

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tjaša PLAPER

**STIMULACIJA INFLAMASOMA NAIP/NLRC4 S
FLAGELINOM DIVJEGA TIPA TER
FLAGELINSKIMI MUTANTAMI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tjaša PLAPER

**STIMULACIJA INFLAMASOMA NAIP/NLRC4 S FLAGELINOM
DIVJEGA TIPO TER FLAGELINSKIMI MUTANTAMI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

**STIMULATION OF INFLAMASOMME NAIP/NLRC4 WITH WILD
TYPE FLAGELLIN AND FLAGELLIN MUTANTS**

M. SC. THESIS

Master study programmes

Ljubljana 2016

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija molekulske in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biotehnologijo in imunologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Študijska komisija študija biologije je na seji dne 11. 3. 2016 na osnovi Pravilnika o magistrskem delu za mentorja imenovala doc. dr. Mojco Benčina, in za recenzenta prof. dr. Simona Horvata.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Mojca BENČINA

Kemijski inštitut, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Simon HORVAT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Tjaša Plaper

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579(043.2)
KG	makrofagi/inflamasom/proteinska izolacija/flagelin
AV	PLAPER, Tjaša, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	BENČINA, Mojca (mentorica)/Horvat, Simon (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	STIMULACIJA INFLAMASOMA NAIP/NLRC4 S FLAGELINOM DIVJEGA TIPA TER FLAGELINSKIMI MUTANTAMI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XIII, 73, 18 pregl., 33 slik, 2 pril., 52 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Inflamasom je multiproteinski kompleks, ki ima osrednjo vlogo pri imunskega sistema. Zaznava veliko za organizem nevarnih snovi ter ob aktivaciji nadalje modulira imunski odziv. Poznamo več inflamasomov, med pomembnejše pa sodi NAIP/NLRC4, ki prepozna bakterijski protein bička, flagelin. Tekom magistrskega dela smo se zato lotili natančnejše analize aktivacije NAIP/NLRC4 s flagelini divjega tipa ter z alaninskimi mutantami flagelina. Flagelinsko mutagenezo smo naredili s pomočjo molekularne tehnike kloniranja. Z dodatkom histidinskega in streptavidinskega repka na proteine smo proteine izolirali s pomočjo afinitetne kromatografije. Njihovo čistost smo preverili s poliakrilamidno elektroforezo in nato z njimi stimulirali celično linijo makrofagov. Ob aktivaciji inflamasoma s flagelinom pride do aktivacije kaspaze-1, ki cepi pro-interlevkin-1 β v aktivno obliko, ki se izloča iz celice. S testom ELISA smo potrdili prisotnost aktivnega IL-1 β v celičnem mediju, s pomočjo prenosa po Westernu pa smo potrdili prisotnost aktivne kaspaze-1. Potrdili smo izhodne hipoteze, da je za aktivacijo inflamasoma ključna CD0 domena flagelina. Ob primerjavi flagelinov divjega tipa smo potrdili, da flagelin bakterije <i>Helicobacter pylori</i> ne inducira aktivacije inflamasoma, ugotovili pa smo tudi, da flagelin bakterije <i>Escherichia coli</i> v manjši meri vpliva na aktivacijo. Z alaninsko mutagenezo smo identificirali posamezne aminokisline, ki so ključne pri aktivaciji inflamasoma. To je aminokislina Y458 v povezovalni regiji flagelina ter aminokisline začetne CD0 regije flagelina. Pri mutantah sub_VLSLL_5A, A491S_povrnjena, je opaziti močno zmanjšanje aktivacije, kar potrjuje pomembnost levcinskih aminokislinskih ostankov v tej regiji pri aktivaciji inflamasoma. Prav tako je za aktivacijo pomemben aminokislinski ostanek R494. Raziskave bakterijskih virulentnih dejavnikov, kot je na primer flagelin, so pomembne za razumevanje bakterijske patogeneze in razvijanje morebitnih cepiv proti njim.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC DC UDC 579(043.2)
CX macrophages/inflamasomme/protein isolation/flagellin
AU PLAPER, Tjaša
AA BENČINA, Mojca (supervisor)/HORVAT, Simon (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology, Master Study Programme in Molecular and Functional Biology
PY 2016
TI STIMULATION OF INFLAMASOMME NAIP/NLRC4 WITH WILD TYPE FLAGELLIN AND FLAGELLIN MUTANTS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIII, 73p, 18 tab., 33 fig., 2 ann., 52 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Inflamasomme is a multiprotein complex with a central role in immune system. It recognizes several harmful molecules and recruits the immune response. There are several known inflammasomes and one of the most important is NAIP/NLRC4 which recognises bacterial protein flagellin. For a more detailed analysis of inflammasome activation, we stimulated macrophage cell line with wild type flagellins and alanine mutants. Mutated flagellins were prepared using molecular cloning. By addition of his- and strap- tag we were able to isolate pure proteins by affinity chromatography. After checking the purity of the proteins with polyacrylamide electrophoresis we used them for cell line stimulation. The activation of inflammasome by flagellin leads to activation of caspase-1 and interleukin-1 β (IL-1 β) processing, which is secreted from the cell. We determined the cleaved caspase-1 with western blot and the presence of IL-1 β in the cell medium with ELISA test. By comparing inflammasome activation with wild type flagellins, we determined no activation with *Helicobacter pylori* flagellin and reduced inflammasome activation upon stimulation with *Escherichia coli* flagellin in contrast with high activation upon stimulation with *Salmonella typhimurium* flagellin. Mutant Y458A in the spoke region of flagellin decreases inflammasome activation. We also confirmed our initial hypothesis of importance of CD0 region of flagellin. Mutants sub_VLSLL_5a and S491A recovered significantly reduced inflammasome activation. We also determined that mutant R494A reduces inflammasome activation. Researching bacterial virulence factors such as flagellin is important for understanding bacterial pathogenesis and its potential use in vaccine development.

