

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Peter OTA

**PREUČEVANJE VLOG MEDDOMENSKIH REGIJ
V TOLL-PODOBNEM RECEPTORJU 4
S POVEČANJEM NJIHOVE FLEKSIBILNOSTI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Peter OTA

**PREUČEVANJE VLOG MEDDOMENSKIH REGIJ V
TOLL-PODOBNEM RECEPTORJU 4 S POVEČANJEM
NJIHOVE FLEKSIBILNOSTI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE STUDY OF ROLES OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4
INTERDOMAIN REGIONS BY INCREASING
THEIR FLEXIBILITY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Raziskave so bile opravljene v Laboratoriju za biokemijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je na osnovi Pravilnika o diplomskem delu za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Romana Jerala, za recenzenta prof. dr. Petra Mačka in za predsednika komisije doc. dr. Mateja Butalo.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Matej BUTALA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Roman JERALA
Kemijski inštitut Ljubljana, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Peter MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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

Peter Ota

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 577.27(043.2)=163.6
- KG imunski sistem / prirojena imunost/ receptor TLR4 / mehanizem aktivacije / sklopitev domen / peptidni povezovalc / LPS / endotoksin
- AV OTA, Peter
- SA JERALA, Roman (mentor) / MAČEK, Peter (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2016
- IN PREUČEVANJE VLOG MEDDOMENSKIH REGIJ V TOLL-PODOBNEM RECEPTORJU 4 S POVEČANJEM NJIHOVE FLEKSIBILNOSTI
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 60 str., 16 sl., 14 pregl., 56 vir.
- IJ sl
- JI sl/an
- AI V raziskavi smo preučili vloge mejnih področij med rigidnimi strukturnimi domenami človeškega receptorja TLR4 ob njegovi aktivaciji z endotoksinom. Z vstavitvijo serije fleksibilnih peptidnih povezovalcev (linkerjev) v mejna področja med strukturnimi domenami smo povečali njihovo gibljivost in tako prek spremenjene zmožnosti aktivacije receptorja spoznali vlogo strukturnih adaptacij domenskih sklopitev pri aktivaciji in znotrajcelični signalizaciji. Rezultati z insercijskimi mutanti kažejo, da je rigidna ektodomena glede na membrano pozicionirana pokončno, kar ji omogoča inhibicijo dimerizacije in tvorbo homodimera ob vezavi agonista. Ob tem približa inhibitorni regiji in preko transmembranskega sidra znotrajcelični domeni v zadostno bližino, da jima je prek gibljivih nativnih povezovalcev omogočena združitev v signalni kompleks z adapterskimi proteini.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 577.27(043.2)=163.6
- CX immune system / innate immunity / receptor TLR4 / activation mechanism / domain coupling / peptide linker / LPS / endotoxin
- AU OTA, Peter
- AA JERALA, Roman (supervisor) / MAČEK, Peter (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2016
- TI THE STUDY OF ROLES OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 INTERDOMAIN REGIONS BY INCREASING THEIR FLEXIBILITY
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 60 p., 16 fig., 14 tab., 56 ref.
- LA sl
- AL sl/an
- AB In the research we have examined the nature of boundaries between the rigid structural domains of human TLR4 receptor during its activation with endotoxin. We increased their flexibility with insertions of a series of peptide linkers in protein's interdomain regions and tried to elucidate the role of their structural adaptations in receptor activation and intercellular signal transduction. The results from experiments with insertion mutants showed that the rigid ectodomain is erected relative to the membrane in order to facilitate inhibition of dimerisation and formation of a homodimer after agonist binding. During activation, the dimerised receptors sufficiently decrease the distance between their intercellular domains in order to enable the formation of a signal complex through flexibility of native cytoplasmic linkers.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	11
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA	11
2 PREGLED OBJAV	12
2.1 IMUNSKI SISTEM	12
2.2 TOLL-PODOBNI RECEPTORJI	14
2.2.1 Zgradba in vrste TLR-jev	14
2.2.2 Celično izražanje TLR-jev	17
2.2.3 Receptor TLR4	17
2.2.4 Dimerizacija aktiviranega TLR4 in navzdolnja signalna kaskada	17
2.2.5 Vloga receptorjev TLR pri aktivaciji specifične imunosti	19
2.3 PREPOZNAVA PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJ S TLR4	20
2.4 ENDOTOKSIN	22
2.5 SEPSA IN SEPTIČNI ŠOK	24
3 MATERIAL IN METODE	26
3.1 MATERIAL	26
3.1.1 Kemikalije in encimi	26
3.1.2 Raztopine in pufri	27
3.1.3 Gojišča	29
3.1.4 Laboratorijska oprema in komercialni pribori	29
3.1.5 Protitelesa	30
3.1.6 Oligonukleotidi	30
3.1.7 Plazmidi	31
3.1.8 Bakterijska in celični kulturi	31
3.2 METODE	32
3.2.1 Sterilizacija steklovine, plastike in gojišč	32
3.2.2 Delo z bakterijskimi kulturami	32

3.2.2.1	Gojenje bakterijskih sevov	32
3.2.2.2	Transformacija bakterijskih celic	32
3.2.3	Agarozna gelska elektroforeza	33
3.2.4	Izolacija DNA	33
3.2.4.1	Izolacija plazmidne DNA za mutagenozo in sekveniranje	33
3.2.4.2	Izolacija plazmidne DNA iz agaroznega gela	34
3.2.4.3	Izolacija plazmidne DNA za celične kulture	34
3.2.5	Merjenje koncentracije DNA	35
3.2.6	Priprava mutantov	35
3.2.6.1	Insercija edinstvenega restrikcijskega mesta	36
3.2.6.2	Insercija nukleotidnih zaporedij	37
3.2.7	Delo s celičnimi kulturami	38
3.2.7.1	Gojenje celičnih kultur	38
3.2.7.2	Transfekcija in stimulacija mutantov	38
3.2.8	Merjenje luminiscence luciferaz kresnice in renile	40
3.2.9	Ekspresija proteinov	40
3.2.9.1	Priprava vzorcev za elektroforezo	40
3.2.9.2	Poliakrilamidna gelska elektroforeza (NaDS-PAGE)	41
3.2.9.3	Prenos western in imunodetekcija	41
4	REZULTATI	42
4.1	INSERCIJSKI MUTANTI	42
4.2	AKTIVACIJA MUTANTOV hTLR4	45
4.3	EKSPRESIJA MUTANTOV hTLR4	48
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	49
5.1	RAZPRAVA	49
5.1.1	Povečanje gibljivosti znotrajcelične domene	49
5.1.2	Povečanje gibljivosti ektodomene	50
5.1.3	Povečanje fleksibilnosti znotraj ektodomene	51
5.1.4	Predlagani model dimerizacije TLR4	53
5.2	SKLEPI	53
6	POVZETEK	54
7	VIRI	55
	ZAHVALA	
	PRILOGA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz imunskega sistema vretenčarjev	12
Slika 2: Osnovna zgradba Toll-podobnih receptorjev	14
Slika 3: Mehanizem prenosa signala s TLR4	18
Slika 4: Od MyD88 odvisna IL-1R/TLR4 signalna kaskada	19
Slika 5: S TLR aktiviran specifičen imunski odziv	20
Slika 6: Zgradba celične stene po Gramu negativnih in pozitivnih bakterij	21
Slika 7: Od MyD88-odvisna in neodvisna pot signalizacije	22
Slika 8: Shematski prikaz strukture endotoksina	23
Slika 9: Shematski modeli insercijskih mutantov hTLR4	43
Slika 10: Stopnja aktivacije mutantov TM-TIR	46
Slika 11: Stopnja aktivacije mutantov CRD-TM	47
Slika 12: Stopnja aktivacije mutantov LRR	47
Slika 13: Stopnja aktivacije mutantov CRD	48
Slika 14: Imunodetekcija po prenosu western	49
Slika 15: Predlagani model učinka fleksibilnih povezovalcev	51
Slika 16: Model dimerizacije receptorjev TLR4 in mehanizem delovanja inhibicije	52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prepoznavna različnih mikrobnih komponent s TLR	16
Preglednica 2: Kemikalije in encimi, uporabljeni pri poizkusih	26
Preglednica 3: Uporabljene raztopine in pufri	27
Preglednica 4: Gojišča za bakterije in celične kulture	29
Preglednica 5: Uporabljena laboratorijska oprema in komercialni pribori	29
Preglednica 6: Protitelesa, uporabljena za določitev ekspresije proteinov	30
Preglednica 7: Oligonukleotidi, uporabljeni za insercije	30
Preglednica 8: Plazmidi, uporabljeni pri mutagenezi in aktivaciji mutantov hTLR4	31
Preglednica 9: Reakcijska mešanica za izvedbo metode QuikChange	36
Preglednica 10: Potek ciklične reakcije za insercijo restrikcijskega mesta	36
Preglednica 11: Restrikcijsko-ligacijska mešanica za insercijske reakcije	37
Preglednica 12: Transfekcijska mešanica za HEK293	39
Preglednica 13: Poravnava peptidnih zaporedij ortologov hTLR4	43
Preglednica 14: Seznam pridobljenih mutantov hTLR4	45

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APC	antigen predstavitvena celica
CD14	lipotransferazni protein CD14
cDNA	komplementarna DNA
ddH ₂ O	dvojno destilirana voda
DAMP	z nevarnostjo povezani molekularni vzorci
DMEM	Dulbeccovo modificirano gojišče Eagle
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
<i>E.coli</i> DH5 α	sev DH5 α bakterije <i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamintetraacetat
FBS	fetalni goveji serum
HEK293	linija človeških zarodnih ledvičnih celic
hMD-2	človeški MD-2
hTLR4	človeški TLR4
IFN- β	interferon- β
IKK	I κ B kinaza
IL	interlevkin
IRAK	z receptorjem IL-1 asociirana kinaza
IRF3	interferon regulatorni faktor 3
KDO	2-keto-3-deoksioktanska kislina
LB	gojišče Luria-Bertani
LBP	LPS vezavni protein
LPS	lipopolisaharid (endotoksin)
LRR	levcinsko-bogata ponovitev
LRR-CT	C-terminalna s cisteinom bogata LRR
LRR-NT	N-terminalna s cisteinom bogata LRR
Mal/TIRAP	adaptorski protein podoben MyD88
MD-2	diferenciacijski mieloidni protein - 2
MyD88	diferenciacijski mieloidni protein 88
m/v	razmerje masa / volumen

NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z NaDS-om
NF- κ B	jedrni faktor κ B
obr./min	obrati na minuto
PAMP	s patogenom asociiran molekularni vzorec
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PRR	vzorčno prepoznavni receptor
renila	ožigalkar <i>Renilla reniformis</i>
S-LPS	gladki lipopolisaharid z O-antigenom iz <i>Salmonella minnesota</i>
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletildiamin
TIR	domena receptorja Toll/Interlevkin-1
TLR	Toll-podoben receptor
TNF- α	faktor tumorske nekroze α
TRAM	TRIF-sorodna adaptorska molekula
TRIF	IFN- β inducirajoč adaptor z domeno TIR
v/v	razmerje volumen / volumen

1 UVOD

Med evolucijo smo vretenčarji v stalnem stiku s številnimi oblikami mikrobov razvili visoko specifičen imunski sistem, ki z obsežnim repertoarjem površinskih receptorjev in imunskim spominom nadgrajuje prirojene imunske odzive telesa. Danes vemo, da je specifičnost prisotna tudi v omejenem številu receptorjev naravnega imunskega sistema, s katerimi organizem prepozna in reagira na širok razpon značilnih molekulskih vzorcev mikroorganizmov. Lipopolisaharidi, znani tudi kot endotoksini, so eni izmed najbolj imunostimulativnih in konzervativnih bakterijskih struktur, preko katerih vretenčarji zaznajo stik in okužbo z gramnegativnimi bakterijami. Receptor za endotoksin je TLR4, član družine vzorčno prepoznavnih Toll-podobnih receptorjev. Ta ob stimulaciji z lipopolisaharidom sproži signalne poti v imunskih celicah, ki vodijo v aktivacijo vnetnih genov in sproščanje vnetnih mediatorjev ter kostimulativnih molekul imunskega sistema, kar pa pogosto vodi v organizmu kvarne preobčutljivostne odgovore, ki jih imenujemo sepsa in septični šok. Kljub dobri raziskanosti receptorja TLR4, njegove signalizacijske kaskade in v njo udeleženih proteinov ter z njimi aktiviranih genov, model dimerizacije TLR4 in molekularni mehanizem delovanja receptorja ob njegovi aktivaciji še vedno nista dokončno raziskana.

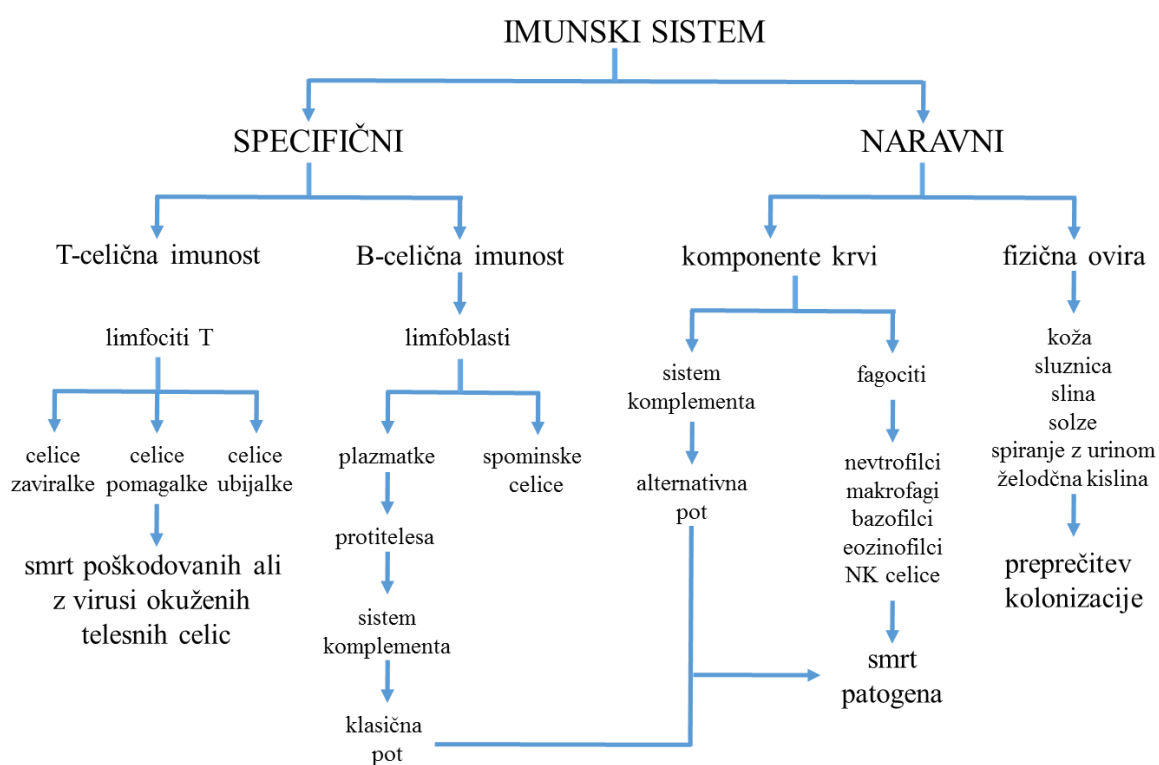
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

Namen naše raziskave je bil razkriti vlogo mejnih področij med rigidnimi strukturnimi domenami človeškega receptorja TLR4 ob njegovi aktivaciji z endotoksinom. Predvidevali smo, da stimulacija receptorja povzroči strukturne spremembe njegovih meddomenskih regij, kar omogoči prenos signala z dimerizacijo aktiviranih receptorjev in njihovih citosolnih domen ter iniciacijo znotrajceličnega signalnega procesa. Z vstavitvijo serije fleksibilnih peptidnih linkerjev v mejna področja med strukturnimi domenami smo želeli povečati njihovo gibljivost in tako prek spremenjene zmožnosti aktivacije receptorja spoznati vlogo strukturnih adaptacij domenskih sklopitev pri aktivaciji in znotrajcelični signalizaciji, kar bi nam dalo vpogled v molekularni mehanizem delovanja človeškega receptorja TLR4.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IMUNSKI SISTEM

Pod stalnim pritiskom okužbe s patogenimi mikroorganizmi so vretenčarji s prilagoditvami obrambe proti njim razvili različne sisteme imunskega odziva, ki omogočajo uspešno eliminacijo povzročiteljev bolezni iz telesa. Imunski sistem sesalcev je sestavljen iz dveh vej: prirojene oz. naravne in pridobljene oz. specifične imunosti (slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz imunskega sistema vretenčarjev (prirejeno po Rodrigue, 2014: 3)

Naravni imunski sistem predstavlja prvo linijo obrambe pred patogeni, agensi obrambe so v tem primeru fagociti. Specifična imunost omogoča odstranitev patogenov v pozni fazi infekcije, poleg tega je vpletena v tvorbo imunskega spomina. Specifičnost se razvije s klonalno selekcijo širokega spektra limfocitov z različnimi površinskimi receptorji za antigene, ki se tvorijo v procesu genske prerazporeditve (Janssens in Beyaert, 2003).

