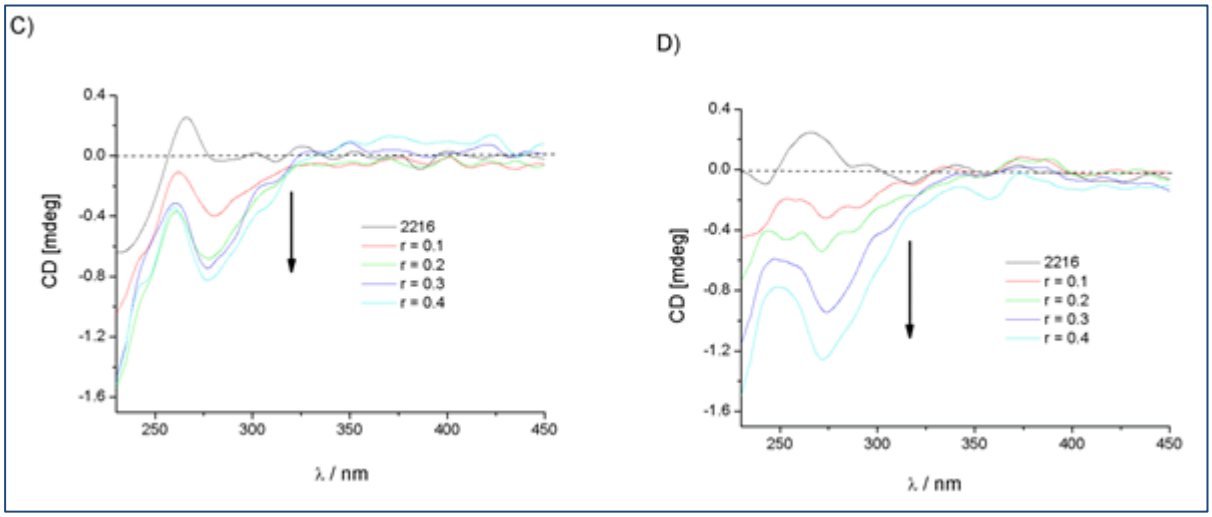
Slika 28. CD titracije ODN 2006 (c = 30 μmol dm^{-3}) sa spojem M-199 pri molarnim omjerima r = [spoj]/[polinukleotid] u fosfatnom puferu (I = 0,01 mol dm^{-3}); lijevo: pri pH 5,7, desno: pri pH 7,0.

Dodatkom spoja M-199 došlo je do pada intenziteta CD spektra ODN 2006 na 277 nm pri obje ispitivane pH-vrijednosti (slika 28). Budući da ispitivani spoj ima UV/Vis spektar u području od 230 do 430 nm (slika 24) i nema intrinzičku CD aktivnost, uočeni ICD spektar može biti posljedica dodatka spoja. Pri pH 5,7 nije primijećen značajni ICD spektar oko 300 nm. Razlog tomu može biti izostanak dominantne orijentacije molekula M-199 u odnosu na kiralnu os ODN 2006 ili se slabi negativni ICD spektar (koji bi nastao kao posljedica interkaliranja) ne može uočiti zbog zapaženog smanjenja CD spektra oligodeoksinukleotida na 277 nm. Za razliku od slabo kiselih uvjeta pri pH 7,0 primjećen je negativni ICD spektar slabog intenziteta na 301 nm, što govori da su molekule spoja M-199 jednako orijentirane u kompleksu s ODN 2006. Takva orijentacija vjerojatno je posljedica učinkovitog umetanja spoja M-199 između baza.

Na osnovu rezultata fluorimetrijske i CD titracije možemo zaključiti da spoj M-199 interkalira između parova baza ODN 2006 pri neutralnom pH, dok su pri slabo kiselim uvjetima prisutna i elektrostatska međudjelovanja između pozitivno nabijenih slobodnih molekula M-199 i negativno nabijenih fosfata iz oligonukletida. Dobro je poznato da je dušik iz heterocikličkog prstena fenantridina protoniran pri kiselim uvjetima [78, 82-84]. Također je prije potvrđeno da u urea-fenantridinskim konjugatima, urea ima značajan utjecaj na afinitet protoniranja dušika iz fenantridinskog heteroaromatskog prstena [78, 82].

4.5.1.4. Ispitivanje međudjelovanja sintetskog TLR9 liganda ODN 2216 i molekule M-199 pomoću CD titracije

Dodatkom spoja M-199 u otopinu ODN 2216, pri obje ispitivane pH-vrijednosti, nastao je jaki negativni ICD spektar u području valnih duljina od 240 do 340 nm (slika 29). U slabo kiselim uvjetima (pH 5,7) pri omjeru koncentracija r = 0,2, može se uočiti zasićenje oligodeoksinukleotida s molekulom M-199. Pri neutralnim uvjetima, možemo primijetiti precipitaciju pri omjeru većem od r = 0,3.



Slika 29. CD titracije ODN 2216 (c = 50 μmol dm^{-3}) sa spojem M-199 pri molarnim omjerima r = [spoj]/[polinukleotid] u fosfatnom puferu (I = 0,01 mol dm^{-3}); lijevo: pri pH 5,7, desno: pri pH 7,0.

Na temelju rezultata fluorimetrijske i CD titracije može se zaključiti da u blago kiselim uvjetima, kada je heterociklički dušik protoniran, molekule spoja M-199 najvjerojatnije ne interkaliraju između baza ODN 2216, nego dolazi do elektrostatskih međudjelovanja između negativno nabijene okosnice oligonukleotida i pozitivno nabijenog spoja M-199. Značajno smanjenje CD spektra ODN-a, koje je jače izraženo u neutralnim uvjetima, navodi nas na zaključak da molekule M-199 aglomeriraju duž molekule ODN 2216.

4.5.2. Rezultati ispitivanja imunomodulacijskog djelovanja molekule M-199 na stimulaciju TLR9 posredovanu s ODN 2216

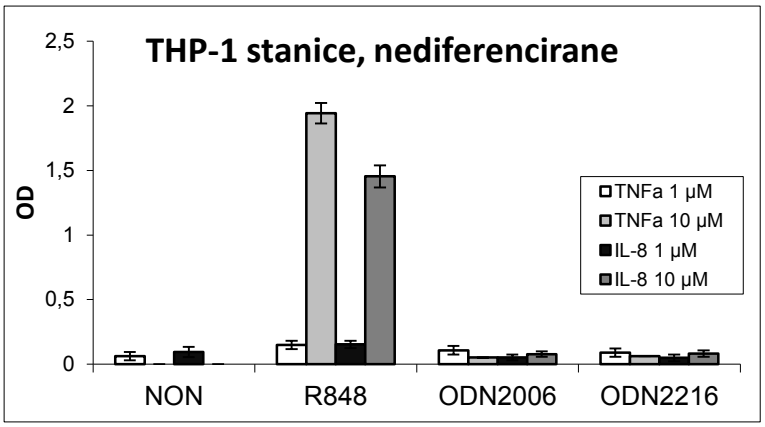
U fizikalno-kemijskim ispitivanjima utvrđeno je da dolazi do međudjelovanja između M-199 i poznatih TLR9 liganada. ODN 2216, oligodeoksinukleotid tipa A, stupa pri blago kiselim uvjetima u elektrostatske interakcije s M-199, dok u neutralnim uvjetima dolazi do aglomeracije molekula M-199 duž oligodeoksinukleotida.

4.5.2.1. Rezultati analize u THP-1 staničnom modelu

Obzirom na literaturne podatke, poznato je da stanice THP-1 ne odgovaraju na stimulaciju specifičnim ligandom za TLR9. Stoga ih je bilo potrebno diferencirati u makrofage kako bi omogućili stimulaciju preko TLR9 i mjerili rezultat stimulacije. Stanice THP-1 su diferencirane pomoću forbol-12-miristat-13-acetata (PMA). Tijekom diferencijacije monociti diferenciraju u makrofage. Tijekom razvoja metode ispitivali smo koja je koncentracija PMA, vrijeme diferencijacije i stimulacije optimalno za mjerenje učinka stimulacije specifičnim ligandom za TLR9. Također, ispitivali smo i razine dva različita citokina u supernatantu, kako bi zaključili koji od mogućih odziva je prihvatljiviji za naša ispitivanja. Iz provedenih eksperimenata zaključili smo da su optimalni uvjeti provođenja diferencijacije 18 sati a odabrana koncentracija PMA je 10 ng/mL. Prihvatljivo vrijeme stimulacije je 5 sati. Također, pokazano je da je praćenje izlučivanja citokina TNF-α prihvatljivo obzirom da je odziv citokina IL-8 bio previsok i u nestimuliranim uvjetima, kao posljedica diferencijacije stanične linije THP-1 u makrofage. Naime, već u nestimuliranim uvjetima sama diferencijacija je pobudila izlučivanje IL-8 u količinama koje nisu omogućavale razlikovanje nestimuliranih i stimuliranih uvjeta.

4.5.2.1.1. Određivanje optimalnih uvjeta diferencijacije i stimulacije stanica THP-1

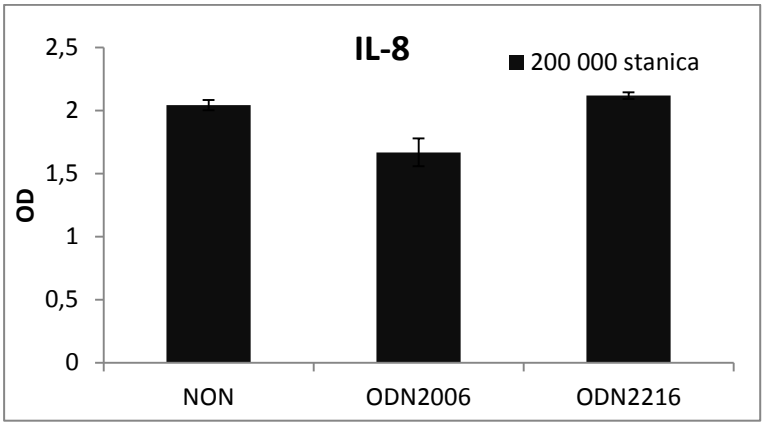
U početnom pokusu, kada stanice THP-1 nisu bile diferencirane, pokazali smo da nakon stimulacije specifičnim ligandima za TLR9 nemamo odgovora na stimulaciju. Na pločice sa 24 jažice nasadili smo 1 x 10^5 stanica po jažici. Stanice smo preko noći stimulirali sa rezikvimodom (R848), kao kontrolnim ligandom, te ODN 2006 i ODN 2216 u koncentracijama 1 i 10 μM.