KAZALO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS OF DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO PREGLEDNIC	XI
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	15
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	15
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	15
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	16
2 PREGLED OBJAV	17
2.1 IMUNSKI SISTEM	17
2.1.1 Prirojen imunski sistem	17
2.1.2 Receptorji prirojenega imunskega odziva	18
2.2 INFLAMASOM	19
2.2.1 Inflamasom NAIP/NLRC4	20
2.2.1.1 Pot aktivacije inflamasoma NAIP/NLRC4	20
2.2.1.2 Struktura inflamasoma NAIP/NLRC4	21
2.2.1.3 Molekula ASC	22
2.2.1.4 Kaspaza-1	23
2.1.4.5 Citokini	24
2.3 VIRULENTNI DEJAVNIKI IN FLAGELIN	25
2.3.1 Bakterijski biček	25
2.3.2 S flagelinom posredovana aktivacija inflamasoma NAIP/NLRC4	27
3 MATERIAL IN METODE	28
3.1 MATERIAL	28
3.1.1 Kemikalije	28
3.1.2 Raztopine, pufri in standardi	29
3.1.3 Laboratorijska oprema	31
3.1.4 Uporabljena protitelesa	32
3.1.5 Plazmidi	32
3.1.6 Organizmi	32

3.1.7 Gojišča	33
3.1.7.1 Tekoče gojišče LB	33
3.1.7.2 Gojišče za celične kulture	33
3.2 METODE	34
3.2.1 Priprava genskih konstruktorov	34
3.2.1.1 Priprava oligonukleotidnih začetnikov za združevanje PCR pomnožkov	34
3.2.1.2 Verižna reakcija s polimerazo	35
3.2.1.3 Agarozna gelska elektroforeza	36
3.2.1.4 Čiščenje fragmentov DNA iz gela	36
3.2.1.5 Lepljenje po Gibsonu	36
3.2.1.6 Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i>	37
3.2.1.7 Izolacija plazmidne DNA	37
3.2.1.8 Določanje nukleotidnega zaporedja	37
3.2.2 Izolacija proteinov	38
3.2.2.1 Transformacija plazmidov v bakterije in precepljanje v tekoče gojišče LB	38
3.2.2.2 Vzgoja bakterij za pridobivanje proteinov	39
3.2.2.3 Liza celic in soniceranje	39
3.2.2.4 Preverjanje izražanja proteina s pomočjo SDS poliakrilamidne elektroforeze	39
3.2.2.5 Izolacija proteinov z afinitetno kromatografijo	40
3.2.2.6 Čiščenje proteinov z afinitetno kromatografijo s STREP-tag	41
3.2.2.7 Dializa	41
3.2.2.8 Koncentriranje vzorcev	41
3.2.2.9 Merjenje koncentracije proteinov z metodo BCA	41
3.2.2.10 Določanje čistosti izoliranih proteinov	42
3.2.3 Delo s celično linijo	42
3.2.3.1 Postopek shranjevanja v parah tekočega dušika	42
3.2.3.2 Gojenje celične linije makrofagov divjega tipa in NLRC3 ^{-/-}	42
3.2.3.3 Določanje števila celic	43
3.2.3.4 Stimulacija celične linije makrofagov divjega tipa in NLRC3 ^{-/-}	43
3.2.3.5 Priprava vzorcev za prenos po Westernu:obarjanje proteinov z metanolom	43
3.2.3.6 Prenos po Westernu	44
3.2.3.7 Priprava vzorcev za test ELISA: določanje interlevkina-1β	44
3.2.3.8 Test ELISA za detekcijo interlevkina-1β	44
3.2.4 Konfokalna mikroskopija	45
4 REZULTATI	46
4.1 OPAZOVANJE CELIČNIH STRUKTUR IN FLAGELINA ZNOTRAJ MAKROFAGOV	46