Posledično je pridobljeni odziv v primerjavi z naravnim imunskim sistemom časovno zamaknjen. Danes vemo, da je specifičnost prisotna tudi v prirojenem imunskem odzivu, saj lahko organizem prepozna in reagira na lastne in tuje antigene različnih patogenov (Janeway in Medzhitov, 2002).

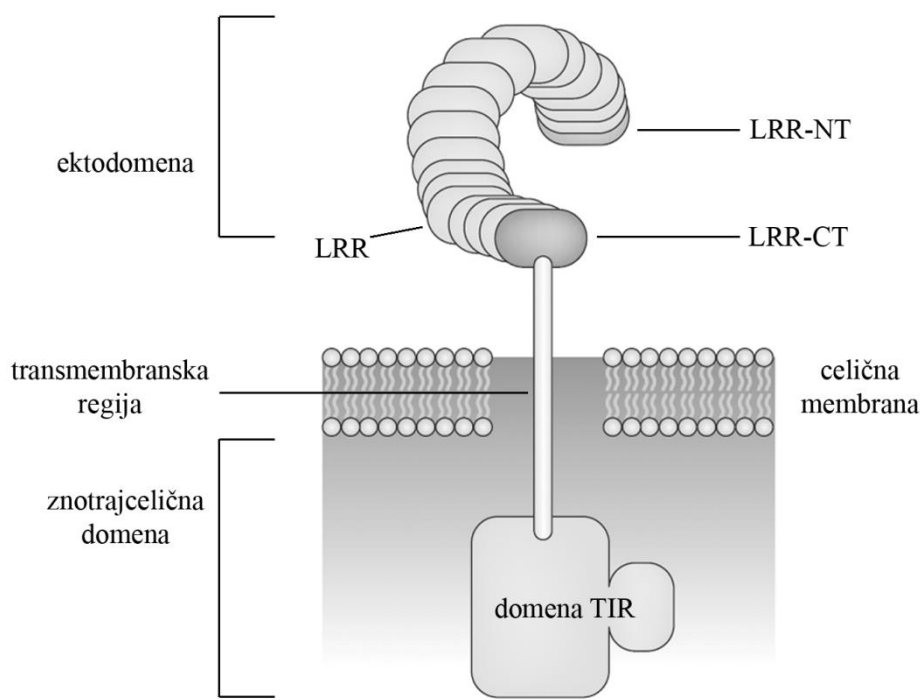
V nasprotju s specifičnim imunskim sistemom, ki ima obsežen repertoar površinskih receptorjev, naravni imunski sistem prepozna mikroorganizme s pomočjo omejenega števila vzorčno prepoznavnih receptorjev (angl. PRRs, pattern recognition receptors), ki so specifični za različne celične linije. PRR-jem je skupnih več lastnosti: ti receptorji prepoznajo komponente mikroorganizmov, ki jih imenujemo s patogeni povezani molekularni vzorci, ali vzorci PAMP (angl. pathogen-associated molecular pattern), ki so nujni za preživetje mikroorganizmov ter posledično znotraj taksonomskih skupin močno ohranjeni (Medzhitov in Janeway Jr., 2000; Janssens in Beyaert, 2003). Izražanje PRR-jev je konstitutivno in omogoča zaznavo mikroorganizmov ne glede na njihovo razvojno stopnjo. Receptorji naravnega imunskega sistema so specifični za klično linijo celic, so neklonalni, izraženi na vseh celicah danega tipa in neodvisni od imunskega spomina. Različni receptorji reagirajo z zanje značilnimi molekulskimi vzorci patogenov, aktivirajo specifične signalne poti in vodijo do različnih odzivov proti patogenom (Akira in sod., 2006).

Molekulski vzorci patogenov si delijo več lastnosti, ki posredujejo imunogenost. Ker so nujni za preživetje mikroorganizmov, so kljub negativnim selekcijskim pritiskom imunskega sistema ostali evolucijsko dobro ohranjeni. Prisotnost PAMP-a na celici mikroorganizma le-to identificira kot gostiteljskemu organizmu nelastno celico, saj gostiteljske celice teh vzorcev ne proizvajajo. Nekateri predstavljajo molekularni podpis celotnih taksonov, drugi vzorci pa le določene vrste patogena, kar ob prepoznavi poveča specifičnost imunskega odziva nanj (Medzhitov in Janeway Jr., 2000).

2.2 TOLL-PODOBNI RECEPTORJI

2.2.1 Zgradba in vrste TLR-jev

Toll-podobni receptorji (angl. Toll-like receptors, TLR) predstavljajo enega od razredov vzorčno prepoznavnih receptorjev. Evolucijsko najstarejši TLR je bil odkrit pri nematodu *Caenorhabditis elegans* (Rich in sod., 2000), kljub različnim vlogam pa so v toku razvoja njegovi homologji ohranili značilne strukture njegovih domen. Družina TLR je bila osnovana z odkritjem proteina Toll pri preučevanju embriogeneze vinske mušice *Drosophila sp.* (Anderson in sod., 1985), za katerega se je pozneje izkazalo, da sodeluje tudi pri imunskem odzivu proti glivičnim infekcijam in po Gramu pozitivnim bakterijam pri odraslih osebkih. Genske raziskave Toll-a so razkrile družino številnih homolognih vretenčarskih receptorjev, ki so udeleženi pri prepoznavi različnih konzervativnih mikrobnih komponent. Družino so poimenovali Toll-podobni receptorji, pri človeku je do sedaj znanih 11 članov (Akira in sod., 2006).



Slika 2: Osnovna zgradba Toll-podobnih receptorjev (povzeto po Gay in sod., 2006: 694)

Po zgradbi uvrščamo TLR-je med integralne membranske glikoproteine tipa I. Zanje je značilna prisotnost zunajceličnih domen z različnim številom motivov z levcinom-bogatih ponovitev (angl. leucine-rich repeat, LRR), ki so na amino in karboksilnem terminusu omejeni s strukturami, bogatimi s cisteinom (Buchanan in Gay, 1996), ter znotrajceličnih signalnih domen TIR (angl. Toll/IL-1R homology domain), ki so homologne interlevkinskemu receptorju 1 (IL/1R, angl. interleukin 1 receptor) (Gay in Keith, 1991; Bowie in O'Neill, 2000). Osnovna zgradba TLR-jev je prikazana na sliki 2.

Ektodomene TLR-jev tvorijo bloki od 19 do 25 z levcinom bogatih motivov, katerih dolžina variira od 24 do 29 aminokislin. Motiv LLR tvori aminokislinsko zaporedje XLXXLXLXX, kot tudi druga ohranjena zaporedja (XØXXØXXXXFXXLX; Ø = hidrofobni ostanek, X = poljubna aminokislina), ki se zvijejo v ravnino beta in heliks alfa, oba pa sta povezana z zankami (Akira in sod., 2006). Ponavljajoči se motivi tvorijo pri TLR-jih podkvi podobno LRR domeno, ki je na obeh koncih omejena s cisteinsko bogatima regijama - variabilnejšo N-terminalno LRR-NT in bolj konzervativno ohranjeno C-terminalno poddomeno LRR-CT. Poročila glede identitete vezavne površine za ligande LRR se med seboj razlikujejo. Predhodno so domnevali, da je za vezavo odgovorna konkavna stran LRR, rezultati kristalizacijskih študij pa nakazujejo, da ligande veže konveksna stran bloka levcinskih ponovitev (Chloe in sod., 2005). C-terminus ektodomene TLR je prek transmembranskega heliksa alfa povezan s citoplazmatsko domeno TIR, ki omogoča sklopitev aktivacije receptorja z navzdoljno signalno kaskado (Akira in Takeda, 2004; Gay in sod., 2006).

Na osnovi primarne zgradbe lahko TLR nadalje razdelimo na poddružine TLR, ki prepoznavajo in se vežejo z značilnimi skupinami strukturno podobnih PAMP-ov (preglednica 1). Nukleinske kisline prepoznavajo člani poddružin TLR3, TLR 7, TLR8 in TLR9, medtem ko se na lipidne molekule vežejo TLR1, TLR2 in TLR6. Zanimivo izjemo naj bi predstavljali predstavniki poddružine TLR4, saj interagirajo s strukturno različnimi ligandi (Akira in sod., 2006), vendar še ni popolnoma jasno, ali gre pri nekaterih primerih za kontaminacijo z lipopolisaharidom, ki je znani agonist tega receptorja.

Preglednica 1: Prepoznavna različnih mikrobnih komponent s TLR. TLR4 (označeni odebeljeno) reagirajo s širokim spektrom mikrobnih molekul (povzeto po Akira in sod., 2006: 784)

Mikrobna komponenta	Organizem	Receptor
Bakterije		
lipopolisaharidi	po Gramu negativne bakterije	TLR4
diacil lipopeptidi	<i>Mycoplasma</i>	TLR6/TLR2
triacil lipopeptidi	bakterije in mikobakterije	TLR1/TLR2
lipoteihoična kislina	streptokoki skupine B	TLR6/TLR2
fosfatidil glicerol	po Gramu pozitivne bakterije	TLR2
porini	<i>Neisseria</i>	TLR2
lipoarabinomanan	<i>Mycobacteria</i>	TLR2
flagelin	bičkaste bakterije	TLR5
CpG-DNA	bakterije in mikobakterije	TLR9
nedoločena	uropatogene bakterije	TLR11
Glive		
zimosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR6/TLR2
fosfolipomanan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
manan	<i>Candida albicans</i>	TLR4
glukuronoksilomanan	<i>Cryptococcus neoformans</i>	TLR2 in TLR4
Paraziti		
tGPI-mutin	<i>Trypanosoma</i>	TLR2
glikoinozitol fosfolipidi	<i>Trypanosoma</i>	TLR4
hemozoin	<i>Plasmodium</i>	TLR9
profilinu podobna molekula	<i>Toxoplasma gondii</i>	TLR11
Virusi		
DNA	virusi	TLR9
dsRNK	virusi	TLR3
ssRNK	RNK virusi	TLR7 in TLR8
protein virusne ovojnice	RSV, MMTV	TLR4
hemaglutinin	virus ošpic	TLR3
nedoločena	HCMV, HSV1	TLR2
Nativna komponenta		
Hsp60, Hsp70		TLR4
fibrinogen		TLR4

2.2.2 Celično izražanje TLR-jev

Receptorji družine TLR so površinsko izraženi na različnih tipih celic: makrofagih, dendritskih celicah, limfocitih B, specifičnih tipih limfocitov T ter celo na neimunskih celicah (fibroblasti, epitelne celice). Hitrost izražanja TLR-jev se hitro poveča ob odzivu na prisotnost patogenov, različnih citokinov in v okviru stresnih odzivov. TLR-ji se lahko izražajo znotraj in zunajcelično; TLR3, TLR7 in TLR8 so prisotni le v znotrajceličnih organelih (npr. endosomih), TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 in TLR6 pa na celični površini (Akira in sod., 2006).

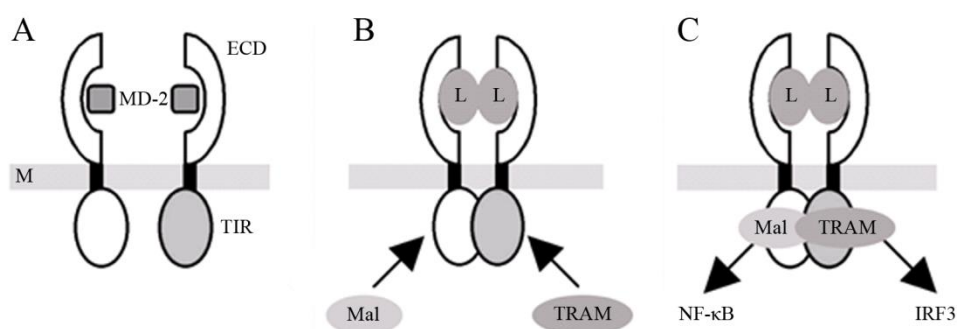
2.2.3 Receptor TLR4

Receptor TLR4 tvorijo ektodomena iz 608 aminokislin z 22 levcinskijskimi ponovitvami, ena sama transmembranska domena in citosolna domena iz 187 a.k. (Medzhitov in sod., 1997). TLR4 je edini izmed TLR-jev, ki za vezavo liganda zahteva prisotnost koreceptorja - MD-2 (Shimazu in sod., 1999). Glikoprotein MD-2 (angl. myeloid differentiation-2), ki je izražen in vezan s TLR4 na nevtrofilnih in monocitnih fagocitih, ob vezavi z lipidom A lipopolisaharida inducira dimerizacijo dveh molekul receptorja v kompleks TLR4/MD-2/LPS ter omogoči interakcijo znotrajceličnih domen TIR in rekrutacijo adaptorskih proteinov (Saitoh in sod., 2004). TLR4 naj bi poleg LPS-a prepoznal tudi komponente virusov (protein virusne ovojnice), gliv (manan in glukuronoksilomanan) in parazitov (glikoinozitol fosfolipidi).

2.2.4 Dimerizacija aktiviranega TLR4 in navzdolnja signalna kaskada

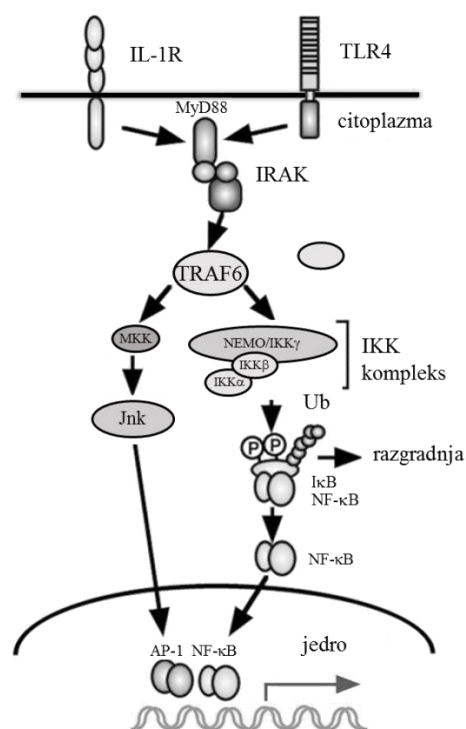
Kristalne strukture topnih kompleksov ektodomen TLR4 z MD-2 kažejo, da se dimer tvori le ob prisotnost agonistov in z njimi tvori simetričen multimer (Kim in sod., 2007; Park in sod., 2009). Konformacijske preureditve ektodomen ob aktivaciji receptorjev inducirajo asociacijo med citosolnima domenama TIR receptorjev (Gay in sod., 2006), kar omogoči vezavo adaptorskih molekul v signalosom. Aktivirani TLR4 v nasprotju z drugimi TLR-ji vodi v prenos signalov prek dveh različnih skupin adaptorskih proteinov, Mal in MyD88, ter TRAM in TRIF (Fitzgerald in sod., 2001; Fitzgerald in sod., 2003). Mal oz. TRAM s

svojima domenama TIR interagirata neposredno s TLR4 ter tvorita most za novačenje MyD88 in TRIF. Mal je potreben za hitro jedrno translokacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B ter proizvodnjo vnetnih citokinov, TRAM pa omogoči aktivacijo transkripcijskega faktorja IRF3 (angl. interferon regulatory factor 3) in z interferoni reguliranih genov (Akira in Takeda, 2004; Miguel in sod., 2007). Mehanizem prenosa signala prek dimerizacije je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Mehanizem prenosa signala s TLR4. ECD - ektodomena; MD-2 – kofaktor; M - membrana; L - LPS. A: Pred aktivacijo se molekule receptorjev v membrani prosto gibljejo, možna je občasna dimerizacija. B: Ob vezavi agonistov ektodomeni tvorita dimer in približata znotrajcelični domeni TIR. C: Ti domeni z adaptorskimi proteini tvorijo signalizacijski kompleks ter po dveh poteh aktivirajo transkripcijskih faktorjev NF- κ B in IRF3. (Miguel in sod., 2007: 2)

TLR4 in IL/1R signalizacija si delita podobne navzdolnje efektorje (Akira in Takeda, 2004). Vezavi LPS-a na TLR4/MD-2 sledi novačenje adaptorskih proteinov, ki vsebujejo domeno TIR (MyD88, Mal/TIRAP, TRAM), na citoplazmatsko stran TLR4. Pri od MyD88 odvisni aktivaciji receptorja TLR4 se prek MD-2 vezave endotoksina tvori homodimer, ki prek domen TIR interagira s citoplazmatsko adaptorsko molekulo MyD88. Ta prek domene smrti asociira s Ser-Thr kinazo IRAK. To povzroči aktivacijo TRAF6, ki nadalje aktivira MAPK kinazo (MKK) in kinazni kompleks IKK. MKK aktivira transkripcijski faktor aktivacijski protein 1 (AP-1), IKK kompleks pa inducira fosforilacijo I κ B, kar vodi v njegovo ubikvitinacijo in razgradnjo (slika 4). Ta proces sprosti NF- κ B in omogoči njegovo translokacijo v jedro, kjer lahko inducira izražanje tarčnih genov ter proizvodnjo vnetnih mediatorjev in kostimulatornih molekul imunskega sistema (Akira in sod., 2001).