Slika 30. Relativni sadržaj TNF-α i IL-8 u supernatantu stanica stimuliranih sa 1 i 10 µmol dm^{-3} R848, ODN 2006 i ODN 2216. Stanice su preko noći inkubirane s ligandima te su pripremljene u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD.
Kratice: TNF-α (engl. *tumor necrosis factor α*); IL-8 = Interleukin 8; THP-1 = monociti iz periferne krvi čovjeka oboljelog od akutne monocitne leukemije; NON = nestimulirane stanice; R848 = rezikvimod; CpG 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; CpG 2216 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; SD = standardno odstupanje

Na slici 30 možemo uočiti kako nije došlo do porasta sadržaja TNF-α i IL-8 nakon stimulacije sa 1 µM koncentracijom poznatih liganada za TLR7, 8 i 9 (R848, ODN 2006, ODN 2216). Također nakon stimulacije sa 10 µmol dm^{-3} koncentracijom ODN 2006 i ODN 2216 nema porasta razine u odnosu na nestimulirane uvjete. Porast razine citokina TNF-α i IL-8 uočen je nakon stimulacije sa 10 µmol dm^{-3} R848. Rezultati ovog pokusa naveli su nas na zaključak da je potrebno diferencirati THP-1 stanice, monocitnu staničnu liniju, u makrofage. Naime stanice THP-1 bi nakon diferencijacije trebale imati izražen TLR9 te bi se mogle stimulirati pomoću oligodeoksinukleotida. Prema dostupnoj literaturi jedan od poznatih reagensa koji se koristi za diferencijaciju THP-1 stanica je PMA.

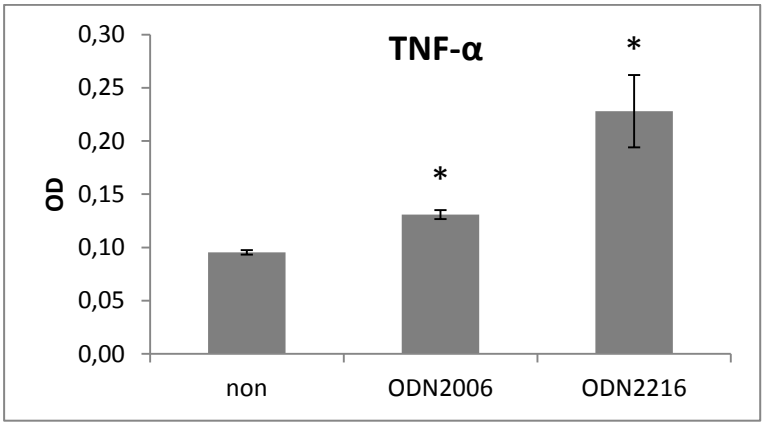
U svrhu odabira interleukina kojeg ćemo pratiti tijekom pokusa, na mikrotitarske pločice sa 24 jažice nasadili smo 2 x 10^5 stanica. Stanice smo diferencirali tijekom 48 sati pomoću PMA u koncentraciji 20 ng/mL. Nakon diferencijacije izveli smo prekonoćnu stimulaciju sa ODN 2006 i ODN 2216 u 10 µmol dm^{-3} koncentraciji. U završnoj fazi pokusa u supernatantu smo odredili sadržaj IL-8.



Slika 31. Relativni sadržaj IL-8 u supernatantu stanica stimuliranih sa 10 μmol dm^{-3} ODN 2006 i ODN 2216, supernatant je deset puta razrjeđen. THP-1 stanice su diferencirane u PMA tijekom 48 sati, te su preko noći inkubirane s ligandima. Uzorci su pripremljene u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD.
Kratice: IL-8 = Interleukin 8; THP-1 = monociti iz periferne krvi čovjeka oboljelog od akutne monocitne leukemije; PMA = forbol-12-miristat-13-acetat; NON = nestimulirane stanice; ODN 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; ODN 2216 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; SD = standardno odstupanje

Na slici 31 prikazan je rezultat određivanja sadržaja IL-8 u supernatantu stanica nakon stimulacije sa poznatim TLR9 ligandima. Možemo zaključiti kako je sadržaj IL-8 već vrlo visok u supernatantu nestimuliranih stanica (unatoč razrjeđenju supernatanta) te da nema značajne razlike između sadržaja IL-8 u stimuliranim i nestimuliranim uvjetima. U ovom pokusu je zaključeno da IL-8 nije prikladan za praćenje stimulacije u THP-1 stanicama. Svi daljni pokusi na staničnoj liniji THP-1 rađeni su tako da je kao mjera aktivnosti testiranog spoja, te međudjelovanja spoja i poznatog liganda, korišten TNF-α.

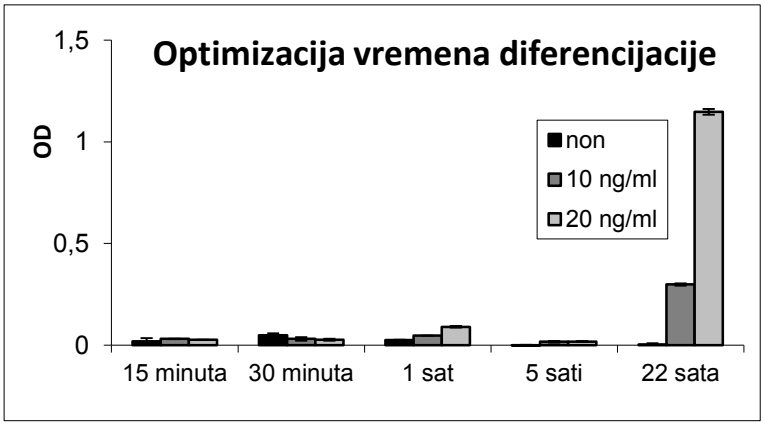
U slijedećem pokusu smo pokazali da je ODN 2216 ligand pogodniji za praćanje međudjelovanja M-199 i poznatih TLR9 liganada. Na mikrotitarske pločice sa 24 jažice nasadili smo 2 x 10^5 stanica. Stanice smo diferencirali tijekom 5 dana pomoću PMA u koncentraciji 20 ng/mL. Nakon diferencijacije izveli smo stimulaciju sa ODN 2006 i ODN 2216 u 10 μmol dm^{-3} koncentraciji. Stimulacija je trajala preko noći, odnosno 18 sati. U supernatantu smo odredili sadržaj TNF-α.



Slika 32. Relativni sadržaj TNF-α u supernatantu stanica stimuliranih sa 10 μmol dm^{-3} ODN 2006 i ODN 2216. THP-1 stanice su diferencirane u PMA tijekom 5 dana, te su preko noći inkubirane s ligandima. Uzorci su pripremljene u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice prikazane su s *P< 0,05.
Kratice: TNF-α (engl. *tumor necrosis factor α*); THP-1 = monociti iz periferne krvi čovjeka oboljelog od akutne monocitne leukemije; PMA = forbol-12-miristat-13-acetat; NON = nestimulirane stanice; ODN 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; ODN 2216 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; SD = standardno odstupanje

Na slici 32 možemo uočiti kako nakon stimulacije sa poznatim TLR9 ligandom tipa B – ODN 2006 dolazi do slabije stimulacije diferenciranih THP-1 stanica. Vidimo da u supernatantu stanica stimuliranih s ODN 2006 dolazi do porasta razine TNF-α koji je približan razini TNF-α izmjerenoj u supernatantu nestimuliranih stanica. Razina TNF-α izmjerena u supernatantu stanica stimuliranih s ODN 2216 približno je dvostruko veća od razine TNF-α koju mjerimo bez stimulacije. Nasuprot vidljivoj razlici u mjerenim razinama, Studentovim t-testom pokazana je značajna razlika između nestimuliranih uvjeta i uzoraka obrađenih s oba liganda.

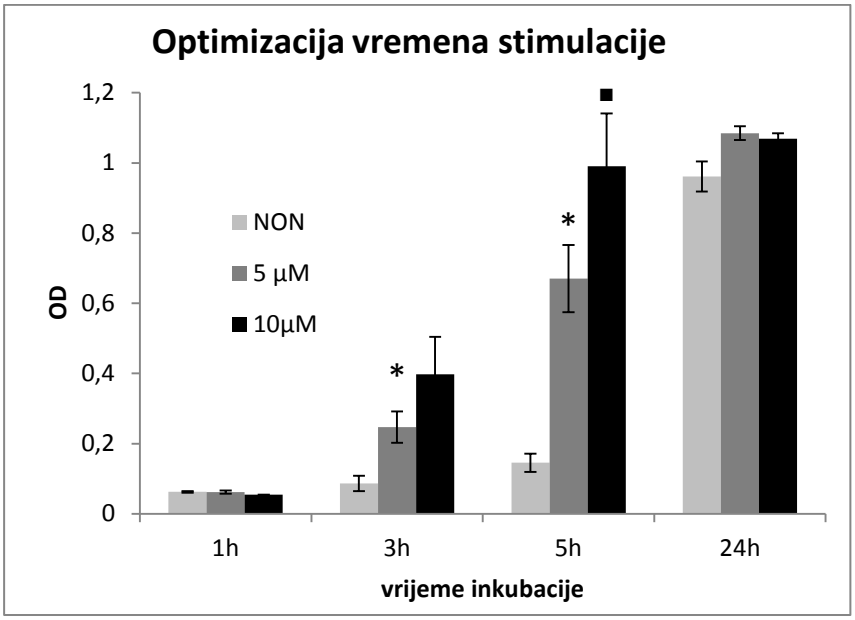
U svrhu određivanja optimalnog trajanja diferencijacije THP-1 stanica i određivanja pogodne koncentracije PMA potrebne za diferencijaciju, na pločice sa 24 jažice nasadili smo 1 x 10^5 stanica po jažici. Stanice smo diferencirali sa 10 i 20 ng/mL PMA. Diferencijacija je trajala: 15 minuta, 30 minuta, 1 sat, 5 sati odnosno 22 sata. Svrha pokusa je bila odrediti vremensku točku u kojoj je došlo do diferencijacije monocita u makrofage ali još nije došlo do sekrecije TNF-α koja nije ovisna o stimulaciji.