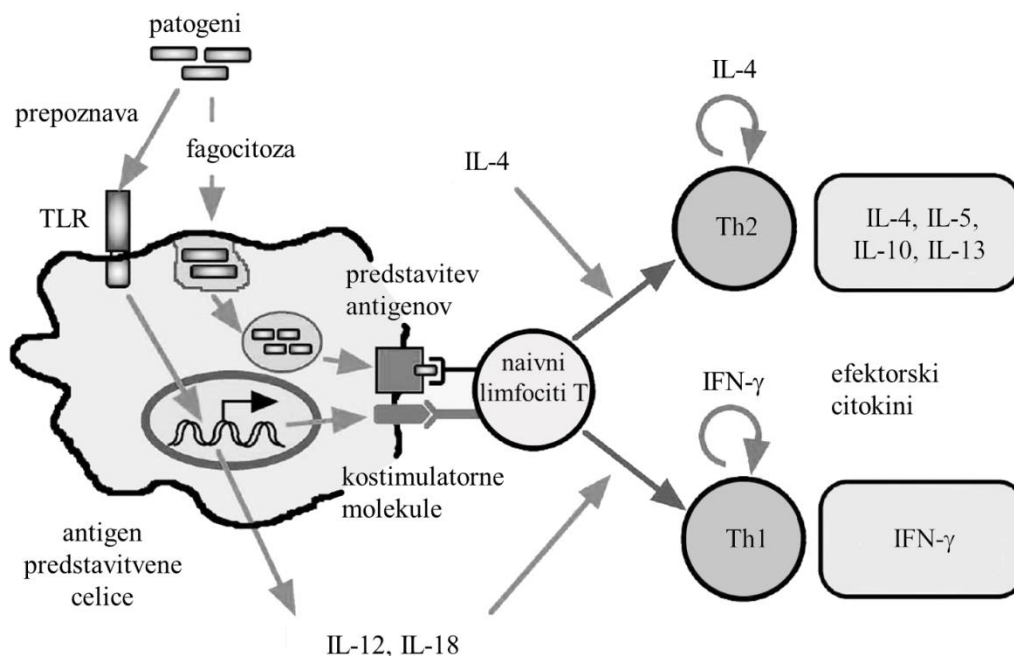


Slika 4: Od MyD88 odvisna IL-1R/TLR4 signalna kaskada. Prikazane so molekularne komponente, vpletene v IL-1R in TLR4 signalizacijo. Aktivirana IL-1R in TLR4 interagirata s citoplazmatsko adaptorsko molekulo MyD88 prek domene TIR. (Akira in sod., 2001: 677)

2.2.5 Vloga receptorjev TLR pri aktivaciji specifične imunosti

Toll-podobni receptorji so poleg aktivacije naravne imunosti lahko tudi ključni faktor aktivacije specifičnega imunskega odgovora. Vloga signalizacije s TLR pri fagocitozi nekaterih antigen predstavitevnic celic (APC), ki površinsko izražajo TLR (dendritske celice, makrofagi), še ni popolnoma razjasnjena (Blander in Medzhitov, 2004; Yates in Russell, 2005), znana pa je pri sprožitvi specifičnega imunskega odziva (slika 5). Preko prepoznavne patogenov ali njihovih produktov receptorji TLR v predstavitevnic celicah inducirajo proizvodnjo interlevkinov IL-12 in IL-18. Ti vodijo diferenciacijo naivnih limfocitov T v celice pomagalko Th1. APC hkrati fagocitirajo, endocitirajo ali preko TLR vežejo patogene, jih razgradijo do posameznih molekulskih komponent ter jih predstavijo naivnim limfocitom T CD4+. Aktivirane dendritske celice istočasno izražajo kostimulatorne molekule, ki so nujne za aktivacijo limfocitov T in pripomorejo k

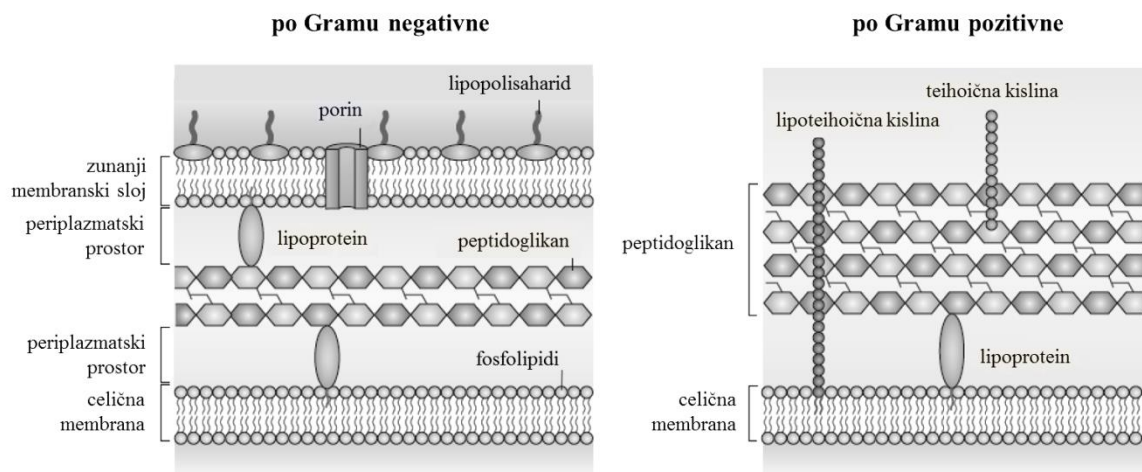
diferenciaciji naivnih limfocitov T v celice pomagalke Th1 in Th2. Povečanje njihovega izražanja spodbuja tudi signalizacija s TLR. Elementi naravne imunosti so tako lahko tudi ključni dejavnik pri vnetnem odzivu kot tudi pri kasnejši iniciaciji pridobljenega imunskega odziva na okužbo s patogeni (Akira in sod., 2001).



Slika 5: S TLR aktiviran specifičen imunski odziv. Antigen-predstavitvene celice (APC) prek aktivacije površinskih TLR nadzorujejo razvoj naivnih limfocitov T v celice pomagalke. S TLR stimulirane APC pretežno vodijo diferenciacijo naivnih limfocitov v tvorbo celic Th1. (povzeto po Akira in sod., 2001: 676)

2.3 PREPOZNAVA PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJ S TLR4

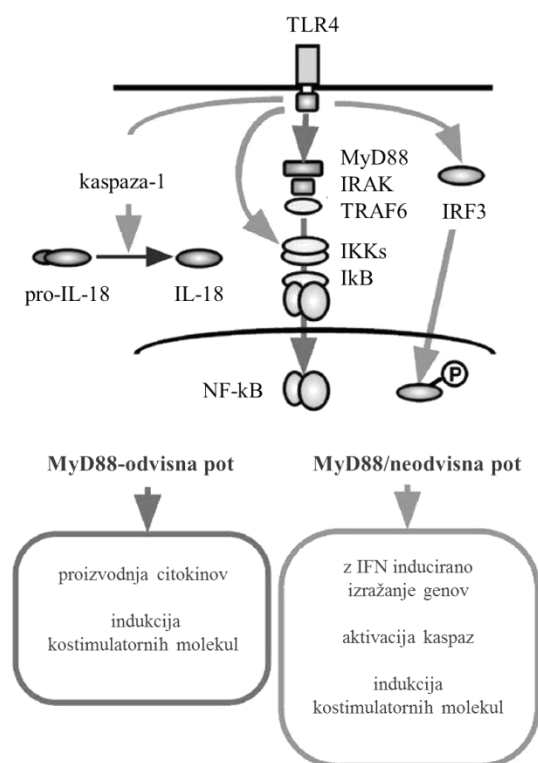
Na osnovi razlik v celični steni delimo bakterije v dve skupini: po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Celično steno po Gramu negativnih bakterij tvori tanek peptidoglikanski sloj med notranjo in zunanjo lipidno membrano. Peptidoglikan je obdan s transportnimi proteini in hidrolitičnimi encimi periplazmatskega prostora in je z zunanjo membrano povezan preko lipoproteinov (slika 6). Zunanja membrana je strukturno kompleksnejša, poleg fosfolipidov in membranskih proteinov njeno zunanjo plast tvorijo tudi kompleksni lipopolisaharidi (LPS) (Beveridge, 1999).



Slika 6: Zgradba celične stene po Gramu negativnih in pozitivnih bakterij (Brown in sod., 2015: 3)

Ob stiku z bakterijo organizem prepozna molekulske vzorce komponent bakterijskih sten z različnimi Toll-podobnimi receptorji, čemur sledi aktivacija imunskih celic. Bakterijski lipopolisaharidi (LPS), znani tudi kot endotoksini, so eni izmed najbolj imunostimulativnih bakterijskih struktur. Za večino simptomov okužbe s po Gramu negativnimi bakterijami je odgovorna podenota LPS, ki jo imenujemo lipid A. Ob rasti ali smrti bakterije je sproščeni LPS monomeriziran s serumskim LPS-vezavnim proteinom (LBP, angl. lipid binding protein). Slednji prenese endotoksin na lipotransferazni protein CD14, ki je izražen na celični površini imunskih celic ali pa v prosti obliki v serumu. Ta nadalje prenese LPS na glikoprotein MD-2, ki je že v interakciji z zunajceličnim delom Toll-podobnega receptorja 4, čemur sledi dimerizacija kompleksa TLR4/MD-2/LPS (Poltorak in sod., 1998; Shimazu in sod., 1999) in prenos signala v celico.

Aktivacija TLR4 lahko vodi prek od MyD88 odvisne ali neodvisne signalne kaskade do posledično različnih odzivov celic - izražanja specifičnih genov, proizvodnje citokinov, aktivacije kaspaz ali indukcije kostimulatornih molekul (slika 7), s katerimi se pri okužbi s patogeni v organizmu že odvija odgovor prirojenega in stimulira odgovor pridobljenega imunskega odziva.

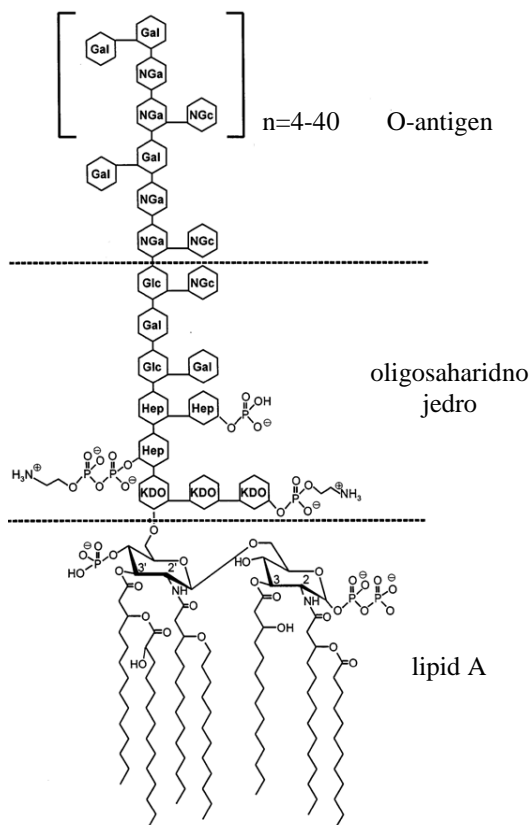


Slika 7: Od MyD88-odvisna in neodvisna pot signalizacije s TLR4 vodita do različnih odzivov celic (povzeto po Akira 2001: 679)

Organizmi imajo tako prek konstitutivno izraženega receptorja TLR4 prirojen hiter in občutljiv mehanizem prepoznave in odgovora na infekcijo z gramnegativnimi bakterijami, ki pa ob povečani koncentraciji endotoksina ali povečani sintezi vnetnih mediatorjev ob odgovoru nanj lahko vodi v organizmu škodljive in smrtne preobčutljivostne reakcije, sepso in septični šok.

2.4 ENDOTOKSIN

Endotoksin ali lipopolisaharid (LPS) je sestavni glikolipid zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij. Strukturno je sestavljen iz lipida A, na katerega je prek skupine dveh ali treh 2-keto-3-deoksioktanskih kislin (KDO) vezano oligosaharidno jedro, to pa se nadaljuje v variabilno stransko polisaharidno verigo iz ponavljajočih se enot (O-antigen). Molekulo lipida A tvori disaharid fosforiliranih glukozaminov, na katerega je vezanih od pet do sedem verig maščobnih kislin, dolgih od 10 do 16 C atomov (slika 8).



Slika 8: Shematski prikaz strukture endotoksina (Magalhaes in sod., 2007: 391)

Unikatna struktura lipida A je povezana s specifičnimi vlogami zunanje membrane bakterij. Negativna naboja fosfatnih skupin v povezavi z maščobnimi kislinami lipida tvorita kemijsko strukturo, drugačno od glicerofosfolipidov drugih membran, kar naredi celico bolj odporno na razgradnjo s fosfolipazami (Raetz, 1990). Zunanji sloj membrane je stabiliziran s privlakom magnezijevih in kalcijevih kationov k naboju lipida A, endotoksin pa prek asociacije z membranskimi proteini tvori strukturni in funkcionalni skelet, nujen za viabilnost po Gramu negativnih bakterij (Lugtenberg in Van Alphen, 1983). Najmanjši del endotoksina, ki še omogoča preživetje bakterij, tvori lipid A, vezan z dvema skupinama KDO, že motnja v izgradnji acilnih verig lipida pa drastično zmanjša sintezo endotoksina in s tem preživetje celic (Galloway in Raetz, 1990).

Lipid A je zaradi svoje nenadomestljivosti ostal najbolj konzervativna struktura bakterijske membrane, kar se zrcali v prilagojenosti imunskega sistema nanj. Tekom evolucije je postal glavni molekularni vzorec pri prepoznavanju naravne in tuje flore gramnegativnih bakterij. Monociti in makrofagi že ob nanogramskih količinah LPS-a v tkivu sprožijo buren vnetni odgovor imunskega sistema, pri katerem je stopnja aktivacije odvisna od strukture toksičnega lipida A različnih bakterijskih vrst in celo od prilagoditvenih sprememb lipida znotraj same bakterijske vrste (Hajjar in sod., 2002; Erridge in sod., 2002).

2.5 SEPSA IN SEPTIČNI ŠOK

Pri bolnikih, ki so okuženi z gramnegativnimi bakterijami, se lahko poleg normalnega vnetnega odziva na bakterijske lipopolisaharide pojavijo tudi nekontrolirani odzivi na ta endotoksin s hujšimi posledicami za bolnike - sepsa, hudo sepsa ali septičnim šokom. Z močnejšo obliko bolezni se povečuje tudi smrtnost bolnikov (Bone in sod., 1992; Balk, 2000).

Sepso definiramo kot dereguliran sistemski vnetni odziv na okužbo, ki povzroči poškodbo lastnih tkiv in organov prek porušene koagulacijske homeostaze krvi in zmanjšane oksigenacije celic. Huda sepsa je napredovanje bolezni, ki jo spremljajo motnje v delovanju vsaj enega od organov. Kadar se ob sepsi pojavita hipotenzija in hiperlaktatemija, govorimo o septičnem šoku (Bone in sod., 1992). V ZDA so hudo sepsa zabeležili pri 2 % hospitalizacij, ki predstavljajo 10 % vseh sprejemov na urgentni oddelek (Rangel-Frausto in sod., 1995; Angus in van der Poll, 2013). Število primerov hude sepse v ZDA presega 300 primerov na 100.000 prebivalcev letno in še vedno narašča (Angus in sod., 2001; Lagu in sod., 2012). V Sloveniji naj bi bila incidenca hude sepse 95 primerov na 100.000 prebivalcev letno (Jereb, 2016).

Odzivi organizma na sepsa vključujejo tako vnetne, kot tudi protivnetne imunosupresivne odgovore. Vnetne odzive sproži interakcija med površinskimi PAMP-i patogenov ali z nevarnostjo povezanimi endogenimi molekulskimi vzorci (angl. danger-associated molecular pattern, DAMP) in površinskimi receptorji imunskih celic gostitelja. Pretiran

vnetni odziv povzroči celično nekrozo, sproščene molekule pa ojačajo že obstoječi vnetni odziv. Dodatno jakost vnetnega odziva povečajo aktivacija levkocitov, komplement in koagulacijski faktorji. Protivnetni imunosupresivni odziv je odvisen od motenega delovanja imunskih celic, nevroendokrinega nadzora vnetja in inhibicije prepisovanja genov, ki sodelujejo v vnetnem odzivu (Wiersinga in sod., 2014). Nevtrofilci so najštevilčnejši levkociti, ki predstavljajo prvo linijo obrambe pred sepsa in za ubijanje bakterij uporabljajo obsežno paleto delovanja: fagocitozo, lovljenje bakterij s površinskimi NET-i (angl. neutrophil extracellular traps) (Brinkmann in sod., 2004; Kaplan in sod., 2012) in sekrecijo citokinov iz granulocitov. Glavna vnetna citokina septičnega odziva sta TNF- α in IL-1, ki aktivirata proizvodnjo drugih vnetnih mediatorjev. V septičnem vnetnem odzivu sodelujejo še drugi vnetni citokini (IL-6, IL-8, IL-12 in IL-17) (Weaver in sod., 2007), INF- γ in granulocitne kolonije stimulirajoči faktor (angl. granulocyte-colony stimulating factor), protivnetni citokin IL-10 (van der Poll in Opal, 2008) in citokin IL-6 z vnetnim in protivnetnim delovanjem. Zaviralni dejavnik migracije makrofagov (angl. macrophage migration inhibitory factor, MIF) je citokin, ki vpliva na vnetni odziv prek modulacije ekspresije TLR4 (Roger in sod., 2001). Poleg njega poveča odziv makrofagov tudi vnetni citokin HMGB-1 (angl. high mobility group box 1), ki poveča jedrno translokacijo NF- κ B prek interakcije s kinazami signalizacijske kaskade TLR4 (Park in sod., 2004).

Klinični znaki sepse se od bolnika do bolnika močno razlikujejo in so odvisni od mesta okužbe, vrste patogenega povzročitelja okužbe, vzorca motenj v delovanju organov, starosti in splošnega zdravstvenega stanja bolnika pred okužbo ter od trajanja okužbe pred začetkom zdravljenja (Angus in van der Poll, 2013). Znaki okužbe so na začetku lahko blagi in poleg vročine obsegajo trombocitopenijo in minljivo hipotenzijo, kasneje pa se kažejo kot hujše motnje v delovanju dihalnega in krvožilnega sistema. Pogosto so prizadete ledvice in osrednji živčni sistem. Zaradi pozne diagnoze bolezni in neučinkovitega zdravljenja z antibiotiki huda sepsa vodi v smrt pri 30 % obolelih, pri starejših in bolnikih z razvitim septičnim šokom pa je smrtnost do 50 % (Cohen 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije in encimi

Preglednica 2: Kemikalije in encimi, uporabljeni pri poizkusih

Kemikalija	Proizvajalec
agar	Merck
agaroz	Sigma
akrilamid	Sigma
amonijev persulfat	Sigma
ampicilin	Sigma
ATP	Sigma
bromfenol modro	Sigma
CoA	Lux
D-MEM Glutamax®	Invitrogen
EDTA	Sigma
etanol	Merck
etidijev bromid	Sigma
FBS	BioWhittaker
GeneJuice®	Novagen
glicerol	Sigma
glicin	Sigma
izopropanol	Merck
koelenterazin	Invitrogen
LB medij	Sigma
ligazni pufer T4 DNA	Promega
lipofektamin 2000	Invitrogen
luciferin	Promega
metanol	Merck
β-merkaptotanol	Sigma
Mini protease inhibitor cocktail	Roche
mleko v prahu, posneto	Pomurske mlekarne
NaCl	Merck
Opti-MEM®	Invitrogen

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2: Kemikalije in encimi, uporabljeni pri poizkusih

Kemikalija	Proizvajalec
Ponceau-S	Fluka
NaDS	Fluka
S-LPS	Dr. K. Brandenburg (Nemčija)
substrat SuperSignal® West Pico	Pierce
TEMED	Sigma
tripsin-EDTA	Sigma
Tris	Sigma
Encim	
BspEI	BioLabs
KasI	BioLabs
ligaza T4 DNA	Promega
polimeraza PfuUltra® DNA	Stratagene

3.1.2 Raztopine in pufri

Preglednica 3: Uporabljene raztopine in pufri

Raztopina / pufer	Sestava
nanašalni pufer 6X za agarozno elektroforezo	40 % (m/v) glukoza 0,25 % bromfenol modro 0,25 % ksilencianol
pufer 50X TAE za agarozno elektroforezo	242 g Tris, pH 8 100 ml 0.5 M EDTA 57,1 ml očetna kislina ddH ₂ O do 1L
4-% nanašalni gel	3,05 ml ddH ₂ O 1,25 ml 0.5 M Tris/HCl, pH 6,8 665 µl 30-% akrilamid 50 µl 10-% (m/v) NaDS 25 µl 10-% (m/v) amonijev persulfat 5 µl TEMED

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 3: Uporabljene raztopine in pufri

Raztopina / pufer	Sestava
10 % ločevalni gel	4 ml ddH ₂ O 2,5 ml 1.5 M Tris/HCl, pH 8,8 100 µl 10-% (m/v) NaDS 3,3 ml 30-% akrilamid 50 µl 10-% (m/v) amonijev persulfat 5 µl TEMED
vzorčni pufer 4X za NaDS	250 mM Tris/HCl, pH 6,8 40 % glicerol 20 % β-merkaptioetanol 8 % NaDS 0,04 % bromfenol modro
elektroforezni pufer 5X za NaDS	15,1 g Tris 7 g glicin 5 g NaDS ddH ₂ O do 1L
raztopina Ponceau	2 % (m/v) Ponceau-S 30 % (m/v) CCl ₃ COOH 30 % (m/v) sulfosalicilna kislina
lizni pufer RIPA	50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1 % Triton X-100 0,1 % NaDS 0,5 % DOC 1x tab. proteaznih inhibitorjev
pufer za prenos western	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 192 mM glicin 20 % (v/v) metanol ddH ₂ O do 1L
raztopina TBS	10 mM Tris/HCl pH 7,4 150 mM NaCl

3.1.3 Gojišča

Preglednica 4: Gojišča za bakterije in celične kulture

Gojišče	Sestava
tekoče gojišče LB	1 % (m/v) kazeinski hidrolizat 5 % (m/v) kvasni ekstrakt 1 % (m/v) NaCl pH 7,0 z NaOH
tekoče gojišče LBA	tekoče gojišče LB 100 µg/ml ampicilin
trdno gojišče LBA	tekoče gojišče LB 1,5 % (m/v) agar 100 µg/ml ampicilin
gojišče za celične kulture	DMEM 10 % (v/v) FBS

3.1.4 Laboratorijska oprema in komercialni pribori

Preglednica 5: Uporabljena laboratorijska oprema in komercialni pribori

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
avtomatske pipete P-10 do P-5000	Eppendorf
elektroforezni aparat Mini-Protean II	Biorad
aparatus za prenos proteinov Multiphor II	Pharmacia LKB
luminometer Mithras LB940	Berthold Technologies
Pribor	
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
MiniElute® Gel Extraction Kit	Qiagen
Mini Trans-Blot®	BioRad
QuikChange® XL Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
UltraMobius™ 200 Plasmid Kit	Novagen

3.1.5 Protitelesa

Preglednica 6: Protitelesa, uporabljena za določitev ekspresije proteinov

Protitelo	Proizvajalec
poliklonska zajčja protitelesa proti FLAG epitopu	Sigma
poliklonska kozja protitelesa proti zajčjim IgG, konjugirana s peroksidazo	Bio-Rad

3.1.6 Oligonukleotidi

Preglednica 7: Oligonukleotidi, uporabljeni za insercije restrikcijskega mesta in linkerjev; sintetizirani pri podjetju GenScript (ZDA)

Insercijski o.	Nukleotidna sekvenca (5' - 3')
LRR S	CATTTTCCAAGTAGTCTAGCTTTCTCCGGATTAAATCTTACTCAGAATGACTTTGC
LRR A	GCAAAGTCATTCTGAGTAAGATTTAATCCGGAGAAAGCTAGACTACTTGGAAAATG
CRD S	ACCAGAGTTTCCTGCAATCCGGATGGATCAAGGACCAGAG
CRD A	CTCTGGTCCTTGATCCATCCGGATTGCAGGAAACTCTGGT
CRD-TM S	TTGAATATCACCTGTCAGATGTCCGGAAATAAGACCATCATTGGTGTG
CRD-TM A	CACACCAATGATGGTCTTATTTCCGGACATCTGACAGGTGATATTCAA
TM-TIR S	CTGGCTGCATAAAGTATGGTTCCGGAAGAGGTGAAAACATCTATGATG
TM-TIR A	CATCATAGATGTTTTACCTCTTCCGGAACCATACTTTATGCAGCCAG
Linkerski o.	
5oligo S	CCGGCGCCAGCG
5oligo A	CCGGCGCTGGCG
10oligo S	CCGGCGCCGGGGCTTCTGCTAGCG
10oligo A	CCGGCGCTAGCAGAAGCCCCGGC

3.1.7 Plazmidi

Preglednica 8: Plazmidi, uporabljeni pri mutagenizi in aktivaciji mutantov hTLR4

Plazmid

pFLAG-CMV-1-hTLR4	V pFLAG-CMV-1 vstavljena cDNA človeškega TLR4. Plazmid vsebuje konstitutivni CMV promotor, SV40 mesto začetka podvojevanja in gen za ampicilinsko rezistenco (Prof. Dr. C. Kirschning, Nemčija).
pEF-BOS-hMD-2-Flag-His	V pEF-BOS vstavljena cDNA človeškega MD-2. Plazmid je pod kontrolo človeškega promotorja EF-1 (Prof. Dr. Y. Nagai, Japonska).
pELAM-1	Reporterski vektor z NF- κ B odvisnim promotorjem gena za luciferazo kresnice <i>Photinus pyralis</i> (Prof. Dr. C. Kirschning, Nemčija).
phRL-TK	Reporterski vektor s konstitutivnim promotorjem gena za luciferazo ožigalkarja <i>Renilla reniformis</i> (Promega).

3.1.8 Bakterijska in celični kulturi

E. coli DH5 α je kompetenten bakterijski sev z mutacijo genov za rekombinazo *recA1* in endonukleazo *endA1*, kar omogoča visoko uspešnost transformacije in stabilnost klonirane plazmidne DNA.

HEK293 je celična linija, nastala s transformacijo kulture človeških zarodnih ledvičnih celic z DNK adenovirusa 5. Celična linija ne izraža Toll-podobnih receptorjev in koreceptorja MD-2, ima pa ohranjene vse znotrajcelične proteine, udeležene v signalizacijski kaskadi TLR4/MD-2/LPS kompleksa.

HEK293T je celična linija s stabilno izraženim poliomavirusnim T antigenom, ki omogoča izboljšano replikacijo vektorjev z SV40 mestom začetka podvojevanja in s tem večjo ekspresijo proteinov, kodiranih na teh vektorjih.

3.2 METODE

3.2.1 Sterilizacija steklovine, plastike in gojišč

Steklovino, plastiko, gojišča in pufrske raztopine za delo z bakterijami in celičnimi kulturami smo predhodno sterilizirali z 20-minutnim avtoklaviranjem pri temperaturi 120 °C in tlaku 1.2×10^5 Pa.

3.2.2 Delo z bakterijskimi kulturami

3.2.2.1 Gojenje bakterijskih sevov

Plazmidno DNA, uporabljeno pri mutagenizi in delu s celičnimi kulturami, smo namnožili v bakterijskem sevu *E. coli* DH5 α . Vzorec trajne bakterijske kulture smo razmazali in čez noč gojili pri 37 °C na trdnem gojišču LB, iz njega izolirano kolonijo pa čez noč pri 37 °C in 200 obr./min v tekočem gojišču LB. Transformirane bakterijske celice novih sevov smo gojili pri enakih pogojih na trdnem in tekočem gojišču LBA z dodanim antibiotikom ampicilinom v končni koncentraciji 100 μ g/ml.

3.2.2.2 Transformacija bakterijskih celic

Za namnožitev pripravljenih plazmidov smo kompetentne bakterijske celice *E. coli* DH5 α transformirali z metodo temperaturnega šoka. Bakterijske celice, shranjene na temperaturi -80 °C, smo odmrznili na ledu, nakar smo jim dodali želeni plazmid (1 μ l/ 250 μ l suspenzije). Zmes smo 30 min inkubirali na ledu, nato za 90 sek segreli na 42 °C, ter ponovno 5 min inkubirali na ledu. Po dodatku 750 μ l LB medija smo suspenzijo stresali 1 uro pri 37 °C in 200 obr./min ter nato razmazali na trdna LBA gojišča in inkubirali čez noč pri 37 °C.

3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Za analizo, identifikacijo in izolacijo mutirane plazmidne DNA smo uporabili postopek ločitve vzorcev DNA z gelsko elektroforezo. Gel smo pripravili z dodatkom suhega agaroznega polisaharida v tris acetatnem puftru (TAE) v končni koncentraciji 1,2 % (m/v). Agarozo smo raztopili s počasnim segrevanjem zmesi v mikrovalovni pečici ter ji po ohladitvi na 60-70 °C dodali etidijev bromid v končni koncentraciji 0,2 µg/ml. Toplo raztopino smo vlili v elektroforezni pladenj, kjer smo s kalupom oblikovali jamice za vzorce DNA. Tako pripravljeni gel smo po ohladitvi prelili s TAE pufrom in v jamice odpipetirali pripravljeno plazmidno DNA, raztopljeno v nanašalnem puftru. Elektroforeza je potekala pri napetosti 100 V do zelene migracije plazmidov, nakar smo gel izpostavili UV svetlobi ter za potrebe analize fotografirali fluorescenco vrinjenega etidijevega bromida. Želene vzorce plazmidne DNA za izvedbo restrikcijsko-ligacijskega postopka mutageneze smo izrezali iz gela in očistili s komercialnim priborom, kot je opisano v poglavju 3.2.4.2.

3.2.4 Izolacija DNA

3.2.4.1 Izolacija plazmidne DNA za mutagenezo in sekveniranje

Izolacijo in čiščenje plazmidne DNA za izvedbo mestno specifične mutageneze ter sekvenciranje smo opravili s priborom GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).

Želene kolonije smo po transformaciji prenesli v 10 ml medija LBA in stresali čez noč pri 37 °C. Suspenzijo smo razdelili v 1,5 ml epruvete eppendorf ter centrifugirali 1 min pri pospešku 12.000 x g. Po odsesavanju supernatanta smo bakterijsko usedlino raztopili v 200 µl resuspenzijskega pufra, dodali 200 µl liznega pufra in zmes po rahlem mešanju 5 min inkubirali. Po dodanih 350 µl nevtralizacijsko-vezavne raztopine smo suspenzijo centrifugirali 10 min pri 12.000 x g, nakar smo bister lizat prenesli v pripravljeno vezavno kolono miniprep ter centrifugirali 1 min pri 12.000 x g. Prosto raztopino smo odstranili, koloni dodali 750 µl čistilnega pufra in jo centrifugirali 1 min pri 12.000 x g. Po odlitju proste raztopine smo kolono posušili s ponovnim 2-minutnim centrifugiranjem pri 12.000

x g ter jo prenesli v novo epruveto. Vezano čisto plazmidno DNA smo izprali iz kolone v novo epruveto z 25 μ l ddH₂O in 1-minutnim centrifugiranjem pri 12.000 x g.

3.2.4.2 Izolacija plazmidne DNA iz agaroznega gela

Izolacijo in čiščenje plazmidne DNA iz agaroznega gela za izvedbo restrikcijsko-ligacijske mutageneze smo opravili s priborom MiniElute® Gel Extraction Kit (Qiagen), za katerega smo pred izvedbo izolacije pripravili pufer PE po navodilih proizvajalca.