Slika 33. Relativni sadržaj TNF-α u supernatantu stanica diferenciranih sa 10 i 20 ng/mL PMA. THP-1 stanice su diferencirane u PMA tijekom 15 minuta, 30 minuta, 1 sat, 5 sati odnosno 22 sata (naznačeno na osi x). Uzorci su pripremljeni u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD.
Kratice: TNF-α (engl. *tumor necrosis factor α*); THP-1 = monociti iz periferne krvi čovjeka oboljelog od akutne monocitne leukemije; PMA = forbol-12-miristat-13-acetat; NON = nestimulirane stanice; SD = standardno odstupanje

Na slici 33 Možemo vidjeti kako nakon 5 sati diferencijacije još uvijek nemamo povećanja sadržaja TNF-α neovisno o koncentraciji PMA upotrebljenoj za stimulaciju. Nakon 22 sata stimulacije došlo je do porasta sadržaja TNF-α u supernatantu stanica diferenciranih sa PMA. Primjenom PMA u koncentraciji 20 ng/mL došlo je do višestrukog povećanja razine TNF-α u supernatantu odnosu na PMA u koncentraciji 10 ng/mL. Rezultati ovih analiza pokazali su da su optimalni uvjeti analize slijedeći: trajanje diferencijacije od 18 sati (preko noći) te koncentracija PMA od 10 ng/mL.

Svrha sljedećeg pokusa je bila odrediti vrijeme stimulacije stanica u kojem se postiže zadovoljavajuća razlika u odgovoru između nestimuliranih i stimuliranih stanica, te određivanje optimalne koncentracije TLR liganda. Na pločice sa 96 jažica nasadili smo 1 x 10^5 stanica po jažici. Stanice smo diferencirali sa 10 ng/mL PMA. Diferencijacija je trajala 18 sati. Nakon diferencijacije stanice smo stimulirali sa ODN 2216 (5 i 10 μmol dm^{-3}) otopljen u mediju sa dodanim PMA. Stimulacija je trajala: 1 sat, 3 sata, 5 sati i 24 sata.



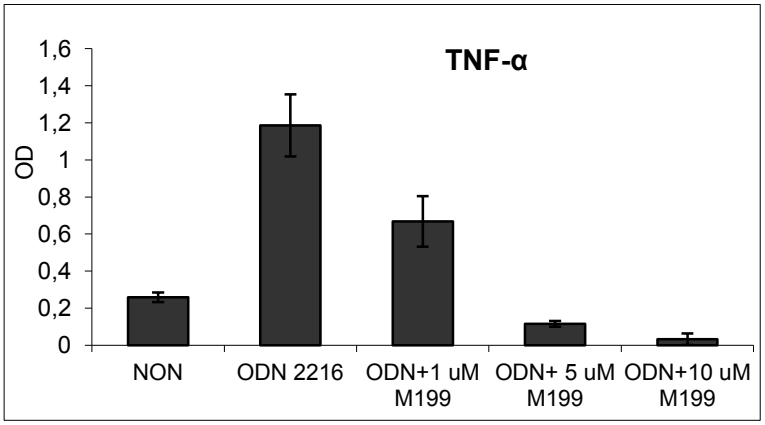
Slika 34. Relativni sadržaj TNF-α u supernatantu stanica diferenciranih sa 10 ng/mL PMA, tijekom 18 sati. Prikazane su nestimulirane stanice i stanice koje su stimulirane sa 5 i 10 µmol dm^{-3} ODN 2216. Trajanje stimulacije: 1 sat, 3 sata, 5 sati i 24 sata. Uzorci su pripremljene u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike u odnosu na nestimulirane stanice prikazane su s *P< 0,05 – za koncentraciju ODN 2216 5 µmol dm^{-3} i ▪P< 0,05 – za koncentraciju ODN 2216 10 µmol dm^{-3}.
Kratice: TNF-α (engl. *tumor necrosis factor α*); THP-1 = monociti iz periferne krvi čovjeka oboljelog od akutne monocitne leukemije; PMA = forbol-12-miristat-13-acetat; NON = nestimulirane stanice; SD = standardno odstupanje

Najveća razlika u sadržaju TNF-α između stimuliranih i nestimuliranih stanica primijećena je u supernatantu stanica koje su bile 5 sati stimulirane 10 µmol dm^{-3} otopinom ODN 2216 (slika 34). Studentovim t-testom potvrđena je statistička značajnost razlike između oba uzorka obrađena ligandom tijekom 5 sati i nestimuliranog uzorka. Statistička značajnost je P<0,05. Nakon 24 sata stimulacije s ODN 2216 otopljenim u mediju s PMA, neovisno o koncentraciji liganda (5 ili 10 µmol dm^{-3}), gubi se razlika između stimuliranih i nestimuliranih stanica.

4.5.2.1.2. Rezultati analize u diferenciranim stanicama THP-1

Nakon određivanja optimalnih uvjeta diferencijacije i stimulacije pristupili smo pokusu u kojem smo ispitivali ujecaj kostimulacije diferenciranih THP-1 stanica na izlučivanje citokina TNF-α. THP-1 stanice nasađene su na pločice sa 24 jažice, 1 x 10^5 stanica po jažici. Nakon prekonoćne (18 sati) diferencijacije sa 10 ng/mL PMA, stanice su isprane i stimulirane 5 sati sa 10 µmol dm^{-3} ODN 2216, odnosno sa smjesom 10 µmol dm^{-3} ODN 2216 i rastućim

koncentracijama spoja M-199: 1 μmol dm^{-3}, 5 μmol dm^{-3} i 10 μmol dm^{-3}. U supernatantu je određen sadržaj TNF-α.

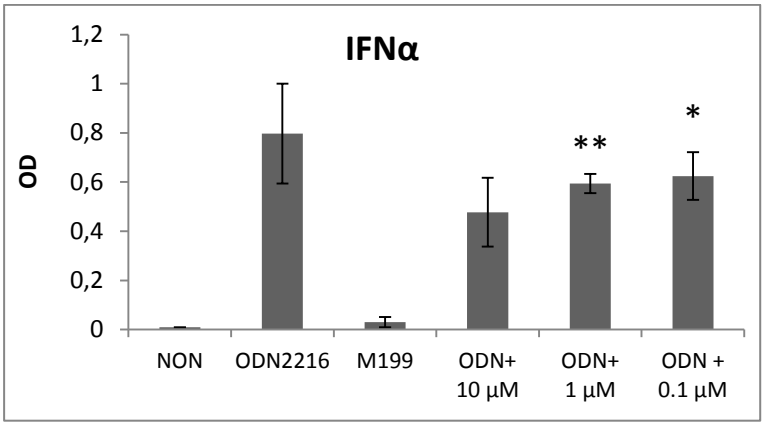


Slika 35. Relativni sadržaj TNF-α u supernatantu THP-1 stanica nakon 18 sati diferencijacije s 10 ng/mL PMA. U prvom stupcu je prikazan sadržaj TNF-α u supernatantu stanica koje nisu dalje stimulirane, u drugom stupcu je sadržaj nakon 5 sati stimulacije sa 10 μmol dm^{-3} ODN 2216, u trećem, četvrtom i petom stupcu prikazan je sadržaj nakon kostimulacije sa 10 μmol dm^{-3} ODN 2216 i 1 μmol dm^{-3}, 5 μmol dm^{-3} i 10 μmol dm^{-3} koncentracijom spoja M-199 u smjesi. Uzorci su pripremljene u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), $OD = A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD.
Kratice: TNF-α (engl. *tumor necrosis factor α*); THP-1 = monociti iz periferne krvi čovjeka oboljelog od akutne monocitne leukemije; PMA = forbol-12-miristat-13-acetat; NON = nestimulirane stanice; ODN 2216 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; SD = standardno odstupanje

Na slici 35 možemo vidjeti da dodatkom spoja M-199 u otopinu ODN 2216 tijekom stimulacije dolazi do pada relativnog sadržaja TNF-α u supernatantu THP-1 stanica diferenciranih pomoću PMA. Pad razine TNF-α obrnuto je proporcionalan koncentraciji spoja M-199, porastom koncentracije spoja smanjuje se razina TNF-α.

4.5.2.2. Rezultati analize u PBMC staničnom modelu

Mononuklearne stanice iz periferne krvi tri različita davatelja obrađene su sa ODN 2216, 10 μmol dm^{-3}, kao pozitivna kontrola (TLR9 ligand iz skupine A, koji predominantno potiče izlučivanje IFN-α), M-199 i smjesama ODN 2216 / M-199 u različitim omjerima. U pokusu je analizirana promjena razine IFN-α u supernatantu.



Slika 36. Relativni sadržaj IFN-α u supernatantu PBMC-a nakon kostimulacije s poznatim ligandima i M-199. Stanice su 24 sata inkubirane s ligandima te su pripremljene u duplikatu, n=2. Apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike u odnosu na stanice stimulirane sa ODN 2216 prikazane su s **P*<0,05 i ***P*<0,01.
Kratice: IFN-α (Interferon α); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; ODN 2216 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$; SD = standardno odstupanje

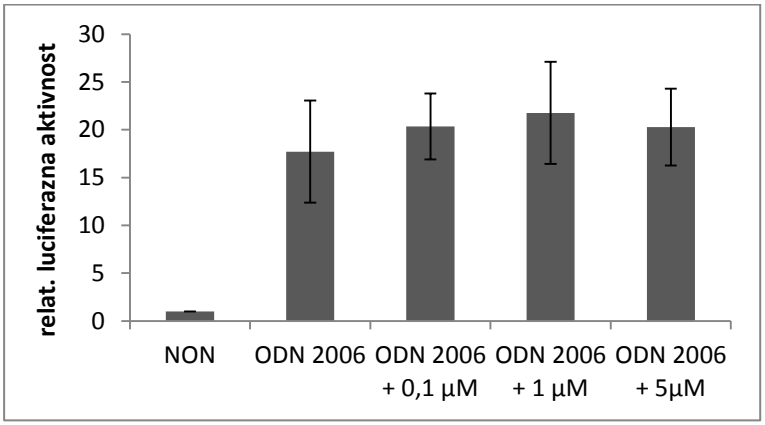
Iz podataka na slici 36 možemo zaključiti da dodatak spoja M-199 djeluje na stimulaciju lučenja IFN-α pomoću ODN 2216. Studentovim t-testom pokazano je da dodatak M-199 u koncentracijama 0,1 μmol dm^{-3} i 1 μmol dm^{-3} statistički značajno smanjuju sadržaj IFN–α (*P*<0,05, *P*<0,01). Zbog visoke varijabilnosti nije zabilježena statistička značajnost u razlici razina IFN-α između uzorka tretiranog s ODN 2216 i uzorka u koji je dodan spoj M-199 u koncentraciji 10 μmol dm^{-3}. Na slici 36 također vidimo da smanjenje sadržaja IFN-α nije ovisno o dozi spoja M-199. Nadalje, M-199 ne potiče lučenje IFN-α.

4.5.3. Rezultati ispitivanja imunomodulacijskog djelovanja molekule M-199 na stimulaciju TLR9 posredovanu s ODN 2006

Molekula M-199 u neutralnim uvjetima interkalira između baza ODN 2006 (oligodeoksinukleotid tipa B) dok u blago kiselim uvjetima dolazi do interkaliranja i elektrostatskih međudjelovanja. U slijedećim pokusima pokušali smo utvrditi da li dokazana međudjelovanja M-199 s poznatim ligandom imaju utjecaj na kostimulaciju u različitim staničnim modelima.

Praćeni su relativni sadržaji citokina IL-8, odnosno relativna luciferazna aktivnost koja je posljedica indukcije NF-κB.

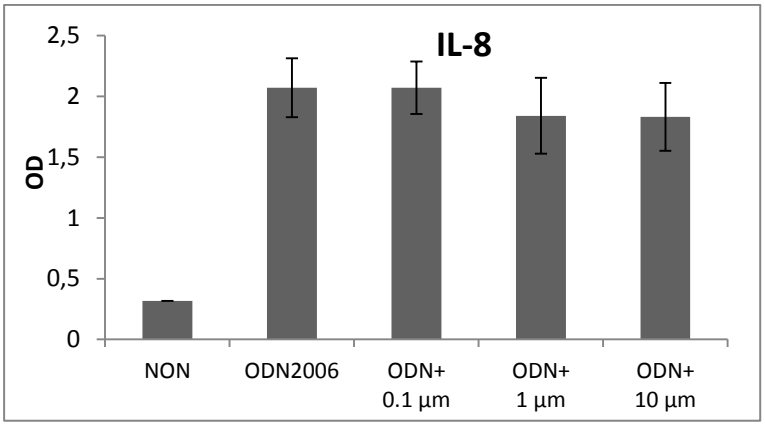
U ovom pokusu ispitivali smo da li spoj M-199 dovodi do modulacije signala koji nastaje stimulacijom HEK293 stanica stabilno transfeciranh sa genom za TLR9. Cilj je bio pokazati da međudjelovanje ODN 2006 i spoja M-199 (pokazano fluorimetrijskom i CD titracijom) ima za posljedicu promjenu signala koji se provodi preko TLR9. Rezultati analize pokazali su da dokazano kemijsko međudjelovanje ne utječe na promjenu signala na stanicama transfeciranim sa genom za TLR9.



Slika 37. Rezultati relativne luciferazne aktivnosti HEK293 stanica transfeciranih s genom za TLR9: stupac 1 – ne stimulirane stanice; stupac 2 – stanice stimulirane poznatim ligandom za TLR9, ODN 2006; stupac 3 – stanice kostimulirane sa ODN 2006 i spojem M-199 u koncentraciji 0,1 µmol dm^{-3}; stupac 4 - stanice kostimulirane sa ODN 2006 i spojem M-199 u koncentraciji 1 µmol dm^{-3}; stupac 5 - stanice kostimulirane sa ODN 2006 i spojem M-199 u koncentraciji 5 µmol dm^{-3}. Stanice su preko noći inkubirane s ligandima te su pripremljene u duplikatu, n=2. Oslobođena bioluminiscencija mjerena je na luminometru (Fluoroskan ascent FL, Thermo, Finska). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD.
Kratice: HEK293 = stanice bubrega embrija čovjeka; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$;
ODN 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; SD = standardno odstupanje

Na slici 37 vidimo da HEK293 stanice stabilno transfecirane sa genom za TLR9 pokazuju značajan porast relativne luciferazne aktivnosti nakon stimulacije sa poznatim ligandom za TLR9, ODN 2006, 1 µmol dm^{-3}. Nakon kostimulacije sa M-199 (0,1 µmol dm^{-3}, 1 µmol dm^{-3}, 5 µmol dm^{-3}) relativna luciferazna aktivnost slična je vrijednostima koje očitavamo na stanicama stimuliranim samo sa ODN 2006.

Podudaran rezultat smo dobili na PBMC staničnom modelu (slika 38). Stanice smo stimulirali sa ODN 2006 (5 μmol dm^{-3}) i kombinacijama ODN 2006 (5 μmol dm^{-3}) i M-199 (0,1 μmol dm^{-3}, 1 μmol dm^{-3} i 10 μmol dm^{-3}). U supernatantu smo očitavali relativni sadržaj IL-8.



Slika 38. Relativni sadržaj IL-8 u supernatantu PBMC stanica stimuliranih 24 sata: stupac 1 – ne stimulirane stanice; stupac 2 – stanice stimulirane poznatim ligandom za TLR9, ODN 2006; stupac 3 – stanice kostimulirane sa ODN 2006 i spojem M-199 u koncentraciji 0,1 μmol dm^{-3}; stupac 4 - stanice kostimulirane sa ODN 2006 i spojem M-199 u koncentraciji 1 μmol dm^{-3}; stupac 5 - stanice kostimulirane sa ODN 2006 i spojem M-199 u koncentraciji 10 μmol dm^{-3}. Stanice su pripremljene u duplikatu, n=2, apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = $A_{450} - A_{570}$. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD.
Kratice: IL-8 (Interleukin 8); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; ODN 2006 = oligonukleotid s nemetiliranim CpG motivom; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$; SD = standardno odstupanje

Dodatak M-199 u smjesu sa ODN 2006 ne dovodi do smanjenja lučenja IL-8.

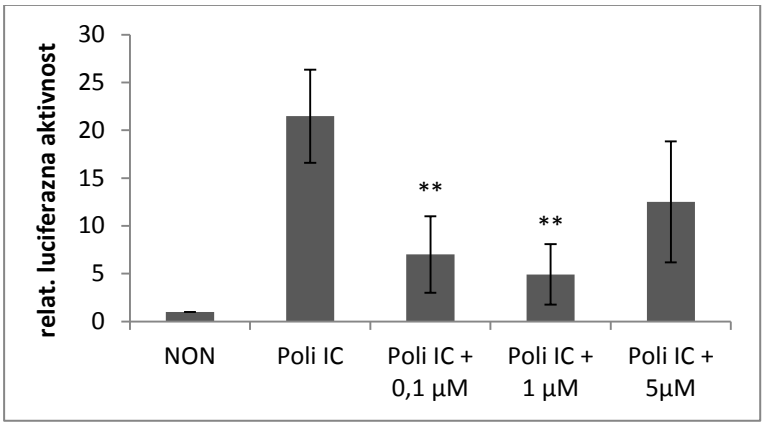
4.5.4. Rezultati ispitivanja imunomodulacijskog djelovanja molekule M-199 na stimulaciju TLR3 posredovanu s poli(I:C)

Spektroskopske analize međudjelovanja poli(I:C) i M-199 nisu izvedene.

Ispitivali smo da li spoj M-199 dovodi do modulacije signala koji nastaje stimulacijom HEK293 stanica stabilno transfeciranh sa genom za TLR3 i da li se može uočiti modulacija signala na PBMC sustavu. Cilj je bio pokazati da dolazi do međudjelovanja poli(I:C) (poznatog liganda za TLR3) i spoja M-199, te da međudjelovanje utječe na biološki sustav.

4.5.4.1. Rezultati analize u HEK293 staničnom modelu

U pokusu smo HEK293 stanice (stabilno transfecirane sa genom za TLR3) stimulirali s poli(I:C) (poznatim TLR3 ligandom) i kostimulirali sa poli(I:C) i spojem M-199 u rasponu koncentracija. Indukcija transkripcijskog čimbenika NF-κB mjerena je reporterskim sustavom sa luciferaznim genom.



Slika 39. Rezultati relativne luciferazne aktivnosti HEK293 stanica transfeciranih s genom za TLR3: stupac 1 – ne stimulirane stanice; stupac 2 – stanice stimulirane poznatim ligandom za TLR3, poli(I:C); stupac 3 – stanice kostimulirane sa poli(I:C) i spojem M-199 u koncentraciji 0,1 µmol dm^{-3}; stupac 4 - stanice kostimulirane sa poli(I:C) i spojem M-199 u koncentraciji 1 µmol dm^{-3}; stupac 5 - stanice kostimulirane sa poli(I:C) i spojem M-199 u koncentraciji 5 µmol dm^{-3}. Stanice su preko noći inkubirane s ligandima te su pripremljene u duplikatu, n=2. Oslobođena bioluminiscencija mjerena je na luminometru (Fluoroskan ascent FL, Thermo, Finska). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike u odnosu na stanice stimulirane sa poli(I:C) prikazane su s $^{**}P<0{,}01$.
Kratice: HEK293 = stanice bubrega embrija čovjeka; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$;
poli(I:C) = poliinozin-policitidilična kiselina; SD = standardno odstupanje

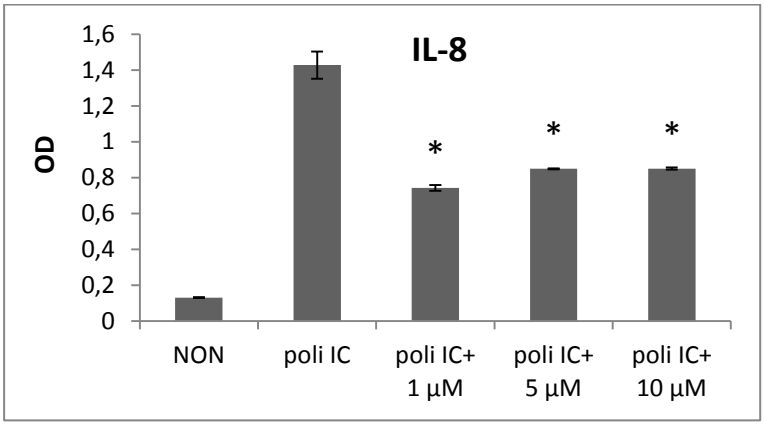
Na slici 39 vidimo da HEK293 stanice stabilno transfecirane sa genom za TLR3 pokazuju značajan porast relativne luciferazne aktivnosti nakon stimulacije sa poznatim ligandom za TLR3, poli(I:C), 10 µg/mL. Nakon kostimulacije sa M-199 (0,1 µmol dm^{-3}, 1 µmol dm^{-3}, 5 µmol dm^{-3}) relativna luciferazna aktivnost pada u odnosu na stanice stimulirane samo sa poli(I:C).