Iz agaroznega gela smo po elektroforezni ločitvi vzorcev izrezali področje z mutirano plazmidno DNA, ki smo jo identificirali z uspešno restrikcijo z encimom BspEI. Izrezani gel smo prenesli v epruveto, dodali pufer QG v razmerju 1:3 (m/v) in ga dokončno raztopili z 10-minutno inkubacijo pri 50 °C. Raztopini smo dodali izopropanol v volumnu, enakem izrezanemu gelu, nakar smo raztopino premešali z obračanjem. Vzorec smo prenesli v pripravljeno kolono MinElute in ga 1 min centrifugirali pri 10.000 x g. Po odlitju proste raztopine smo koloni dodali 500 μ l pufra QG in jo ponovno centrifugirali pri istih pogojih. Po odlitju prostega pufra smo na kolono vezano DNA očistili z dodatkom pufra PE in 1-minutnim centrifugiranjem pri 10.000 x g. Kolono smo prenesli v novo epruveto in vanjo dodali 10 μ l pufra EB ter jo po 1-minutni inkubaciji centrifugirali pri 10.000 x g, da smo iz nje eluirali plazmidno DNA.

3.2.4.3 Izolacija plazmidne DNA za celične kulture

Za potrebe uspešne transfekcije plazmidov ter testa aktivacije kompleksa TLR4/MD-2/LPS na endotoksin-občutljivih celičnih linijah potrebujemo čisto plazmidno DNA brez prisotnosti endotoksina. Izolacijo in čiščenje plazmidne DNA za delo s celičnimi kulturami smo opravili s priborom UltraMobius™ 200 Plasmid Kit (Novagen).

Želene kolonije smo po transformaciji prenesli v 10 ml medija LBA in stresali čez noč pri 37 °C. Suspenzijo bakterijskih celic smo centrifugirali 10 min pri 5.000 x g. Po odsesavanju supernatanta smo usedlino raztopili v 2,1 ml resuspenzijskega pufra, dodali 2,1 ml liznega pufra in zmes po rahlem mešanju inkubirali 5 min. Po dodatku 2,1 ml

ohlajene nevtralizacijske raztopine smo rahlo premešano suspenzijo 5 min inkubirali na ledu ter nato 2 min centrifugirali pri 10.000 x g. Supernatant smo prenesli v filtersko enoto, vanj dodali 1 ml detoksikacijskega reagenta, ter po 15 minutni inkubaciji na ledu 10 min centrifugirali pri 10.000 x g. Filtriran lizat smo prenesli ter zgolj s pomočjo gravitacije spustili čez pripravljeno kolono mobius, čez katero smo nato na enak način spustili 5 ml čistilnega pufra. Kolono smo vstavili v novo epruveto, dodali 2 ml elucijskega pufra in tako eluirano DNA precipitirali z dodatkom 1,4 ml izopropanola in 20-minutnim centrifugiranjem pri 15.000 x g. Po dekantiranju supernatanta smo precipitatu dodali 2 ml 70 % etanola ter 10 min centrifugirali pri 15.000 x g. Plazmidno DNA smo posušili na zraku in jo nato raztopili v 200 μ l ddH₂O.

3.2.5 Merjenje koncentracije DNA

Koncentracijo plazmidne DNA, uporabljene pri laboratorijskem delu, smo določili spektrofotometrično. Ustrezno redčenim vzorcem raztopljenе DNA smo izmerili absorbanco ter izračunali koncentracijo pri 260 nm valovne dolžine, kjer je pri ekstinkcijskem koeficientu $E=0,020 (\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ za dvojno vijačno DNA ena enota absorbance enaka koncentraciji 50 $\mu\text{g/ml}$.

3.2.6 Priprava mutantov

Serijo dvanajstih mutantov hTLR4 smo pripravili z metodo mestno specifične insercije v dveh korakih. Najprej smo na štiri mesta plazmida pFLAG-CMV-1hTLR4 vstavili edinstveno restrikcijsko mesto za encim BspEI z uporabo metode PCR, pri čemer smo pridobili prve štiri mutante (TM-2-TIR, CRD-2-TM, CRD-2 in LRR-2). Uspešna insercija nam je omogočila tudi identifikacijo mutantov in izolacijo čiste DNA prek restrikcije in gelske elektroforeze plazmida (poglavje 3.2.4.2). V drugem koraku smo v ta mesta vstavili različno dolgi oligonukleotidni zaporedji (5oligo, 10oligo) z uporabo restrikcijsko-ligacijske reakcije. Obe zaporedji sta vsebovali zaporedje novega unikatnega restrikcijskega mesta za encim KasI. Uspešnost končne insercije smo kontrolirali z izgubo

restriksijskega mesta za BspEI in uspešno restrikcijo s KasI ter s sekveniranjem čistih plazmidov pri MWG (Nemčija).

3.2.6.1 Insercija edinstvenega restriksijskega mesta

Mestno specifično insercijo smo izvedli z metodo PCR, za katero smo dizajnirali ustrezne oligonukleotidne začetnike - primerje, s katerimi smo v gen *hTLR4* vnesli zelene mutacije. Za vsako insercijo sta potrebna dva, nasprotnim verigam plazmidne DNA delno komplementarna začetnika, na sredini katerih se nahaja zaporedje restriksijskega mesta za BspEI. Za insercijo restriksijskega mesta smo uporabili pribor QuikChange® XL Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) z dodano DNA polimerazo PfuUltra. Reakcijska mešanica za izvedbo verižne reakcije in njen potek sta prikazani v preglednicah 9 in 10.

Preglednica 9: Reakcijska mešanica za izvedbo metode QuikChange

Plazmid/raztopina	Količina
plazmidna DNA	10 ng
oligonukleotidni začetnik #1	62,5 ng
oligonukleotidni začetnik #2	62,5 ng
reakcijski pufer 10 x	2,5 µl
raztopina dNTP	2,5 µl (250 µM)
raztopina QuikSolution	1,5 µl
polimeraza PfuUltra® DNA	0,5 µl (1,25 U)
ddH ₂ O	do končnega volumna 25 µl

Preglednica 10: Potek ciklične reakcije za insercijo restriksijskega mesta

Št. ciklov	Temperatura	Čas
1	95 °C	1 min
18	95 °C	50 sec
	60 °C	50 sec
	68 °C	1min/kb plazmida
1	68 °C	7 min

Po končani reakciji PCR je zmes vsebovala kopije nemetiliranih plazmidov z želeno insercijo ter metilirano izvirno plazmidno DNA. To smo razgradili z dodatkom 10 U endonukleaze DpnI ter štiriurno inkubacijo pri 37 °C, nerazgrajeno mutirano DNA pa smo transformirali v *E. coli* DH5 α , kolonije katere smo selekcionirali iz trdnih in gojili v tekočih gojiščih LBA. Plazmidno DNA z želeno mutacijo smo iz tekočega gojišča očistili po metodi opisani v poglavju 3.2.4.1 in jo preverili s sekveniranjem pri MWG (Nemčija).

3.2.6.2 Insercija nukleotidnih zaporedij

V drugem koraku mutageneze smo v vsako restrikcijsko mesto vstavili želeni insert, sestavljen iz mešanice konstruiranih nukleotidnih zaporedij 5oligo S in 5oligo A ter 10oligo S in 10oligo A (podani v poglavju 3.1.6, preglednici 7). Reakcija je potekala preko noči pri 25 °C ob hkratni restrikciji mesta z BspEI ter ligaciji plazmida in insertov z ligazo T4 DNA (preglednica 11).

Preglednica 11: Restrikcijsko-ligacijska mešanica za insercijske reakcije

Plazmid/raztopina	Količina
plazmidna DNA	1 μ l (200 ng)
oligonukleotidni insert	1 μ l (100 ng)
BspEI	0,25 μ l (2.5U)
ligaza T4	0,5 μ l (0.5U)
ligazni puffer T4 DNA	0,5 μ l
ddH ₂ O	do končnega volumna 5 μ l

Ligaze po končani reakciji nismo toplotno inaktivirali, temveč smo v reakcijski mešanici izvedli postrestrikcijo pri 37 °C z 10 U encima BspEI v končnem volumnu 50 μ l, pri čemer smo z razredčitvijo ligacijskega pufra zadostno inhibirali ligacijsko reakcijo. Tako smo pridobili ciklično DNA z želeno mutacijo in linearno DNA brez inserta. Po reakciji smo zmes takoj zamrznili na -20 °C ter jo naslednjič uporabili pri transformaciji in namnožitvi plazmidov v sveži kulturi *E. coli* DH5 α .

3.2.7 Delo s celičnimi kulturami

3.2.7.1 Gojenje celičnih kultur

Za preučevanje biološke aktivnosti mutantov receptorja hTLR4 smo uporabili celično kulturo HEK293, ki ne izraža TLR4 in MD-2. Za preverjanje ekspresije proteinov smo uporabili celično kulturo HEK293T, ki smo jo začasno transficirali za izražanje mutiranih proteinov.

Celice smo gojili v 50-mililitrskih polikarbonatnih posodicah v inkubatorju pri temperaturi 37 °C, atmosferi s 5 % CO₂ in 95 % zračne vlažnosti, v gojišču DMEM z 10 % sterilnega fetalnega seruma FBS, ki smo ga zamenjali vsake tri dni. Ko so kulture prerastle dno posodic, smo jih tripsinizirali in sejali do končne rasti na mikrotitrnih ploščah, uporabljenih pri transfekciji. Delo s celicami je bilo opravljeno pod sterilnimi pogoji v komorah s sistemom filtriranega pretoka zraka HEPA.

Tripsinizacijo smo izvajali po dvakratnem spiranju celic s svežim gojiščem, s katerim smo odstranili staro gojišče in mrtve celice. Posodicam smo dodali tripsin-EDTA (3 ml, 0,25-%) in celice inkubirali pri sobni temperaturi, dokler niso vidno odstopile od podlage. Tripsin smo nevtralizirali z dodatkom 5 ml gojišča, celice 5 min centrifugirali pri 1.200 obr./min ter jih po odlitju supernatanta resuspendirali v 10 ml rastnega medija. Končno gojitev celic pred transfekcijo smo opravili na mikrotitrskih ploščah v 100 µl gojišča DMEM z 10-% FBS pri koncentraciji 5×10^4 cel./ml HEK293 ter 3 ml gojišča DMEM z 10-% FBS pri koncentraciji 5×10^5 cel./ml za HEK293T.

3.2.7.2 Transfekcija in stimulacija mutantov

Za ugotavljanje biološke aktivnosti mutantov hTLR4 smo uporabili celično linijo HEK293, ki ne izraža TLR4 in MD-2, ima pa prisotne ostale proteine signalizacijske kaskade kompleksa TLR4/MD-2/LPS. Pri transfekciji smo uporabili dvojno-luciferazni reporterski sistem, kjer smo z vnosom plazmidov, ki kodirajo MD-2 in želenega mutanta hTLR4, v posamezni vzorec kotransficirali tudi reporterska plazmida za luciferazi. Aktivacijo receptorskega kompleksa smo merili prek NF-κB odvisne ekspresije luciferaznega gena

kresnice *Photinus pyralis*. Rezultate aktivacij smo med seboj normalizirali z vzporednim merjenjem konstitutivne ekspresije luciferaznega gena ožigalkarja *Renilla reniformis* (renila), ki nam je podala vrednost uspešnosti transfekcije pri posameznem vzorcu. Aktivnost odvisne kresničine luciferaze in konstitutivne reniline luciferaze smo ocenili preko merjenja kemoluminiscence, opisane v poglavju 3.2.8.

Postopek transfekcije je bil opravljen v skladu s protokolom Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Transfekciji namenjene celice smo gojili v mikrotitrskih ploščah z 96 vdolbinami, v 100 µl gojišča, do 90 % prerasti. Pripravili smo serijo raztopin plazmidov, ki kodirajo hMD-2, luciferazo, renilo in zeleni hTLR4 v mediju Opti-MEM do 25 µl. Lipofektamin smo raztopili v Opti-MEM-u v končni konc. 20 mg/ml in ga 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Transfekcijske raztopine smo pripravili z dodatkom raztopine 0.5 µg lipofektamina v vsako od raztopin plazmidov (preglednica 12).

Preglednica 12: Transfekcijska mešanica za HEK293

Plazmid/raztopina	Količina
pEF-BOS-hMD-2-Flag-His	10 ng
pELAM-1	80 ng
phRL-TK	10 ng
pFLAG-CMV-1-hTLR4	1 ng
lipofektamin 2000	0.5 µg
razt. Opti-MEM	do 50 µl

Po 20-minutnem inkubiranju pri sobni temperaturi smo 50 µl tako pripravljene transfekcijske raztopine dodali celicam HEK293, ki smo jih nato 4 ure gojili v inkubatorju. Po transfekciji smo iz vdolbinic odpipetirali gojišče in ga zamenjali s 100 µl svežega gojišča z dodanim 10-% FSB. Po enodnevni rasti celic smo del mutantov in kontrolnih celic stimulirali z dodatkom 10 ng S-LPS-a ter jih 16 ur gojili v inkubatorju. Vzorcem smo po stimulaciji odpipetirali gojišče, jih lizirali s 25 µl liznega pufra in lizat takoj shranili pri temperaturi -20 °C.

3.2.8 Merjenje luminiscence luciferaz kresnice in renile

Kemoluminiscenčno aktivnost smo merili z avtomatskim luminometrom Mithras LB940, za katerega smo pred tem pripravili reagent z luciferazama kresnice in renile ter odtalili mikrotitrsko ploščo z vzorci liziranih celic. Luminometer je v vsako od vdolbin zaporedno odpipetiral 50 μ l luciferaznega reagenta ter izmerili kemoluminiscenco pri 560 nm ob pretvorbi luciferina. Ker je stopnja sinteze luciferaze kresnice odvisna od stopnje stimulacije celic z endotoksinom, vrednost luminiscence sovpada z aktivnostjo receptorskega kompleksa. V naslednjem koraku smo v vsakega od vzorcev odpipetirali 50 μ l reagenta z renilino luciferazo ter izmerili kemoluminiscenco pri 480 nm ob pretvorbi koelenterazina, kar nam je podalo vrednost uspešnosti celične transfekcije. Končni indikator stopnje aktivacije receptorskega kompleksa TLR4/MD-2/LPS predstavlja relativna luciferazna aktivnost, izračunana z razmerjem med stopnjama aktivnosti luminiscenc luciferaz (akt. luciferaze kresnice/ akt. luciferaze renile). Povprečni rezultati in standardne deviacije aktivnosti treh vzorcev istega mutanta receptorja so predstavljeni na slikah 10-13.

3.2.9 Ekspresija proteinov

3.2.9.1 Priprava vzorcev za elektroforezo

Za ugotavljanje ekspresije proteinov mutantov hTLR4 smo uporabili celično linijo HEK293T. Transfekcijsko raztopino smo pripravili z dodatkom 8 μ l transfekcijskega reagenta GeneJuice® v 100 μ l sterilnega gojišča Opti-MEM, krožnim mešanjem in 5-minutno inkubacijo. V raztopino smo dodali 2 μ g zelene plazmidne DNA ter ponovno 15 min inkubirali pri sobni temperaturi. Pripravljeno raztopino smo nato dodali celicam HEK293T, ki smo jih prejšnji dan vzgojili v mikrotitrskih ploščah s 6 vdolbinami do 80 % prerasti ter jih nato vrnili v inkubator za 48 ur. Po transfekciji smo iz vdolbin odlili gojišče in celice lizirali z dodatkom 100 μ l liznega pufra RIPA ter lizat 30 min sonicirali. S 45-minutnim centrifugiranjem pri 13.000 obr./min in 4 °C smo pridobili supernatant, usedlino pa smo resuspendirali z dodatkom 50 μ l liznega pufra RIPA ter ponovili postopek sonikacije in centrifugiranja. Pridobljen supernatant smo združili s prvim.

3.2.9.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza (NaDS-PAGE)

Za izvedbo elektroforeze NaDS-PAGE smo uporabili pribor Mini-Protean® II (BioRad). Pred izvedbo postopka smo namešali svežo raztopino 10-% (m/v) amonijevega persulfata in pripravili 4-% nanašalni in 10-% ločevalni gel po navodilih proizvajalca (preglednica 3.1.2). Med dve stekleni plošči smo vlili ločevalni gel, ga prekrili s 100 µl z vodo nasičenega izobutanola ter ga pustili polimerizirati. Po eni uri smo odstranili izobutanol in ločevalni gel prelili z nanašalnim gelom ter s kalupom oblikovali jamice za vzorce. Po eni uri polimerizacije smo v jamice pipetirali vzorce proteinov, ki so bili prej 5 min denaturirani v vzorčnem pufri za NaDS, segretem na 95 °C. Gel z vzorci smo postavili v pufersko posodo in vanjo dolili elektroforezni puffer za NaDS. Ločevanje proteinov je potekalo eno uro pri konstantni napetosti 200 V.