Rezultati analize pokazali su da kostimulacijom sa poli(I:C) i M-199 dolazi do utišavanja signala na stanicama transfeciranim sa genom za TLR3. Studentovim t-testom pokazano je da dodatak M-199 u koncentracijama 0,1 µmol dm^{-3} i 1 µmol dm^{-3} statistički

značajno smanjuju relativnu luciferaznu aktivnost ($P < 0,01$). Zbog visoke varijabilnosti nije zabilježena statistička značajnost u razlici relativne luciferazne aktivnosti između uzorka tretiranog s poli(I:C)i uzorka u koji je dodan spoj M-199 u koncentraciji 5 μmol dm^{-3}. U ovom pokusu nismo pokazali ovisnost utišavanja signala o koncentraciji dodanog M-199.

4.5.4.2. Rezultati analize u PBMC staničnom modelu

Podudaran rezultat smo dobili na PBMC (slika 40). Stanice smo stimulirali sa poli(I:C) (5 μmol dm^{-3}) i kombinacijama poli(I:C) (5 μmol dm^{-3}) i M-199 (1 μmol dm^{-3}, 5 μmol dm^{-3} i 10 μmol dm^{-3}).



Slika 40. Relativni sadržaj IL-8 u supernatantu PBMC stanica stimuliranih 24 sata: stupac 1 – ne stimulirane stanice; stupac 2 – stanice stimulirane poznatim ligandom za TLR3, poli(I:C); stupac 3 – stanice kostimulirane sa poli(I:C) i spojem M-199 u koncentraciji 1 μmol dm^{-3}; stupac 4 - stanice kostimulirane sa poli(I:C) i spojem M-199 u koncentraciji 5 μmol dm^{-3}; stupac 5 - stanice kostimulirane sa poli(I:C) i spojem M-199 u koncentraciji 10 μmol dm^{-3}. Stanice su pripremljene u duplikatu, n=2, apsorbancija je očitana je na čitaču mikrotitarskih pločica (Thermo Labsystems, Multiscan Ex, Thermo Fisher Scientific, Finska), OD = A_{450} – A_{570}. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± SD. Statistički značajne razlike u odnosu na stanice stimulirane sa poli(I:C) prikazane su s *P<0,05.
Kratice: IL-8 (Interleukin 8); PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*); NON = nestimulirane stanice; M-199 = $C_{17}H_{17}N_3O$;
poli(I:C) = poliinozin-policitidilična kiselina; SD = standardno odstupanje

Rezultati analize pokazali su da kostimulacijom sa poli(I:C) i M-199 dolazi do smanjenja izlučivanja IL-8. Studentovim t-testom pokazano je da dodatak M-199 statistički značajno smanjuje relativni sadržaj IL-8 (P<0,05). Nije dokazana ovisnost inhibicije o koncentraciji dodanog M-199.

§ 5. RASPRAVA

Imunosni odgovor, pogotovo njegov urođeni dio, predstavlja prvu liniju obrane ljudskog organizma. Ukoliko dođe do poremećaja njegove regulacije, ili krivo usmjerenog djelovanja, to može biti uzrok povećanoj podložnosti infekcijama, autoimunim bolestima, preosjetljivostima ili čak razvoju tumora. Urođeni imunosni odgovor uvelike se oslanja na aktivaciju *Toll like* receptora. *Toll like* receptori osim aktiviranja urođene imunosti pokreću i sustav stečene imunosti. Upravo zbog navedenog značaja *Toll like* receptora istražuju se molekule koje direktno djeluju na njihovu aktivaciju ili inhibiciju, ali i molekule koje djeluju indirektno, preko endogenih i egzogenih liganada. Derivati fenantridina su zbog sličnosti njihove strukture sa poznatim TLR7 odnosno TLR8 ligandima, odabrani za ispitivanje imunostimulacijskog djelovanja. Također smo pretpostavili na temelju već dokazanog međudjelovanja sa DNA i RNA da bi fenantridinski derivati mogli djelovati imunomodulirajuće. Naime poznati TLR3 i TLR9 ligandi su upravo oligonukleotidi s određenim specifičnim slijedovima. Promjenom signala posredovanih navedenim receptorima moglo bi se utjecati na razvoj i liječenje virusnih i bakterijskih infekcija, alergijskih i autoimunih bolesti te tumora.

Cilj ove disertacije bio je napraviti probir potencijalno imunostimulacijskih molekula unutar skupine od sedamnaest testiranih fenantridina i potvrditi izostanak eventualnog citotoksičnog djelovanja. Nadalje je cilj bio na kulturi stanica koje izražavaju samo TLR7 odnosno TLR8 dokazati da je imunoaktivacija posljedica djelovanja na ove receptore. U sklopu istraživanja imunomodulacijskog djelovanja, cilj je bio pokazati međudjelovanje odabranih fenantridina i TLR3 odnosno TLR9 liganada. Također je bio cilj istražiti da li pretpostavljeno međudjelovanje u otopini utječe na biološku aktivnost liganada za TLR3 odnosno TLR9. Biološka aktivnost je ispitivana na humanim perifernim mononuklearima, na staničnim linijama humanih monocita te na staničnim linijama koje koje izražavaju samo TLR3 odnosno TLR9.

Do danas su poznati brojne molekule koje utječu na TLR koje su u primjeni za liječenje velikog broja bolesti [41]. Mehanizmi djelovanja fenantridina temelje se na vezanju na DNA odnosno RNA i u skladu s tim na inhibiciji sinteze DNA, reverzne transkripcije, sinteze RNA, sinteze proteina [73]. Novija saznanja o fenantridinskim alkaloidima koji djeluju

antivirusno, antimikrobno i antitumorski potvrđuju da fenantridinski alkaloidi inhibiraju NFκB, angiogenezu uzrokovanu VEGF-om, smanjuju sintezu adhezijskih molekula, utječu na pojedine faze staničnog ciklusa i inhibiraju MKP-1 (engl. *mitogen-activated protein kinase phosphatase*-1) [85]. Neki fenantridini djeluju tako što se vežu na aktivna mjesta na proteinu i na taj način inhbiraju njihovu aktivnost [86]. Godine 2012. je objavljeno da se antitumorsko, antivirusno, antimalarijsko i antimikrobno djelovanje likorina (fenantridinskog alkaloida izoliranog iz biljke *Lycoris*) temelji na supresiji djelovanja LPS-a, ali nije dokazano da li se radi o međudjelovanju sa CD14, LPS-om ili TLR4 [87-90].

U našem radu ispitivali smo imunostimulacijsko djelovanje sedamnaest fenantridinskih derivata na svježe izoliranim perifernim mononuklearnim stanicama humane krvi. Stanice smo izolirali iz krvi četiri različita dobrovoljna darivatelja i stimulirali ih 24 odnosno 48 sati. U supernatantu smo mjerili sadržaj IL-6 i IFN-α. Od testiranih derivata spoj M-199 (1-etil-3-(6-metilfenantridin-8-il)urea) pokazao je stabilno povećanje lučenja IL-6 neovisno o darivatelju ili vremenu stimulacije. Niti jedan testirani spoj nije doveo do povećanja lučenja IFN-α. Kako bi izbjegli mogućnost da je citotoksično djelovanje testiranih tvari dovelo do stimulacije imunosnog odgovora, svih sedamnaest derivata podvrgnuli smo MTT testu. Za spoj M-199 pokazalo se da dovodi do 50%tne inhibicije rasta pri koncentraciji većoj od 100 μM. U analizama prikazanim u ovom radu M-199 je testiran u koncentracijiama 5 odnosno 10 μM, dakle možemo tvrditi da nije došlo do imunostimulacije koja je posljedica citotoksičnog učinka.

U ovom radu je istražen utjecaj spoja M-199 na stimulaciju PBMC-a u smislu izlučivanja sljedećih interleukina: IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α i IFN-α. Rezultati su pokazali da M-199 potiče izlučivanje IL-6 i IL-8, slabije potiče izlučivanje TNF-α, te ne potiče izlučivanje IL-1β i IFN-α. IL-6 potiče aktivaciju limfocita i proizvodnju protutijela te usmjerava diferencijaciju prema T_H17, dok IL-8 potiče prelazak neutrofila iz krvotoka u tkivo i njihovu degranulaciju. TNF-α djeluje na endotel krvnih žila, povećava prolaz IgG, komplementa i stanica u tkiva [6]. Dakle djelovanje molekule M-199 imitira akutni upalni odgovor.

Naši rezultati su također pokazali na primjeru IL-8 da je djelovanje spoja M-199 proporcionalno njegovoj koncentraciji. Udio IL-8 u supernatantu PBMC-a povećava se s povećanjem koncentracije M-199 tijekom stimulacije.

Nakon dokaza o imunostimulacijskom djelovanju M-199 htjeli smo istražiti da li je imunostimulacija posljedica vezanja na TLR7 odnosno TLR8. Sličnost u strukturi i djelovanju imikvimoda (predstavnika porodice imidazokinolina poznatih TLR7/TLR8 agonista) i fenantridinskih derivata već je istraživana i potvrđena u literaturi [91, 92]. Zbog sličnosti strukture urea-fenantridinskog derivata M-199 i imidazokinolina, očekivali smo da će imunostimulacijsko djelovanje M-199 biti posljedica vezanja na TLR7 ili TLR8. U eksperimentima s HEK293 stanicama (humane embrionalne stanice bubrega) transfeciranim sa genom za TLR7 odnodno TLR8 nismo potvrdili da M-199 djeluje preko ovih receptora. Poznato je da imidazokinolinski ligandi TLR7 odnosno TLR8, imikvimod (R837) i rezikvimod (R848) također aktiviraju kaspazu-1 preko unutarstaničnih *Nod-like* receptora – kriopirin/Nalp 3. Aktivacijom kaspaze-1 inducira se proizvodnja IL-1β i IL-18. *Toll*-like receptori također reguliraju proizvodnju IL-1β i IL-18, ali preko drugih signalih putova. Kanneganti i suradnici su pokazali da povećanje izlučivanja IL-6 i TNF-α, te aktivacija NF-κB i MAP kinaza posredovane imikvimodom i rezikvimodom nisu posljedica okidanja kriopirina [44, 93]. Mi smo pokazali da spoj M-199 ne utječe na povećanje izlučivanja IL-1β, nismo ispitali utjecaj na izlučivanje IL-18. Ostaje otvoreno pitanje da li se može sa sigurnošću isključiti mogućnost da *Nod-like* receptori prepoznaju M-199, pri čemu ne signaliziraju u smjeru izlučivanja IL-1β. Ne treba niti isključiti mogućnost da M-199 signalizira preko MD5 (engl. *myeloid differentiation factor 5*) ili RIG-I receptora (RLR) koji prepoznaju virusnu RNA. Glavni rezultat okidanja ovih receptora je IFN tipa I ali i proupalni citokini preko aktivacije NF-κB.

U drugom dijelu istraživanja htjeli smo potvrditi međudjelovanje M-199 i poznatih liganada za TLR9, te posljedični utjecaj na prijenos signala preko TLR9. Ligandi za TLR9 su CpG oligonukleotidi, sintetski odsječci jednolančane DNA duljine oko 20 baza koji sadrže imunostimulacijski CpG motiv. Najvećim dijelom stimuliraju pDC i stanice B. Prema strukturi i djelovanju se dijele u više skupina. Skupinu A čine oligodeoksinukleotidi (ODN 2216) koji sadrže palindromski slijed u kojem su nukleotidi povezani fosfodiesterskim vezama i poliG krajeve sa fosforotioatnim vezama. Oligodeoksinuklotidi iz skupine B sadrže nepalindomske ponavljajuće CpG motive i okosnicu koja je u cijelosti fosforotioatna [94, 95]. ODN-i klase A tvore u otopinama soli strukture višeg reda (duplekse i nanočestice) zbog prisutnosti palindromskog slijeda i poliG krajeva, dok ODN-i klase B ne tvore više strukture [96]. ODN-i se također razlikuju prema djelovanju, klasa A potiče lučenje IFN tipa I, dok klasa

B potiče diferencijaciju stanica B i lučenje citokina, uglavnom IL-6, IL-10 i IL-12 [95]. 1-etil-3-(6-metilfenantridin-8-il)urea, M-199, prema rezultatima do sada objavljenih istraživanja predominantno interkalira između baza dvostruke DNA, odnosno RNA [78].

Ispitivanje međudjelovanja podijeljeno je na spektrofotometrijske i biološke analize. Fluorescentnom i CD titracijom smo ispitivali međudjelovanje M-199 i ODN 2006 odnosno ODN 2216 u otopini.

Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da spoj M-199 interkalira između parova baza ODN 2006 pri neutralnom pH, dok je pri slabo kiselim uvjetima uz interkaliranje prisutno i elektrostatsko međudjelovanje između M-199 i ODN 2006. U *in vitro* modelima ispitali smo ujecaj kostimulacije na PBMC i na provođenje signala preko transkripcijskog čimbenika NFκB u staničnoj kulturi HEK293 gdje su stanice transfecirane s plazmidom za TLR9. ODN 2006 je ODN klase B, posljedica njegovog djelovanja je povećanje razine proupalnih citokina. U svježe izoliranim PBMC je uočen porast IL-8 nakon stimulacije s navedenim ligandom, nakon kostimulacije sa M-199 nije došlo do promjene razine IL-8. Također je na HEK293 sustavu praćen relativni intenzitet luminescencije, pri čemu nakon kostimulacije sa ODN 2006 i M-199 nije došlo do promjene u odnosu na stimulaciju sa samim ODN 2006. U biološkim pokusima nismo uočili utjecaj međudjelovanja M-199 i ODN 2006.

Na temelju rezultata fluorimetrijske i CD titracije ODN 2216 sa spojem M-199 može se zaključiti da u blago kiselim uvjetima nastaju elektrostatska međudjelovanja između negativno nabijene okosnice oligonukleotida i pozitivno nabijenog spoja M-199. Snažan pad CD spektra ODN-a, jače izražen u neutralnim uvjetima, navodi nas na zaključak da molekule M-199 aglomeriraju duž molekule ODN 2216 pri omjerima koncentracija većim od 0,3. Biološki utjecaj međudjelovanja smo također istraživali na svježe izoliranim PBMC i na stanicama humane akutne monocitne leukemije – THP-1. Na PBMC je uočeno da M-199 utječe na smanjenje lučenja IFN-α, dok je na monocitima iz THP-1 stanične linije došlo do pada razine izlučenog TNF-α proporcionalno porastu koncentracije M-199 tijekom kostimulacije.

Spektrofotometrijske analize ODN 2006 i ODN 2216 upućuju na to da su međudjelovanja izraženija u kiselijim uvjetima, što govori u prilog tome da je međudjelovanje M-199 i poznatih liganada jače u endosomima nego u izvanstaničnom prostoru [97]. No zanimljiv je kontrast između podataka kemijskih i bioloških analiza, naime za ODN klase B

(ODN 2006) imamo jasniju kemijsku potvrdu međudjelovanja sa M-199, dok je međudjelovanje slabije i "neuređenije" sa ODN-om klase A (ODN 2216). Istovremeno je biološko međudjelovanje potvrđeno za klasu A ali nije za klasu B. Moguće objašnjenje bi bilo da interkaliranje molekule M-199 ne mijenja značajno strukturu ODN 2006 (općenito obilježje klase B je da ne tvore strukture višeg reda) dok elektrostatsko međudjelovanje i aglomeriranje utječu na ODN 2216. Klasa A sama po sebi tvori strukture višeg reda pa je moguće da već i manja međudjelovanja ostavljaju snažan utjecaj na biološku aktivnost. Također je moguće objašnjenje da interkaliranje ne utječe na izloženost epitopa za vezanje na TLR9, dok se tijekom elektrostatskih međudjelovanja između M-199 i ODN tipa A vjerojatno zaklanja epitop. Moguće je također da već u izvanstaničnom prostoru pri neutralnim uvjetima dolazi do aglomeracije liganda i M-199 te da se smanjuje koncentracija raspoloživih liganada koji ulaze u stanicu i okidaju signal.

Istraženo je također međudjelovanje poli(I:C) (poznatog TLR3 liganda) i M-199 na biološkoj razini. Poli(I:C) je sintetska dvolančana RNA, koja se sastoji od poli I lanca sparenog sa poli C lancem. Pretpostavlja se da na djelovanje utječe veličina molekule i dupleks struktura [98]. Dokazano je da duža RNA (300 – 1800 pb) u odnosu na kraću (50-110 pb) snažnije potiče izlučivanje IFN tipa I i III, te TNF-α, IL-6 i IL-1β u DC-ima [99]. Općenito poli(I:C) snažno stimulira proizvodnju IFN tipa I, aktivira DC, usmjerava stanice NK u pravcu ubijanja tumorskih stanica i inducira nekoliko enzimskih sustava u jezgri i citoplazmi [44]. U pokusu sa svježe izoliranim PBMC pokazano je da M-199 nema utjecaj na lučenje IL-6, IL-1β i TNF-α. Važno je istaknuti da u našem sustavu niti sam poli(I:C) ne potiče lučenje IL-1β i TNF-α – čak je moguće da poli(I:C) snižava relativno nisku stimulaciju lučenja TNF-α koju uzrokuje sam M-199. Lučenje IL-8 se snižava nakon kostimulacije sa M-199. U sklopu dodatnih istraživanja HEK293 stanice transfecirali smo sa genom za TLR3 i kostimulirali sa poli(I:C) i M-199, pri čemu je pokazano smanjeno provođenje signala preko TLR3 pod utjecajem M-199. Nije pokazana ovisnost o koncentraciji M-199. Jerala i suradnici su objavili kako TLR3 zbog udaljenosti između veznih mjesta ima veći afinitet vezanja za A duplekse u odnosu na B duplekse RNA[100]. Oni su testirali aminokridinske molekule koje su interkalirajući između parova baza dovele do odmatanja i produljenja lanaca nukleinskih kiselina. Pretpostavili su da su ove promjene konformacije utjecale na smanjenje vezanja na receptor [101]. Budući da je M-199 do sada poznat kao RNA interkalator, možemo pretpostaviti da se radi o istom direktnom mehanizmu inhibicije.

Važno je istaknuti kako smo u pokusima na svježe izoliranim PBMC pratili utjecaj dodatka M-199 na stimulaciju LPSom (nije prikazano), pri čemu je LPS samostalno utjecao na povećanje izlučivanja TNF-α, IL-6 i IL-1β, dok kostimulacija sa M-199 nije utjecala na promjenu. Prema tome možemo potvrditi da su ciljane molekule, na čije djelovanje M-199 ima utjecaj, upravo nukleinske kiseline. Dakle imunomodulacija uzrokovana molekulom M-199 ovisi o tipu liganda koji je doveo do inicijalne stimulacije.

Zaključno možemo navesti da smo pokazali da molekula M-199 ima imunostimulacijski učinak na PBMC i to na taj način što potiče lučenje IL-6, IL-8 i TNF-α, te da je učinak ovisan o koncentraciji. Do imunostimulacije ne dolazi aktivacijom TLR7 niti TLR8. U kostimulaciji sa poznatim ligadima za TLR9, odnosno TLR3 djeluje dvoznačno. Ne utječe na imunostimulaciju posredovanu ODN 2006 (ODN klase B), dok inhibira djelovanje ODN 2216 (klasa A) i poli(I:C) (TLR3 ligand). Inhibicija se očituje u stišavanju stimulacije IL-8 u PBMC (oba liganda), stišavanju stimulacije TNF-α u THP-1 stanicama (ODN 2216) te u stišavanju signala u specifično transfeciranim HEK293 stanicama (TLR3). Pokazali smo da M-199 nema utjecaj na LPS, vjerojatno jer specifično utječe na ligande koji sadrže nukleinske kiseline. U spektroskopskim analizama međudjelovanja u otopini pokazali smo da M-199 stupa u međudjelovanja različitog tipa sa ODN klase A odnosno B, ali da interakcija sa klasom B (iako je okarakterizirana kao višeg afiniteta) nema utjecaja na biološku aktivnost ODN-a tipa B.

Dakle za dalje upoznavanje mehanizma djelovanja molekule M-199 bilo bi potrebno odrediti receptor ili više receptora preko kojih djeluje te na *in vivo* modelu odrediti utjecaj promjene interleukinskog profila na zdrave i bolesne stanice. Svakako bi bilo korisno istražiti vrstu kemijskog međudjelovanja imeđu TLR3 liganda poli(I:C) i spoja M-199, te *in vivo* analizirati utjecaj inhibicije ovog receptora.

Za pretpostaviti je da bi prema interleukinskom profilu molekula M-199 mogla služiti kao protuupalni terapeutik. Poticanje lučenja IL-6, IL-8 i TNF-α u tumorskom okruženju ima za posljedicu angiogenezu koja je preduvjet za rast i širenje solidnih tumora [*102*]. Dakle, pretpostavljamo da molekula ima protumorsko djelovanje i u tom smislu ne bi bila molekula odabira za liječenje tumora. Testiranjem kostimulacije sa ligandima za TLR9 i TLR3 uočili smo inhibicijsko djelovanje na stimulaciju TLR3 pomoću poli (I:C) i inhibicijsko djelovanje na ODN 2216, TLR9 ligand tipa A.