3.2.9.3 Prenos western in imunodetekcija

Za izvedbo prenosa western smo uporabili pribor Mini Trans-Blot® (BioRad). Po končani elektroforezni ločitvi smo poliakrilni gel odstranili iz banjice, ga sprali z ddH₂O in ga za 10 min namočili v pufri za prenos. S tem pufrom smo nasičili tudi vlakneni podlagi ter filtrirne papirje in nitrocelulozno membrano (45 µm), ki smo jih pred tem narezali na površino, enako gelski. Enoto za prenos smo sestavili v zaporedju: vlaknena podlaga, filtrski papir, gel, filtrski papir, podlaga. Enoto smo postavili v kaseto in jo skupaj s hladilno enoto vstavili v banjico, ki smo jo nato napolnili z ohlajenim prenosnim pufrom. Prenos proteinov je potekal 110 min pri električnem toku 350 mA. Uspešnost prenosa smo preverili prek obarvanja proteinov z barvilom Ponceau, nakar smo membrano razbarvali s štirikratnim 5-minutnim spiranjem v pufri TBS.

Postopek imunodetekcije smo pričeli z blokiranjem nespecifičnih vezavnih mest na nitrocelulozni membrani. Blokiranje je potekalo pri sobni temperaturi z enournim stresanjem v 5-% (m/v) posnetem mleku, raztopljenem v pufri TBS. Z membrane smo nato odstranili raztopino z dvakratnim 5-minutnim spiranjem v čistem pufri TBS. Odcejeno membrano smo prenesli v vrečko in ji dodali raztopino poliklonskih zajčjih protiteles anti-Flag, ki smo jo pripravili z mešanjem z zgoraj opisanim blokirnim pufrom v

razmerju 1:320. Po enournem stresanju pri sobni temperaturi smo nevezana protitelesa sprali z membrane s štirikratnim 5-minutnim spiranjem v pufru TBS in ponovili postopek vezave s kozjimi poliklonskimi protizajčjimi protitelesi (1:3.000), vezanimi s peroksidazo. Po zadnjem štirikratnem spiranju s pufrom TBS smo membrano 5 min inkubirali s substratom SuperSignal® West Pico (Pierce), ki vsebuje luminol. Odcejeno membrano smo predstavili v vrečko in to prenesli v kaseto s fotoobčutljivim filmom, ki se je po 3 min osvetlil z emisijo fotonov ob kemoluminiscenčni reakciji med vezano peroksidazo in luminolom. Film smo po razvijanju, fiksaciji in spiranju z vodo posušili ter fotografirali.

Določanje ekspresije proteinov je opravila Mireille Treeby pri nadaljevanju poizkusov s pridobljenimi mutanti za svojo doktorsko disertacijo (Treeby, 2009a).

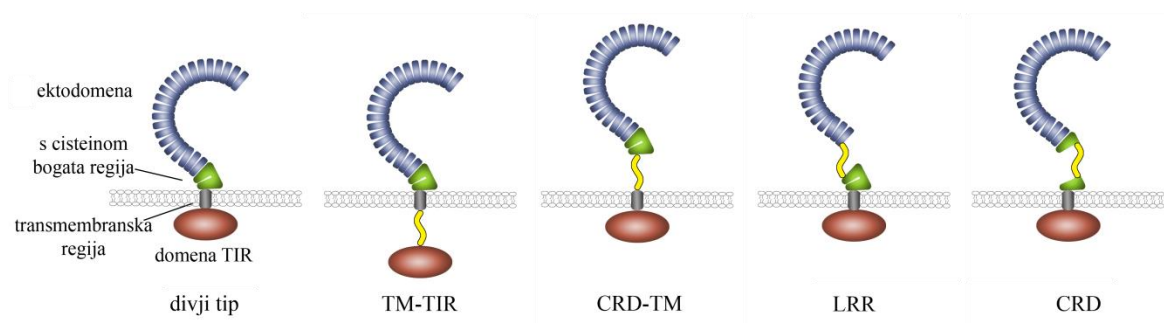
4 REZULTATI

4.1 INSERCIJSKI MUTANTI

Pri raziskavi molekularnega mehanizma delovanja receptorja hTLR4 smo se osredotočili na vlogo mejnih področij med strukturnimi domenami proteina pri njegovi aktivaciji in prenosu signala v celico. Predvidevali smo, da stimulacija receptorja TLR4 povzroči rahle strukturne spremembe njegovih kratkih meddomenskih regij, kar omogoči prenos signala z dimerizacijo aktiviranih receptorjev in njihovih citosolnih domen TIR ter iniciacijo signalnega procesa. V področja stikov med domenami smo v dveh korakih vstavili od 2 do 10 aminokislin dolge hidrofilne in rotacijsko fleksibilne povezovalce – linkerje, ki smo jih zasnovali z namenom povečanja meddomenske fleksibilnosti. S povečanjem gibljivosti teh regij bi na ta način vplivali na aktivacijo spremenjenega receptorja in njegovo signalizacijsko sposobnost, kar bi nam dalo vpogled v strukturni mehanizem njegovega delovanja.

Za tarčna mesta peptidnih insercij smo izbrali štiri področja v bližini transmembranske regije proteina: med transmembransko in citosolno domeno TIR (TM-TIR mutant), med transmembransko in ektodomeno (CRD-TM mutant), znotraj C-terminalne, s cisteinom bogate krovne domene (CRD mutant) ter med cisteinsko regijo in preostalo domeno z

levcinom bogatimi ponovitvami (LRR mutant). Shematski modeli družin mutantov z mesti peptidnih insertov so prikazani na sliki 9.



Slika 9: Shematski modeli insercijskih mutantov hTLR4. Inserti so prikazani kot rumena valovita struktura.

Natančna mesta mutacij smo izbrali v interdomenskih regijah receptorja hTLR4, določenih v bazi proteinskih sekvenc UniProtKB (Uniprot Consortium, 2005). Meje med domenami in mesta insercij so prikazani v poravnavi peptidnih sekvenc ortologov človeškega TLR4 v preglednici 13.

Preglednica 13: Poravnava peptidnih zaporedij ortologov hTLR4 (TLR4_HUMAN) s prikazanimi mejami domen, znotrajceličnim nativnim linkerjem in s cisteinom bogato krovno regijo LRR-CT

	*	580	*	600	*	620
TLR4_HUMAN	:	LQHFSSSLAFLNLTQNDFACTCEHQSFLLWIKDQKQLLVEVERMECATS		SKOGMPVLSL-NI		
TLR4_PAN	:	LQHFSSSLAFLNLTQNDFACTCEHQSFLLWIKDQKQLLVEVERMECATS		SKOGMPVLSL-NI		
TLR4_PIG	:	LQHLRSLSLFLNLTQNDFACTCEHQSFLLWIKDQKQLLVGAEQMVCTQL		MODLPVLSFRNA		
TLR4_BOVIN	:	LQHLRSLSLFLNLTQNDFACTCEHQSFLLWIKDQKQLLVGAEQMVCAEL		MEDMPVLSFRNA		
TLR4_HORSE	:	LQHFSSSLASLNLTQNDFACTCEHQSFLLWIKDQKQLLVEVERHLVCAI		LMRGMPLVCFNNA		
TLR4_FELCA	:	LRFHFSNLSLNLTQNDFACTCEHQSFLLWIKDQKQLLVEVERQMVCAK		LMQGMPLNFRNA		
TLR4_MOUSE	:	LQHFSSSLAFLNLTNNSVACICEHQKFLWVKEQKQLLVNVEQMTCATV		VMNTISLVLDENNS		
TLR4_RAT	:	LQHFSSSLAFLNLTNNSVACICEHQKFLWVKEQKQLLVNVEQMKCASTI		VMKASLVLDENNS		

< s cisteinom bogata LRR-CT regija C-terminusa ektodomena –

	*	640	*	660	*	680
TLR4_HUMAN	:	TCOMKRTIIGVSVLSVIVVSVVAVLVVYFVFHLMLLACIYSGGENTYDAFVIYSSQDDWV				
TLR4_PAN	:	TCOMKRTIIGVSVLSVIVVSVVAVLVVYFVFHLMLLACIYSGGENTYDAFVIYSSQDDWV				
TLR4_PIG	:	TCQISEAVISASVLTFLVSVVAVLVVYFVFHLMLLACIYSGGENTYDAFVIYSSQDDWV				
TLR4_BOVIN	:	TCQLSKRTIIGVSVVTVLVVSVVAVLVVYFVFHLMLLACIYSGGENTYDAFVIYSSQDDWV				
TLR4_HORSE	:	TCQISKRTIIGVSVVTVLVVSVVAVLVVYFVFHLMLLACIYSGGENTYDAFVIYSSQDDWV				
TLR4_FELCA	:	TCQVSKRTIIGVSVVTVLVVSVVAVLVVYFVFHLMLLACIYSGGENTYDAFVIYSSQDDWV				
TLR4_MOUSE	:	TCYMKRTIIGVSVVTVLVVSVVAVLVVYFVFHLMLLACIYSGGENTYDAFVIYSSQDDWV				
TLR4_RAT	:	TCYIKRTIIGVSVVTVLVVSVVAVLVVYFVFHLMLLACIYSGGENTYDAFVIYSSQDDWV				

—————> < transmembranska regija >.< znotrajcelični linker >.< domena TIR —————

Inserte med znotrajcelično domeno TIR in transmembranskim heliksom alfa smo vstavili med glicin 668 in arginin 669 nativnega povezovalca teh dveh domen. Preučevanje homolognega linkerja v TLR3 je pokazalo, da je njegovo aminokislinsko zaporedje R₇₄₀VLG₇₄₃, ki je primerljivo z L₆₆₂LAG₆₆₅ v hTRL4 (podatki primerjave niso prikazani), pomembno za celično lokalizacijo in z ligandom inducirano aktivacijo receptorja (Funami in sod., 2004). Mutacijo smo zato izvedli bliže domeni TIR, med končna glicina naravnega linkerja.

V zunajcelični del receptorja smo vstavili tri serije insertov. Fleksibilnost celotne ektodomene smo povečali v dve aminokislini dolgem področju sklopitve transmembranskega dela proteina in C-terminalne, s cisteini bogate krovne regije ektodomene (LRR-CT), med metioninom 629 in asparginom 630. V kontrastu z bolj variabilnimi N-terminalnimi krovnimi regijami TLR-jev imajo LRR-CT visoko ohranjeno sekvenco cisteinov CxC_{X(24-26)}C_{X(18-21)}C (Bell in sod., 2003). Prisotnost disulfidnih mostičkov in položaj cisteina 627 v hTLR4 tik nad transmembranskim sidrom omejujeta gibljivost te regije in s tem celotne postavitve ektodomene receptorja glede na membrano.

Za povečanje gibljivosti znotraj cisteinske regije smo naslednji seriji insertov vstavili med aminokislini glutamin 592 in triptofan 593, ki se nahajata med cisteinskima paroma, s čimer smo skušali ustvariti gibljivost znotraj toge krovne regije LRR-CT.

Serijo različno dolgih linkerjev smo vstavili tudi med fenilalanin 573 in levcin 574. S tem smo želeli povečati fleksibilnost dela ektodomene nad cisteinsko krovno strukturo ob ohranitvi tesne sklopitve krovne poddomene s transmembranskim delom.

Za vsako izbrano mesto insercije smo konstruirali po tri mutante z 2, 6 in 10 aminokislinski dolgimi povezovalci, s čimer smo v skladu z dolžinami povezav mejnih področij ob membrani stopnjevali fleksibilnost med strukturnimi domenami proteina. Pridobljeni mutanti ter mesta in aminokislinska zaporedja vstavljenih peptidov so prikazani v preglednici 14.

Preglednica 14: Seznam pridobljenih mutantov hTLR4 z aminokislinskim zaporedjem inserta

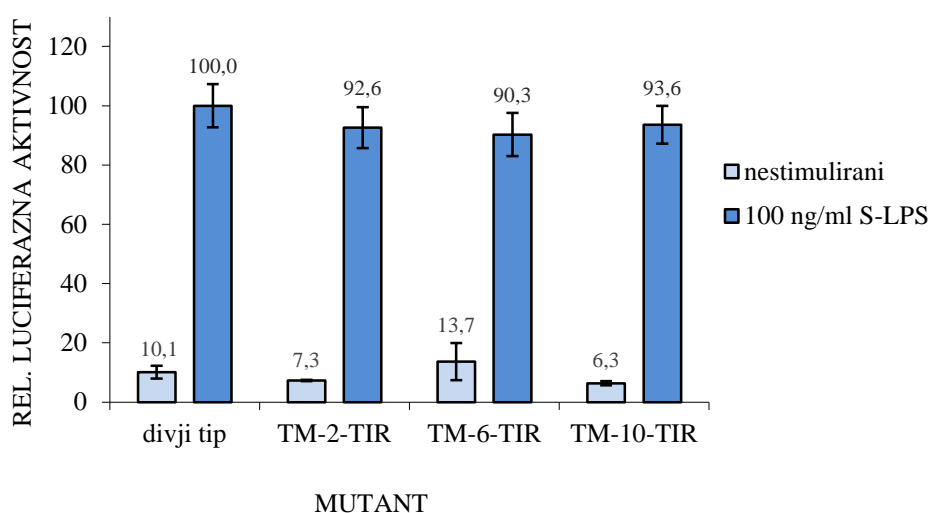
Ime mutant	Mesto insercije	Zaporedje inserta
TM-2-TIR	med glicinom 668 in argininom 669	G-SG-R
TM-6-TIR		G-SGASAG-R
TM-10-TIR		G-SGAGASASAG-R
CRD-2-TM	med metioninom 629 in asparginom 630	M-SG-N
CRD-6-TM		M-SGASAG-N
CRD-10-TM		M-SGAGASASAG-N
CRD-2	med glutaminom 592 in triptofanom 593	Q-SG-W
CRD-6		Q-SGASAG-W
CRD-10		Q-SGASRSPGAG-W
LRR-2	med fenilalaninom 573 in levcinom 574	F-SG-L
LRR-6		F-SGAGAG-L
LRR-10		F-SGASRSPGAG-L

4.2 AKTIVACIJA MUTANTOV hTLR4

Za ugotavljanje biološke aktivnosti fleksibilnih mutantov hTLR4 smo uporabili celično linijo HEK293, ki ne izraža proteinov TLR4 in MD-2, ima pa prisotne ostale proteine signalizacijske kaskade, potrebne za prenos signala v jedro celice. Po transfekciji in stimulaciji celic smo uporabili dvojno luciferazni reporterski sistem, s katerim smo merili aktivacijo receptorjev prek jedrne internalizacije faktorja NF- κ B in od njega odvisne ekspresije luciferaznega gena na poročevalskem plazmidu. Celice smo kotransficirali s plazmidi, ki kodirajo divji tip in mutante hTLR4, koreceptor hMD-2 in poročevalski luciferazi kresnice in *Renille*. Izražene receptorje smo naslednji dan aktivirali s 100 ng/ml S-LPS-a in jih po 16 urah lizirali. Končni rezultat stopnje aktivacije receptorskega kompleksa hTLR4/MD-2/S-LPS predstavlja relativna luciferazna aktivnost, izračunana z razmerjem med stopnjama luminiscence luciferaze kresnice in renile. Povprečni rezultati in standardne deviacije aktivnosti treh vzorcev posameznega mutantna receptorja hTLR4 so predstavljeni na slikah 10-13.

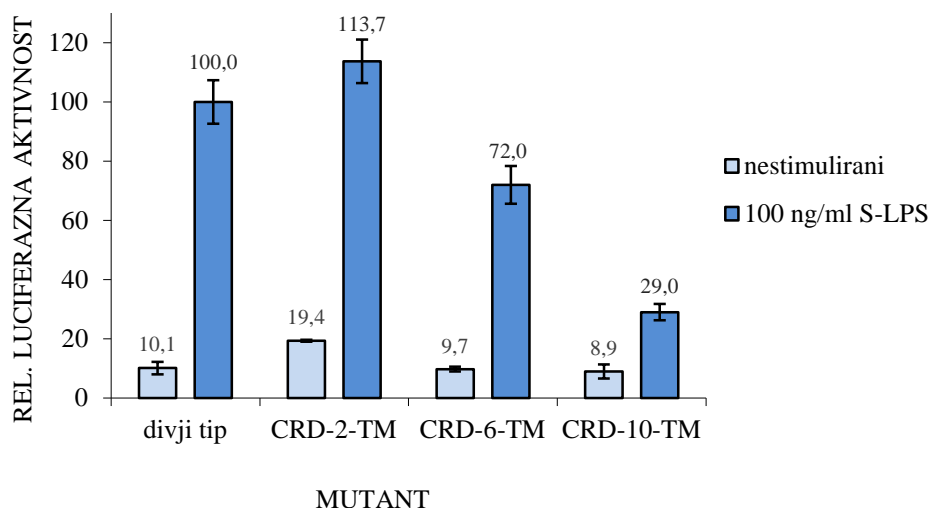
Iz primerjave rezultatov je razvidna različna narava meddomenskih področij mutantov glede njihove fleksibilnosti.