§ 6. ZAKLJUČCI

1. Molekula M-199 ima imunostimulacijsko djelovanje, koje nije posljedica citotoksičnog učinka u primijenjenim koncentracijama.
2. Imunostimulacijsko djelovanje molekule M-199 nije posljedica direktnog vezanja i stimulacije TLR7 ili TLR8.
3. Rezultati fluorescencijske titracije pokazuju da tijekom titracije otopine M-199 sa ODN 2006 dolazi do gašenja fluorescencije, koje je izraženije u blago kiselim uvjetima u odnosu na neutralne uvjete.

   Rezultati CD titracije pokazuju da dodatkom M-199 u otopinu ODN 2006 dolazi do pada intenziteta pika na valnoj duljini 277 nm (u blago kiselim i u neutralnim uvjetima) te do nastanka ICD signala na 300 nm u neutralnim uvjetima.

   Na osnovu rezultata fluorimetrijske i CD titracije možemo zaključiti da spoj M-199 interkalira između parova baza ODN 2006 pri neutralnom pH, dok pri slabo kiselim uvjetima uz interkaliranje nastaje i elektrostatsko međudjelovanje pozitivno nabijenih slobodnih molekula M-199 i negativno nabijenih fosfata iz oligonukletida.
4. Rezultati fluorescencijske titracije pokazuju da tijekom titracije otopine M-199 sa ODN 2216 dolazi do umjerenog gašenja fluorescencije u blago kiselim uvjetima, dok u neutralnim uvjetima te promjene nisu bile značajne.

   Rezultati CD titracije pokazuju da dodatkom M-199 u otopinu ODN 2216 dolazi do nastanka jakog negativnog ICD spektra na oba pH. U neutralnim uvjetima dolazi do precipitacije kada je omjer koncentracija veći od r = 0,3, dok pri blago kiselim ujetima pri omjeru koncentracija r = 0,2 dolazi do zasićenja.

   Na temelju rezultata fluorimetrijske i CD titracije može se zaključiti da u blago kiselim uvjetima, molekule spoja M-199 najvjerojatnije ne interkaliraju između baza ODN 2216, nego nastaje elektrostatsko međudjelovanje između negativno nabijene okosnice oligonukleotida i pozitivno nabijenog spoja M-199. Snažan pad CD spektra ODN-a, jače izražen u neutralnim uvjetima, navodi nas na zaključak da molekule M-199 aglomeriraju duž molekule ODN 2216 pri omjerima koncentracija većim od 0,3.
5. Međudjelovanje molekule M-199 sa TLR ligandom klase B (ODN 2006) u otopini nema utjecaj na biološku aktivnost molekule.

6. Međudjelovanje molekule M-199 sa TLR ligandom klase A (ODN 2216) u otopini utječe na biološku aktivnost molekule, inhibira sintezu IL-8 u stanicama PBMC i sintezu TNF-α u diferenciranim stanicama THP-1.
7. Molekula M-199 utječe na biološku aktivnost liganda za TL3 - poli(I:C), inhibira sintezu IL-8 u stanicama PBMC i provođenje signala preko transkripcijskog čimbenika NFκB u HEK293 stanicama transfeciranim s genom za TLR3.
8. Molekula M-199 ne utječe na djelovanje LPS-a pa se stoga pretpostavlja da utječe samo na ligande koji se sastoje od nukleinskih kiselina.

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. J. Delves, I. M. Roitt, The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49 (2000).
2. D. D. Chaplin, Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S3-23 (2010).
3. M. Taradi *i sur.*, *Imunologija*. (Medicinska Naklada, Zagreb, 7.izd., 2010).
4. M. Benoit, B. Desnues, J. L. Mege, Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* **181**, 3733-3739 (2008).
5. S. Gordon, Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23-35 (2003).
6. K. Murphy, P. Travers, M. Walport, C. Janeway, *Janeway's immunobiology*. (Garland Science, New York, ed. 7th, 2008), pp. xxi, 887 p.
7. J. T. Schroeder, Basophils beyond effector cells of allergic inflammation. *Adv Immunol* **101**, 123-161 (2009).
8. R. Medzhitov, C. A. Janeway, Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**, 298-300 (2002).
9. P. Matzinger, The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301-305 (2002).
10. F. Martinon, A. Mayor, J. Tschopp, The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* **27**, 229-265 (2009).
11. S. Jensen, A. R. Thomsen, Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol* **86**, 2900-2910 (2012).
12. Y. M. Loo, M. Gale, Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **34**, 680-692 (2011).
13. T. B. Geijtenbeek, S. I. Gringhuis, Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**, 465-479 (2009).
14. T. Kawai, S. Akira, Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637-650 (2011).
15. S. Akira, K. Takeda, Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511 (2004).
16. J. K. Bell *i sur.*, Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **24**, 528-533 (2003).
17. F. Leulier, B. Lemaitre, Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* **9**, 165-178 (2008).
18. E. Vercammen, J. Staal, R. Beyaert, Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3. *Clinical Microbiology Reviews* **21**, 13-25 (2008).
19. R. Medzhitov, Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135-145 (2001).
20. Y. Xu *i sur.*, Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111-115 (2000).
21. S. N. Sarkar, H. L. Smith, T. M. Rowe, G. C. Sen, Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **278**, 4393-4396 (2003).

22. C. Li, J. Zienkiewicz, J. Hawiger, Interactive sites in the MyD88 Toll/interleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1beta signaling pathway. *J Biol Chem* **280**, 26152-26159 (2005).
23. J. L. Slack *i sur.*, Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* **275**, 4670-4678 (2000).
24. S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
25. S. Akashi-Takamura, K. Miyake, TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* **20**, 420-425 (2008).
26. T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373-384 (2010).
27. Y. Guan *i sur.*, Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol* **184**, 5094-5103 (2010).
28. A. L. Blasius, B. Beutler, Intracellular toll-like receptors. *Immunity* **32**, 305-315 (2010).
29. S. E. Ewald *i sur.*, Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med* **208**, 643-651 (2011).
30. L. A. O'Neill, A. G. Bowie, The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**, 353-364 (2007).
31. T. Kawagoe *i sur.*, Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* **9**, 684-691 (2008).
32. V. G. Bhoj, Z. J. Chen, Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* **458**, 430-437 (2009).
33. M. Yamamoto *i sur.*, Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol* **7**, 962-970 (2006).
34. M. P. Schön, M. Schön, TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* **27**, 190-199 (2008).
35. T. Kawai, S. Akira, Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* **1143**, 1-20 (2008).
36. Y. Lai *i sur.*, Viral double-strand RNA-binding proteins can enhance innate immune signaling by toll-like Receptor 3. *PLoS One* **6**, e25837 (2011).
37. C. Guiducci *i sur.*, RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *J Exp Med* **210**, 2903-2919 (2013).
38. S. T. Sarvestani, B. R. Williams, M. P. Gantier, Human Toll-like receptor 8 can be cool too: implications for foreign RNA sensing. *J Interferon Cytokine Res* **32**, 350-361 (2012).
39. J. L. Cervantes, B. Weinerman, C. Basole, J. C. Salazar, TLR8: the forgotten relative revindicated. *Cell Mol Immunol* **9**, 434-438 (2012).
40. T. Haas *i sur.*, The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity* **28**, 315-323 (2008).
41. E. J. Hennessy, A. E. Parker, L. A. O'Neill, Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov* **9**, 293-307 (2010).
42. E. J. Mifsud, A. C. Tan, D. C. Jackson, TLR Agonists as Modulators of the Innate Immune Response and Their Potential as Agents Against Infectious Disease. *Front Immunol* **5**, 79 (2014).

43. Z. Aryan, S. T. Holgate, D. Radzioch, N. Rezaei, A new era of targeting the ancient gatekeepers of the immune system: toll-like agonists in the treatment of allergic rhinitis and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* **164**, 46-63 (2014).
44. S. Gnjatic, N. B. Sawhney, N. Bhardwaj, Toll-like receptor agonists: are they good adjuvants? *Cancer J* **16**, 382-391 (2010).
45. K. D. Samara *i sur.*, Expression profiles of Toll-like receptors in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Oncol* **40**, 1397-1404 (2012).
46. J. Cherfils-Vicini *i sur.*, Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest* **120**, 1285-1297 (2010).
47. Y. Kitadai *i sur.*, Helicobacter pylori infection influences expression of genes related to angiogenesis and invasion in human gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **311**, 809-814 (2003).
48. Y. J. Chang, M. S. Wu, J. T. Lin, C. C. Chen, Helicobacter pylori-Induced invasion and angiogenesis of gastric cells is mediated by cyclooxygenase-2 induction through TLR2/TLR9 and promoter regulation. *J Immunol* **175**, 8242-8252 (2005).
49. D. Bhattacharya, N. Yusuf, Expression of toll-like receptors on breast tumors: taking a toll on tumor microenvironment. *Int J Breast Cancer* **2012**, 716564 (2012).
50. M. Toriseva *i sur.*, MMP-13 regulates growth of wound granulation tissue and modulates gene expression signatures involved in inflammation, proteolysis, and cell viability. *PLoS One* **7**, e42596 (2012).
51. C. Wang *i sur.*, TLR9 expression in glioma tissues correlated to glioma progression and the prognosis of GBM patients. *BMC Cancer* **10**, 415 (2010).
52. M. Muccioli, L. Sprague, H. Nandigam, M. Pate, F. Benencia, Toll-like receptors as novel therapeutic targets for ovarian cancer. *ISRN Oncol* **2012**, 642141 (2012).
53. J. Tanaka *i sur.*, Functional cell surface expression of toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* **37**, 805-814 (2010).
54. S. Kaczanowska, A. M. Joseph, E. Davila, TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* **93**, 847-863 (2013).
55. M. P. Schön, M. Schön, K. N. Klotz, The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a TLR7- and TLR8-independent fashion. *J Invest Dermatol* **126**, 1338-1347 (2006).
56. M. Odashima *i sur.*, Activation of A2A adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **129**, 26-33 (2005).
57. S. Zimmermann *i sur.*, CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* **160**, 3627-3630 (1998).
58. A. M. Krieg, Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest* **117**, 1184-1194 (2007).
59. A. M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 471-484 (2006).
60. A. M. Krieg *i sur.*, CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-549 (1995).
61. S. Bauer *i sur.*, Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9237-9242 (2001).