Receptorji z insercijami med transmembranskim segmentom in citosolno domeno (TM-TIR) v primerjavi z divjim tipom hTLR4 niso izkazali spremenjenega odziva na stimulacijo z endotoksinom, ne glede na dolžino peptidnega linkerja. To kaže na sposobnost dimerizacije domen TIR brez potrebne toge znotrajcelične orientacije. Rezultati aktivacije z endotoksinom so prikazani na sliki 10.



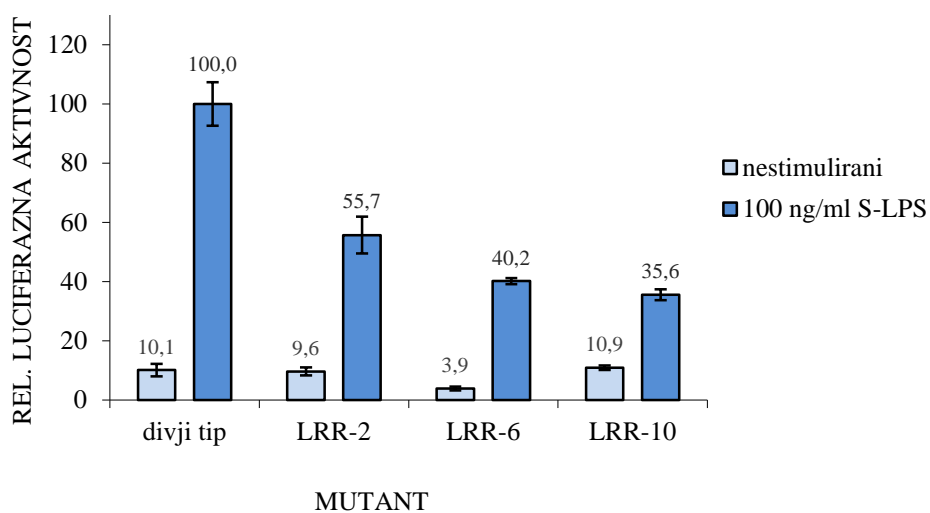
Slika 10: Stopnja aktivacije nestimuliranih in z 100 ng/ml S-LPS-a stimuliranih mutantov TM-TIR v primerjavi z divjim tipom hTLR4. Prikazani so povprečni rezultati (stolpci) in standardne deviacije rezultatov (črte) aktivnosti treh vzorcev istega mutantnega receptorja.

Drugačna je vloga meje pri mutantih CRD-TM z insercijami med transmembransko in zunajcelično domeno, kjer je opazna visoka stopnja korelacije med dolžino inserta in sposobnostjo aktivacije receptorja. Najkrajši insert nanjo nima kvarnega vpliva, z daljšanjem vstavljenega linkerja pa možnost aktivacije mutantov z endotoksinom v primerjavi z divjim tipom močno pada, kar kaže na nujnost pravilne postavitve ektodomene glede na membrano pri dimerizaciji in prenosu signala v celico. Rezultati aktivacije so prikazani na sliki 11.



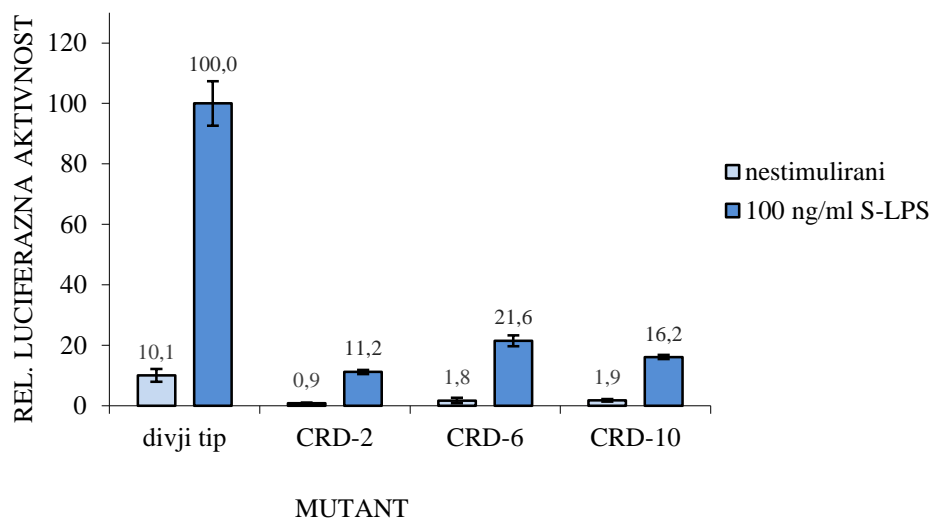
Slika 11: Stopnja aktivacije mutantov CRD-TM v primerjavi z divjim tipom hTLR4. Prikazani so povprečni rezultati (stolpci) in standardne deviacije rezultatov (črte) aktivnosti treh vzorcev istega mutantnega receptorja.

Podobno odvisnost med sposobnostjo aktivacije TLR4 in dolžino linkerja smo opazili tudi pri mutantih LRR z insercijo med C-terminalno cisteinsko bogato krovno regijo LRR-CT in preostalimi levcinskimi ponovitvami ektodomene. Tu se sposobnost aktivacije receptorja močno zmanjša že z dve aminokislini dolgim insertom, večanje fleksibilnost linkerja pa proporcionalno zmanjšuje aktivacijske zmožnosti, a z manjšo odvisnostjo kot pri mutacijah bliže celični membrani. Rezultati aktivacije so prikazani na sliki 12.



Slika 12: Stopnja aktivacije mutantov LRR v primerjavi z divjim tipom hTLR4. Prikazani so povprečni rezultati (stolpci) in standardne deviacije rezultatov (črte) aktivnosti treh vzorcev istega mutantnega receptorja.

Insercijo peptidov smo izvedli tudi znotraj C-terminalne domene bogate s cisteini (CRD), med obema cisteinskima paroma. Mutacija je verjetno spremenila terciarno strukturo proteina na mestu, ki je ključno za aktivacijo receptorja, saj je že najkrajši insert povzročil skoraj popolno izgubo sposobnosti aktivacije. Rezultati so prikazani na sliki 13.

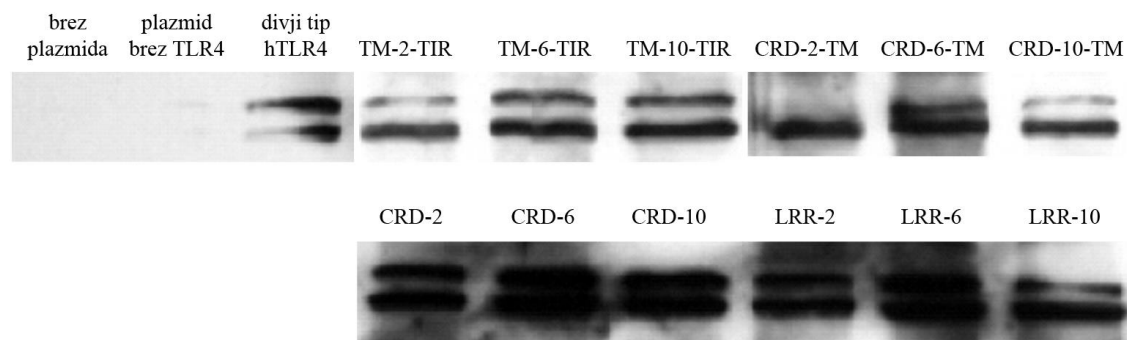


Slika 13: Stopnja aktivacije mutantov CRD v primerjavi z divjim tipom hTLR4. Prikazani so povprečni rezultati (stolpci) in standardne deviacije rezultatov (črte) aktivnosti treh vzorcev istega mutantnega receptorja.

4.3 EKSPRESIJA MUTANTOV hTLR4

Vzporedno s testom biološke aktivnosti mutantov smo preverili tudi celotno celično ekspresijo spremenjenih hTLR4, saj bi rezultati različne sposobnosti stimulacije z endotoksinom lahko bili posledica otežene ekspresije mutiranih receptorjev. Količino izraženih proteinov smo preverili s kombinacijo elektroforeze NaDS-PAGE in imunodetekcije hTLR4 po prenosu western. Rezultati so prikazani na sliki 14.

Iz rezultatov imunodetekcije smo ocenili, da sta bili stopnji ekspresije in migracije mutiranih proteinov primerljivi z divjim tipom hTLR4. Na sliki sta razvidni 110 in 130 kDa veliki obliki vsakega hTLR4, kar je posledica različne stopnje glikozilacije proteina ob njegovi izolaciji iz celične kulture (Treeby, 2009a).



Slika 14: Imunodetekcija po prenosu western. Celokupna celična ekspresija hTLR4 mutantov (Treeby, 2009b: 62)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rezultati stimulacije pripravljenih mutantov receptorja hTLR4 nam pokažejo na bistveno različno vlogo mej med njegovimi strukturnimi domenami. V divjem tipu receptorja je rigidna ektodomena prek cisteinsko bogate krovne poddomene tesno vsidrana tik ob membrano, kar omeji možne konformacijske spremembe kratke sklopitve ob vezavi ligandov in dimernega para. Znotrajcelično domeno pa veže s transmembransko regijo značilen daljši peptidni linker, ki pri družini TLR-jev šteje več kot 20 aminokislin. Ker natančen mehanizem aktivacije receptorjev TLR ni dobro poznan, smo se namenili raziskati vlogo strukturnih adaptacij sklopitvenih področij hTLR4 med njegovimi strukturnimi domenami ob vezavi endotoksina. Predvidevali smo, da bi z vstavitvijo fleksibilnih linkerjev v mejna področja povečali gibljivost domen in tako prek spremenjene zmožnosti aktivacije receptorja spoznali njihovo vlogo pri aktivaciji in znotrajcelični signalizaciji.

5.1.1 Povečanje gibljivosti znotrajcelične domene

Za celično aktivacijo s TLR-ji je potrebna dimerizacija njihovih znotrajceličnih domen TIR, ki so v membrano vsidrane z relativno dolgimi aminokislinskimi linkerji. S

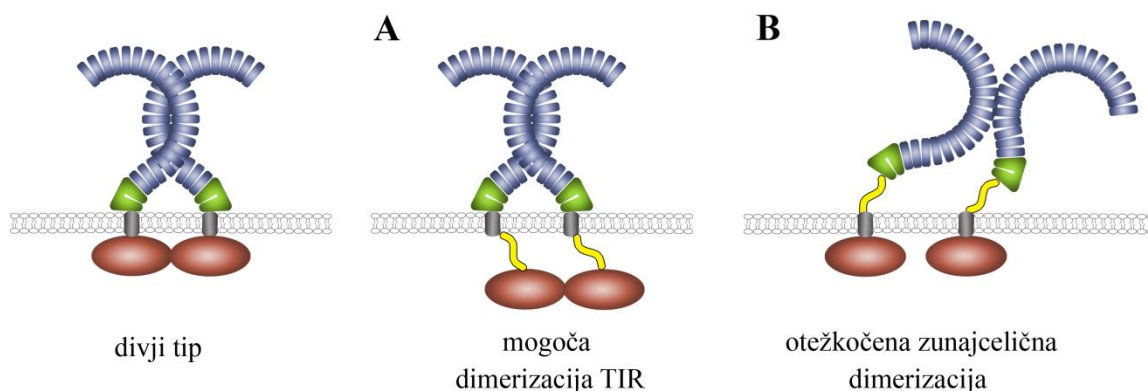
podaljšanjem linkerja s pomočjo insercij smo želeli razkriti njegovo vlogo pri sprožitvi znotrajceličnega signala. Raziskali smo predlagani model dimerizacije domene TIR, po katerem naj bi aktivacija drozofilnega Toll-a sprožila konformacijske spremembe zunajceličnega dela, kar bi prestavilo njegov citosolni del v aktivno postavitev za dimerizacijo (Weber in sod. 2005). V tem primeru bi povečanje fleksibilnosti in rotacije domene TIR zmanjšalo sposobnost njegove dimerizacije in tvorbe signalnega kompleksa z adaptorskimi proteini. V kolikor pa za prenos signala niso potrebne strogo usmerjene konformacijske spremembe v nativnem povezovalcu, bi z njegovim podaljšanjem lahko opazili povečano konstitutivno asociacijo domen TIR in povišano aktivacijo NF- κ B tudi brez stimulacije receptorja.

Fleksibilne insercije med transmembranskim segmentom in citosolno domeno hTLR4 niso imele vpliva na stimulacijo mutantov z endotoksinom, kar kaže na sposobnost dimerizacije domen TIR brez potrebne stroge znotrajcelične orientacije (slika 15 A). Sklepamo lahko, da so znotrajcelične domene vsidrane v membrano prek gibljivega naravnega linkerja, ki omogoči dimerizacijo domen z njihovim približevanjem. To potrjuje rezultate predhodne raziskave s fuzijskimi proteini, kjer so ektodomeno TLR4 zamenjali z mišjim CD4 (Medzhitov in sod., 1997). Zamenjava je olajšala povečanje lokalne koncentracije domen TIR in sprožitev njihove konstitutivne aktivnosti, česar v našem poizkusu nismo opazili. Vloga natančne dolžine nativnega linkerja nam je ostala neznana. V nadaljevanju tega dela eksperimenta bi lahko s krajšanjem povezovalca in manjšanjem obsega gibljivosti domene TIR raziskali, ali njegova dolžina vpliva na občutljivost in jakost signalizacije receptorja.

5.1.2 Povečanje gibljivosti ektodomene

Fleksibilnost celotne ektodomene hTLR4 smo povečali v tesnem področju sklopitve ektodomene s transmembranskim delom proteina. Tu se kaže drugačna vloga meddomenske povezave, kjer smo opazili visoko stopnjo korelacije med dolžino inserta in sposobnostjo aktivacije receptorja. Če predpostavimo, da je najkrajši insert povečal rotacijsko gibljivost med ektodomeno in transmembranskim delom ter ob tem ni zmanjšal signalizacijske moči receptorja, bi lahko rezultat te vstavitve pritrdil prejšnji ugotovitvi o nerigidni povezavi med citoplazemskim in zunajceličnim delom proteina.

Podaljšanje linkerja pa na tem mestu deluje kvarno, saj s postopnim daljšanjem vstavljenega povezovalca sposobnost aktivacije mutantov močno pada. Lahko bi sklepali, da se dimerizacija ektodomen mutantov hTLR4 s povečano dolžino povezovalca ne zrcali v dimerizaciji znotrajcelične domene zaradi povečanega obsega njene gibljivosti, a to bi predpostavljalo odsotnost medsebojne afinitete med domenami TIR. Zelo močen vpliv daljših linkerjev verjetno kaže na izgubo sposobnosti dimerizacije ektodomen zaradi približanja njihovega N-terminalnega dela k membrani, kljub predhodni vezavi agonista. Receptor izgubi pokončno postavitvev ektodome glade na membrano, predurejeno za pravilno približanje in vezavo dimerne para (slika 15 B).



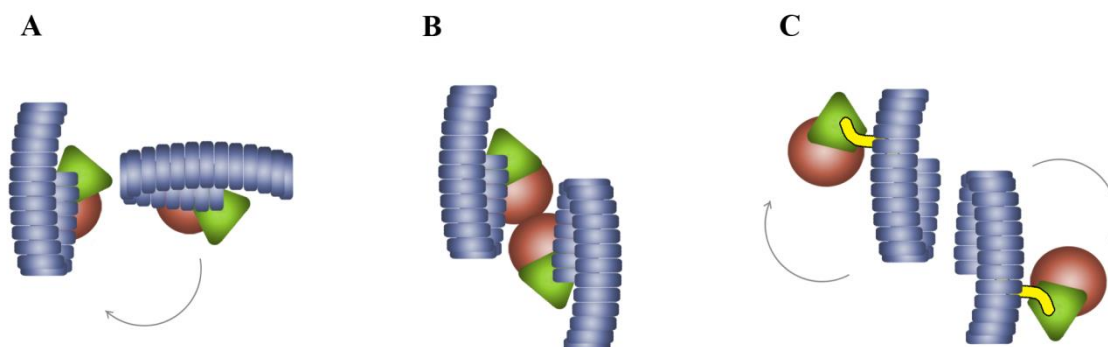
Slika 15: Predlagani model učinka fleksibilnih povezovalcev na različnih straneh transmembranskega segmenta. A: Znotrajcelični inserti oponašajo delovanje fleksibilnosti naravnih linkerjev, ki omogočajo domenam TIR približanje in dimerizacijo. B: Insert v kratki sklopitvi zunajcelične domene podre njeno pokončno postavitvev in onemogoči vezavo dimerne para.