62. T. L. Roberts, M. J. Sweet, D. A. Hume, K. J. Stacey, Cutting edge: species-specific TLR9-mediated recognition of CpG and non-CpG phosphorothioate-modified oligonucleotides. *J Immunol* **174**, 605-608 (2005).
63. T. Müller, S. Hamm, S. Bauer, TLR9-mediated recognition of DNA. *Handb Exp Pharmacol*, 51-70 (2008).
64. I. Piantanida, Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s DNA i RNA. Detaljniji osvrt na ispitivanje interkalativnog nacina vezanja. *Kemija u Industriji* **52**, 545–552 (2003).
65. W. A. Brett, P. Rademacher, R. Boese, Redetermination of the Structure of Phenanthridine. *Acta Crystallographica Section C* **C49**, 1564-1566 (1993).
66. E. D. Horowitz, N. V. Hud, Ethidium and proflavine binding to a 2',5'-linked RNA duplex. *J Am Chem Soc* **128**, 15380-15381 (2006).
67. H. Nishiwaki, M. Miura, K. Imai, R. Ono, K. Kawashima, Experimental studies on the antitumor effect of ethidium bromide and related substances. *Cancer Res* **34**, 2699-2703 (1974).
68. B. R. Balda, G. D. Birkmayer, Drug effects in melanoma: tumor-specific interactions of proflavine and ethidiumbromide. *Yale J Biol Med* **46**, 464-470 (1973).
69. R. Vilaginès, [Action of ethidium bromide on the development of vaccinia virus cultured in baboon kidney cells. I. Action on the kinetics of viral development]. *Arch Gesamte Virusforsch* **30**, 59-66 (1970).
70. D. G. Simmons, J. G. Gray, K. E. Muse, J. F. Roberts, W. M. Colwell, Homidium (ethidium) bromide inhibition of avian reovirus replication. *Am J Vet Res* **37**, 69-73 (1976).
71. R. V. Guntaka, B. W. Mahy, J. M. Bishop, H. E. Varmus, Ethidium bromide inhibits appearance of closed circular viral DNA and integration of virus-specific DNA in duck cells infected by avian sarcoma virus. *Nature* **253**, 507-511 (1975).
72. A. Roy Chowdhury *i sur.*, The killing of African trypanosomes by ethidium bromide. *PLoS Pathog* **6**, e1001226 (2010).
73. N. W. Luedtke, Q. Liu, Y. Tor, Synthesis, photophysical properties, and nucleic acid binding of phenanthridinium derivatives based on ethidium. *Bioorg Med Chem* **11**, 5235-5247 (2003).
74. I. Boibessot *i sur.*, Metabolism and distribution of phenanthridine trypanocides in Trypanosoma brucei. *Acta Trop* **84**, 219-228 (2002).
75. T. I. Watkins, 585. Trypanocides of the phenanthridine series. Part I. The effect of changing the quaternary grouping in dimidium bromide. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 3059-3064 (1952).
76. T. I. Watkins, G. Woolfe, Effect of changing the quaternizing group on the trypanocidal activity of dimidium bromide. *Nature* **169**, 506-507 (1952).
77. H. Jacquemin-Sablon, M. Le Bret, A. Jacquemin-Sablon, C. Paoletti, Yeast mitochondrial deoxyribonuclease stimulated by ethidium bromide. 2. Mechanism of enzyme activation. *Biochemistry* **18**, 128-134 (1979).
78. M. Radić Stojković, I. Piantanida, Tuning urea–phenanthridinium conjugates for DNA/RNA and base pair recognition. *Tetrahedron* **64**, 7807–7814 (2008).
79. G. Scatchard, The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672 (1949).
80. A. Rodger, B. Norde\n, *Circular dichroism and linear dichroism*. (Oxford University Press, Oxford ; New York, 1997).

81. N. Berova, R. W. Woody, K. Nakanishi, *Circular dichroism : principles and applications*. (Wiley-VCH, New York ; Chichester, 2.izd., 2000).
82. M. Radić Stojković, S. Marczi, L. Glavas-Obrovac, I. Piantanida, Permanent positive charge strongly influences DNA/RNA binding and antiproliferative activity of urea-phenanthridinium conjugates. *Eur J Med Chem* **45**, 3281-3292 (2010).
83. M. Radić Stojković, S. Miljanić, K. Mišković, L. Glavaš-Obrovac, I. Piantanida, The phenanthridine biguanides efficiently differentiate between dGdC, dAdT and rArU sequences by two independent, sensitive spectroscopic methods. *Mol Biosyst* **7**, 1753-1765 (2011).
84. L. M. Tumir, M. Radić Stojković, I. Piantanida, Come-back of phenanthridine and phenanthridinium derivatives in the 21st century. *Beilstein J Org Chem* **10**, 2930-2954 (2014).
85. M. L. Colombo, E. Bosisio, Pharmacological activities of Chelidonium majus L. (Papaveraceae). *Pharmacol Res* **33**, 127-134 (1996).
86. D. Banerjee, S. Sanyal, Protein folding activity of the ribosome (PFAR) -- a target for antiprion compounds. *Viruses* **6**, 3907-3924 (2014).
87. B. Weniger *i sur.*, Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med* **61**, 77-79 (1995).
88. Y. C. Hwang, J. J. Chu, P. L. Yang, W. Chen, M. V. Yates, Rapid identification of inhibitors that interfere with poliovirus replication using a cell-based assay. *Antiviral Res* **77**, 232-236 (2008).
89. B. Sener, I. Orhan, J. Satayavivad, Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytother Res* **17**, 1220-1223 (2003).
90. J. Kang *i sur.*, Lycorine inhibits lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 up-regulation in RAW264.7 cells through suppressing P38 and STATs activation and increases the survival rate of mice after LPS challenge. *Int Immunopharmacol* **12**, 249-256 (2012).
91. N. Oumata *i sur.*, The toll-like receptor agonist imiquimod is active against prions. *PLoS One* **8**, e72112 (2013).
92. S. Bach *i sur.*, Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol* **21**, 1075-1081 (2003).
93. T. D. Kanneganti *i sur.*, Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**, 233-236 (2006).
94. N. Hanagata, Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomedicine* **7**, 2181-2195 (2012).
95. K. Kobiyama *i sur.*, Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 3086-3091 (2014).
96. D. C. Klein, E. Latz, T. Espevik, B. T. Stokke, Higher order structure of short immunostimulatory oligonucleotides studied by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **110**, 689-693 (2010).
97. J. R. Casey, S. Grinstein, J. Orlowski, Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 50-61 (2010).
98. Y. Zhou *i sur.*, TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C. *Innate Immun* **19**, 184-192 (2013).
99. M. Jiang *i sur.*, Innate immune responses in human monocyte-derived dendritic cells are highly dependent on the size and the 5' phosphorylation of RNA molecules. *J Immunol* **187**, 1713-1721 (2011).

100. N. Pirher, K. Ivicak, J. Pohar, M. Bencina, R. Jerala, A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 761-763 (2008).
101. A. Kuznik *i sur.*, Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J Immunol* **186**, 4794-4804 (2011).
102. C.-C. Lee, K.-J. Liu, L.-L. Chen, Y.-C. Wu, T.-S. Huang, Tumor Necrosis Factor-α, Interleukin-8 and Interleukin-6Are Involved in Vascular Endothelial Cell Capillary Tubeand Network Formation Induced by Tumor-AssociatedMacrophages. *Journal of Cancer Molecules* **2**, 155-160 (2006).

§ 8. ŽIVOTOPIS

Natalija Knežević Teofilović rođena je u Osijeku 26. veljače 1975. godine, gdje je završila osnovnu školu i III. gimnaziju. Godine 1994. upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Medicinska biokemija. Godine 1998. upisuje smjer Farmacija, na istom fakultetu. Iste godine postaje stipendist PLIVE d.d.. U lipnju 2000. godine diplomirala je na oba fakulteta te se u srpnju iste godine zapošljava u PLIVI d.d., u Istraživanju i razvoju, Razvojnoj analitici, Bioanalitici. Tijekom prethodnih šesnaest godina zaposlena je u istoj tvrtki. Prvih devet godina radila je u Istraživanju i razvoju na području analitike biotehnoloških proizvoda i ispitivanja stabilnosti gotovih farmaceutskih oblika. U sklopu profesionalnog razvoja, 2000. godine upisuje poslijediplomski studij Kemije, smjer Biokemija na Prirodoslovno matematičkom fakultetu sveučilišta u Zagrebu. Godine 2012. prelazi na poslijediplomski doktorski studij.

Tijekom rada u odjelu Istraživanje i razvoj pohađala je niz domaćih i međunarodnih edukacija iz područja analitike proteina i biotehnoloških proizvoda.

Od 2009. godine zaposlena je u odjelu Marketinga i prodaje, PLIVA Hrvatska d.o.o..

Popis javno objavljenih radova:

1. Knežević Teofilović, Natalija; Bihi, Majjoub; Radić Stojković, Marijana; Tumir, Lidija; Ester, Katja; Kralj, Marijeta; Majhen, Dragomira; Oršolić, Nada; Lepur, Adriana; Vrbanec, Damir; Markotić, Alemka; Dembić, Zlatko; Weber, Alexander N.R; Piantanida, Ivo; Vugrek, Oliver; Diken, Mustafa; Knežević, Jelena
   1-ethyl-3-(6-methylphenanthridine-8-il) urea modulates TLR3/9 activation and induces selective pro-inflammatory cytokine expression in vitro. Bioorganic & medicinal chemistry letters (0960-894X) 27 (2017), 7; 1530-1537 (članak, znanstveni)
2. Debeljak, Željko; Srečnik, Goran; Madić, Tomislav; Petrović, Marinko; Knežević, Natalija; Medić-Šarić, Marica.
   Evaluation of Novel Sample Identification Approach Based on Chromatographic Fingerprint Set Correlation Homogenity Analysis. Journal of Chromatography A. 1062(2005) , 1; 79-86 (članak, znanstveni).

3. Grdiša, Mirica; Mikecin, Ana-Matea; Knežević, Natalija.
Fibrinolytic enzymes from earthworms. // Dynamic Soil, Dynamic Plant. 3 (2009) , 2; 61-63 (pregledni rad, znanstveni).
4. Zorc, Branka; Knežević, Natalija.
Simpatomimetici. // Farmaceutski glasnik. 57 (2001) , 1; 1-10 (pregledni rad, stručni).
5. Zorc, Branka; Knežević, Natalija.
Neurotransmitori u simpatikusu. // Farmaceutski glasnik. 56 (2000) , 12; 429-436 (članak, stručni).