5.1.3 Povečanje fleksibilnosti znotraj ektodome

Medtem ko s cisteini bogata C-terminalna regija ektodome stabilizira hidrofobno jedro skrajne levcinske ponovitve in s tesno sklopitvijo s transmembranskim delom omogoča pravilno postavitvev ektodome receptorjev TLR glede na membrano, kaže tudi na regulatorno funkcijo tega dela prek inhibicije spontane dimerizacije nestimuliranih receptorjev. Na to vlogo so pokazali poizkusi prekinitve disulfidnih vezi regije, s čimer so z mutacijami v tej poddomeni pridobili konstitutivno aktivne mutante receptorja Toll, sposobne proženja naslednjih stopenj kaskade brez vezave dimerizirajočih agonistov. To

kaže na pomembnost cisteinsko bogate regije pri modulaciji dimerizacije receptorja (Schneider in sod., 1991; Hu in sod., 2004).

Povečanje fleksibilnosti dela ektodomene nad cisteinsko inhibitorno strukturo nam že s kratkim insertom pokaže skoraj polovično zmanjšanje aktivacije mutanta. Če je insert omogočil rotacijsko gibljivost in povzročil izgubo rigidnosti povezave, bi lahko cisteinski poddomeni povrnil velik del inhibitorne funkcije prek možne rotacije. Zaradi odsotnosti rigidne povezave s preostankom ektodomene je cisteinska poddomena sposobna delovati podobno kot v primeru neaktiviranega receptorja divjega tipa in pri že dimeriziranih mutantih prek sidra oddaljiti signalizacijski domeni TIR (slika 16). Ta ugotovitev bi bila v skladu z novejšimi raziskavami hTLR4, kjer je dokazana modulacijska vloga cisteinske regije v tesni povezavi z velikostjo in predvsem obliko ektodomene nad njo (Panter in Jerala, 2011). Pri povečevanju fleksije z daljšimi peptidi funkcija mutiranega receptorja ne pada s tolikšno odvisnostjo kot pri insercijah tik nad membrano, iz česar bi lahko sklepali, da njegova ektodomena ohranja sposobnost dimerizacije, aktivnost dimera pa se počasi manjša s postopnim oddaljevanjem rotiranega inhibitornega dela in v povezavi z njim z oddaljevanjem signalizacijskih domen TIR.



Slika 16: Model dimerizacije receptorjev TLR4 in mehanizem delovanja inhibicije pri insertu nad inhibitorno regijo. Pogled na receptor TLR4 od N- proti C-terminalnemu delu. A: Spontano dimerizacijo preprečujeta tako oblika ektodomene, kot inhibicija C-terminalne cisteinske regije (označena zeleno). B: Prevlado nad strukturno oviro inhibitorne regije omogoči močna asociacija z ligandi aktiviranih dimerov ektodom. Ektodomeni približata znotrajcelični domeni TIR (označeni rdeče), kjer pride do izraza narava njegovega nativnega linkerja, ki omogoča asociacijo znotrajceličnih domen. C: S povečanjem fleksibilnosti nad cisteinsko regijo s peptidnim linkerjem (označen rumeno) omogočimo njeno prosto gibanje in povrnitev inhibicije z oddaljevanjem znotrajceličnih domen TIR kljub dimerizaciji ektodom.

5.1.4 Predlagani model dimerizacije TLR4

Na osnovi rezultatov aktivacij mutantov lahko predlagamo model dimerizacije receptorjev hTLR4. Ektodomena receptorja mora biti v pokončnem položaju glede na membrano, kar omogoča vezavo dimernega para. S svojo velikostjo, obliko in inhibitorno obmembransko regijo ektodomena onemogoča spontano tvorbo signalnih kompleksov znotrajceličnih domen TIR. Povečana afiniteta med ligandno-aktiviranimi ektodomenama prevlada nad strukturno oviro inhibitorne regije, pri čemer pride do izraza dolžina in fleksibilnost nativnega citoplazemskega povezovalca. Ta pred vzpostavitvijo orientacije dimeriziranih receptorjev drži znotrajcelične domene TIR na več kot potrebni oddaljenosti, da ne prihaja do interakcij med njimi. S takim potekom bi lahko razložili tudi rezultate poizkusov s podaljšanimi znotrajceličnimi inserti, kjer so pred dimerizacijo receptorjev domene TIR še vedno v preveliki oddaljenosti za pojav konstitutivne aktivnosti, ob dimerizaciji pa podaljševalci ne predstavljajo pridobitve pri signalizaciji, saj slednjo omogočijo že native dolžine linkerjev. V nadaljevanju eksperimenta bi lahko predpostavko preverili prek poizkusa fuzije mutiranih proteinov s kombinacijo insercije nad cisteinsko in pod transmembransko regijo, s čimer bi izgubo aktivnosti pri prvi inserciji pričakovano omilili z daljšimi znotrajceličnimi linkerji druge.

5.2 SKLEPI

Vstavljeni peptidni povezovalci so imeli drugačen vpliv na znotrajcelični strani, kot pri insercijah v zunajceličnem delu receptorja. Rezultati so pokazali, da kratka povezava med ektodomeno in transmembranskim delom služi pokončni postavitvi receptorja glede na membrano in tako predurejena omogoča tvorbo dimernega para ob vezavi receptorjevega agonista. Struktura celotne ektodome v povezavi z njeno obmembransko inhibitorno regijo ima tudi vlogo pri modulaciji dimerizacije, saj s svojo rigidnostjo ob asociaciji aktiviranih dimerov omogoči izničenje regionalnih inhibitornih vplivov cisteinske krovne strukture in približa znotrajcelični domeni v zadostno bližino, da tvorita signalizacijski kompleks. Inserti v nativnem znotrajceličnem povezovalcu niso imeli vpliva na aktivnost receptorja, kar kaže na gibljivo povezavo znotrajcelične domene, ki v nasprotju z zunajceličnim delom receptorja za dimerizacijo ne potrebuje toge strukturne orientacije, ampak le približanje potencialnega dimernega para.

6 POVZETEK

Z našo raziskavo smo želeli razkriti vloge mejnih področij med rigidnimi strukturnimi domenami človeškega receptorja hTLR4 ob njegovi aktivaciji z endotoksinom prek vstavitve fleksibilnih peptidnih linkerjev in povečanja gibljivosti njegovih meddomenskih področij. Prišli smo do vpogleda v vlogo naravnih domenskih sklopitev receptorja in njihovo pomembnost pri dimerizaciji aktiviranega hTLR4 in prenosu signala v celico ter tako do razumevanja molekularnega mehanizma delovanja celotne družine Toll-podobnih receptorjev.

Serijo dvanajstih mutantov hTLR4 smo pripravili s kombinacijo metode PCR in restrikcijsko-ligacijske reakcije, prek katere smo v natančno določena mesta receptorja vstavili različno dolga oligonukleotidna zaporedja. Za ugotavljanje biološke aktivnosti receptorjev hTLR4 smo uporabili celično linijo HEK293, ki ne izraža TLR4 in MD-2, ima pa prisotne ostale proteine signalizacijske kaskade kompleksa TLR4/MD-2/LPS. Pri transfekciji očiščenih plazmidov, ki kodirajo mutante hTLR4, smo uporabili dvojno luciferazni reporterski sistem, s katerim smo prek merjenja kemoluminiscence ocenili aktivnost receptorjev po njihovi predhodni stimulaciji z lipopolisaharidom.

Na osnovi rezultatov smo prišli do ugotovitev o naravi strukturnih povezav med mejami domen proteina TLR4 ter o mogočem modelu njegove dimerizacije. Rigidna ektodomena je glede na membrano pozicionirana pokončno, kar ji omogoča inhibicijo dimerizacije in tvorbo homodimera ob vezavi agonista. Ob tem pomakne inhibitorni regiji in preko transmembranskega sidra znotrajcelični domeni v zadostno bližino, da jima je prek gibljivih nativnih povezovalcev omogočena združitev v signalni kompleks z adapterskimi proteini. Glede na podobno strukturno zgradbo celotne družine TLR-jev smo z našo raziskavo dobili vpogled v delovanje pomembnega dela receptorjev naravne imunosti.

7 VIRI

- Akira S., Takeda K., Kaisho T. 2001. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2, 8: 675-680
- Akira, S., Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4: 499-511
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 4: 783-801
- Anderson K.V., Bokla L, Nusslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42, 3: 791-798
- Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky M.R. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, 29, 7: 1303-1310
- Angus D.C., van der Poll, T. 2013. Severe sepsis and septic shock. *New England Journal of Medicine*, 369, 9: 840-851
- Balk R. 2000. Pathogenesis and management of multiple organ dysfunction or failure in severe sepsis and septic shock. *Critical Care Clinics*, 16, 2: 337-352
- Beveridge T.J. 1999. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181, 16: 4725-4733
- Blander J.M., Medzhitov R. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*, 304: 1014-1018
- Bone R.C., Sibbald W.J., Sprung C.L. 1992. The ACCP-SCCM Consensus Conference on sepsis and organ failure. *Chest*, 101, 6:1481-1483

- Bowie A., O'Neill L.A. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*, 67, 4: 508-514
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303: 1532-1535
- Brown L., Wolf J., Prados-Rosales R., Casadevall A. 2015. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 10: 620-630
- Buchanan S.G., Gay N.J. 1996. Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. *Progress in biophysics and molecular biology*, 65: 1-44
- Choe J., Kelker M.S., Wilson I.A. 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, 309: 581-585
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420, 19: 885-891
- Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I.R. 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*, 4: 837-851
- Fitzgerald K.A., Palsson-McDermott E.M., Bowie A.G., Jefferies C.A., Mansell A.S., Brady G., Brint E., Dunne A., Gray P., Harte M.T., McMurray D., Smith D.E., Sims J.E., Bird T.A., O'Neill L.A. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 413: 78-83
- Fitzgerald K.A., Rowe D.C., Barnes B.J., Caffrey D.R., Visintin A., Latz E., Monks B., Pitha P.M., Golenbock D.T. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *Journal of Experimental Medicine*, 198, 7: 1043-1055

- Funami K., Matsumoto M., Oshiumi H., Akazawa T., Yamamoto A., Seya T., 2004. The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *International Immunology*, 16, 8: 1143-1154
- Galloway S.M., Raetz C.R. 1990. A mutant of *Escherichia coli* defective in the first step of endotoxin biosynthesis. *Journal Of Biological Chemistry*, 265, 11: 6394-6402
- Gay N., Keith F. 1991. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*, 351: 355-356
- Gay N.J., Gangloff M., Weber A.N.R. 2006. Toll-like receptors as molecular switches. *Nature reviews Immunology*, 6, 9: 693-698
- Hajjar A.M., Ernst R.K., Tsai J.H., Wilson C.B., Miller S.I. 2002. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nature Immunology*, 3: 354-359
- Hu X., Yagi Y., Tanji T., Zhou S., Ip Y.T. 2004. Multimerization and interaction of Toll and Spätzle in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 9369-9374
- Janeway C.A., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20: 197-216
- Janssens S., Beyaert R. 2003. Role of toll-like receptors in Pathogen recognition. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 4: 637-646
- Jereb M. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 15
www.mf.uni-lj.si/dokumenti/8b3e2c4e7ce4b6012d5cc6c965ade8bd.pdf (maj 2016).
- Kaplan M.J., Radic M. 2012. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *Journal of Immunology*, 189, 6: 2689-2695
- Kim H.M., Park B.S., Kim J.I., Kim S.E., Lee J., Oh S.C., Enkhbayar P., Matsushima N., Lee H., Yoo O.J., Lee J.O. 2007. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist eritoran. *Cell*, 130: 906-917

- Lagu T., Rothberg M.B., Shieh M.S., Pekow P.S., Steingrub J.S., Lindenauer P.K. 2012. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Critical Care Medicine*, 40, 3: 754-756
- Lugtenberg B., Van Alphen L. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 737: 51-115
- Magalhaes P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C., Penna T.C.V., Pessoa A.J. 2007. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: a Review *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 10, 3: 388-404
- Medzhitov R., Janeway Jr. C. 2000. Advances in immunology: Innate immunity. *New England Journal of Medicine*, 343: 338-344
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388: 394-397
- Miguel R.N., Wong J., Westoll J.F., Brooks H.J., O'Neill L.A.J., Gay N.J., Bryant C.E., Monie T.P. 2007. A Dimer of the toll-like receptor 4 Cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins, *PloS ONE*, 2, 8: e788, doi: 10.1371/journal.pone.0000788 (maj, 2016)
- Panter G., Jerala R. 2011. The Ectodomain of the Toll-like Receptor 4 Prevents Constitutive Receptor Activation. *Journal Of Biological Chemistry*, 286, 26: 23334-23344
- Park B. S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.S., Lee H., Lee J.O. 2009. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458, 7242: 1191-1195
- Park J.S., Svetkauskaite D., He Q., Kim J.Y., Strassheim D., Ishizaka A., Abraham E. 2004. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *Journal Of Biological Chemistry*, 279, 9: 7370-7377

- Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282: 2085-2088
- Raetz C.R.H. 1990. Biochemistry of endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 59: 129-170
- Rangel-Frausto M.S., Pittet D., Costigan M., Hwang T., Davis C.S., Wenzel R.P. 1995. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. *Journal of the American Medical Association*, 273: 117-123
- Rich T., Allen R., Trowsdale J. 2000. How low can Toll go? *Trends in Genetics*, 16: 292-924
- Rodrigue E. 2014. OMICS group: EBooks: Components and disorders of the neonatal acquired immune system: 3
<http://www.esciencecentral.org/ebooks/infectious-comorbidities/components-and-disorders-of-the-neonatal-acquired-immune-system.php> (maj 2016)
- Roger T., David J., Glauser M.P., Calandra T. 2001. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, 414: 920-924
- Saitoh S., Akashi S., Yamada T., Tanimura N., Kobayashi M., Konno K., Matsumoto F., Fukase K., Kusumoto S., Nagai Y., Kusumoto Y., Kosugi A., Miyake K. 2004. Lipid A antagonist, lipid IVA, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International Immunology*, 16: 961-969
- Schneider D.S., Hudson K.L., Lin T.Y., Anderson K.V. 1991. Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes and Development*, 5: 797-807

- Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*, 189: 1777-1782
- Treeby M. 2009a. Functional role of Toll-Like receptor 4 domains involved in signalling. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 62
- Treeby M., Vašl J., Ota P., Friedrich J., Jerala R. 2009b. Different functional role of domain boundaries of Toll-like receptor 4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381, 1: 65-69
- UniProt Consortium. 2005. UniProtKB - O00206 TLR4_HUMAN
<http://www.uniprot.org/uniprot/O00206> (jan 2005)
- van der Poll T., Opal S.M. 2008. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infectious Diseases*, 8, 1: 32-43
- Weaver C.T., Hatton R.D., Mangan P.R., Harrington L.E. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Review of Immunology*, 25: 821-852
- Weber A.N.R., Moncrieffe M.C., Gangloff M., Imler J.L., Gay N.J. 2005. Ligand- receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signalling in the Drosophila Toll pathway *Journal Of Biological Chemistry*, 280, 24: 22793-22799
- Wiersinga W.J., Leopold S.J., Cranendonk D.R., van der Poll T. 2014. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*, 5, 1: 36-44
- Yates R.M., Russell D.G. 2005. Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity*, 23: 409-417

ZAHVALA

Iskerno se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Romanu Jerali, za vse nasvete pri vodenju dela in za pregled diplomske naloge.

Za pomoč pri eksperimentalnem delu se zahvaljujem Mireille Treeby Perko, Ivi Hafner Bratkovič, Mateji Manček Keber, Robertu Bremšaku in še posebej Jožici Vašl.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Petru Mačku za pregled diplomskega dela.

Posebna zahvala gre celotni družini za vso podporo in vzpodbudo v času študija.

PRILOGA

Rezultati diplomskega dela so bili objavljeni v znanstvenem članku:

Treeby M., Vašl J., Ota P., Friedrich J., Jerala R. 2009. Different functional role of domain boundaries of Toll-like receptor 4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381: 65–69