4.2 PRIPRAVA GENSKIH KONSTRUKTOV FLAGELINSKIH MUTANT	47
4.3 PRIPRAVA FLAGELINSKIH MUTANT S STREPTOVIDINSKIM REPKOM	47
4.4 IZOLACIJA IN ČISČENJE FLAGELINOV	48
4.5 STIMULACIJA INFLAMASOMA NAIP/NLRC4	49
4.5.1 Stimulacija inflamasoma s flagelini	51
4.5.2 Stimulacija inflamasoma NAIP/NLRC4 z mutantami v povezovalni (ang »spoke«) regiji flagelina	54
4.5.3 Stimulacija inflamasoma NAIP/NLRC4 z mutantami v afla helični CD0 regiji flagelina	56
4.5.4 Cterminalni konec flagelina je ključen za aktivacijo inflamasoma	58
5 RAZPRAVA	61
6 SKLEPI	64
7 POVZETEK	65
8 VIRI	66
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1	Uporabljene kemikalije	28
Pregl. 2	Uporabljeni komercialno dostopni kiti	29
Pregl. 3	Raztopine in pufri uporabljeni za pripravo DNA konstruktov	29
Pregl. 4	Raztopine, pufri in standardi, uporabljeni pri detekciji in izolaciji proteinov	29
Pregl. 5	Uporabljena laboratorijska oprema	31
Pregl. 6	Uporabljena protitelesa	32
Pregl. 7	Uporabljeni vektorji in plazmidi	32
Pregl. 8	Bakterijski sevi, uporabljeni v magistrskem delu	32
Pregl. 9	Celične linije uporabljene v magistrskem delu	33
Pregl. 10	Tekoče gojišče LB	33
Pregl. 11	Trdno gojišče LB	33
Pregl. 12	Uporabljeni oligonukleotidni začetniki	34
Pregl. 13	Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR s polimerazo Kappa	35
Pregl. 14	Temperaturni profil reakcije PCR s polimerazo Kappa	35
Pregl. 15	Sestava reakcijske mešanice za reakcijo lepljenja po Gibsonu	37
Pregl. 16	Uporabljene flagelinske mutante	38
Pregl. 17	Sestava 10% ločevalnega SDS gela (volumen za 2 gela)	40
Pregl. 18	Sestava 4% vstopnega SDS gela (volumen 2 gela)	40

KAZALO SLIK

Sl. 1	Shematski prikaz povezave med pridobljenim in prirojenim imunskim odzivom	18
Sl. 2	Shematski prikaz strukturne enote NLRC4	21
Sl. 2	Sestavljanje inflamasoma NAIP/NLRC4	22
Sl. 4	Shematski prikaz aktivacije in delovanja inflamasoma NAIP5/NLRC4	24
Sl. 5	Sestavljanje flagelinskih podenot v funkcionalen biček	26
Sl. 6	Strukturne enote bakterijskega bička	26
Sl. 7	Shematski prikaz metode lepljenja po Gibsonu	34
Sl. 8	Delovna shema postopka izolacije proteina na koloni Ni-NTA	41
Sl. 9	Shematski prikaz testa ELISA	44
Sl. 10	Makrofagi z dodanim flagelinom in barvani s Hoechst 34580 in Alexa Fluor 647	46
Sl. 11	Shematski prikaz vnosa točkovne mutacije s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov.	47
Sl. 12	Shematski prikaz uvedbe streptovidinskega repka s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov	47
Sl. 13	Slika poliakrilamidnega gela flagelinov divjega tipa	48
Sl. 14	Slika poliakrilamidnega gela flagelinskih mutant	48
Sl. 15	Izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov NLRC3 $^{-/-}$ določeno s testom ELISA	50
Sl. 16	Izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov divjega tipa določeno s testom ELISA	50
Sl. 17	Prenos po Westernu (koncentrirano gojišče), kontrole	51
Sl. 18	Aminokislinska poravnava CD0 regije flagelinov divjega tipa	51
Sl. 19	Izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov NLRC3 $^{-/-}$ s flagelinom divjega tipa in himernim flagelinom določeno s testom ELISA	52
Sl. 20	Izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov divjega tipa s flagelinom divjega tipa in himernim flagelinom določeno s testom ELISA	53
Sl. 21	Prenos po Westernu (koncentrirano gojišče), stimulacija makrofagov s flagelinom divjega tipa	53
Sl. 22	Označene aminokisline v povezovalni regiji flagelina	54

Sl. 23	Izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov NLRC3/- s flagelinskimi mutantami v povezovalni regiji flagelina določeno s testom ELISA	55
Sl. 24	Izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov divjega tipa s flagelinskimi mutantami v povezovalni regiji flagelina določeno s testom ELISA	55
Sl. 25	Prenos po Westernu (koncentrirano gojišče), stimulacija makrofagov z mutantami flagelina v povezovalni regiji flagelina	55
Sl. 26	Označene aminokisline v alfa helični CD0 regiji flagelina	56
Sl. 27	Izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov NLRC3/- s flagelinskimi mutantami v alfa helični regiji flagelina določeno s testom ELISA	56
Sl. 28	Izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov divjega tipa s flagelinskimi mutantami v alfa helični regiji flagelina določeno s testom ELISA	57
Sl. 29	Prenos po Westernu (koncentrirano gojišče), stimulacija makrofagov z mutantami v alfa helični CD0 regiji flagelin	57
Sl. 30	Označene aminokisline v začetnem delu CD0 regije flagelina	58
Sl. 31	Izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov NLRC3/- s flagelinskimi mutantami v C terminalni regiji flagelina določeno s testom ELISA	59
Sl. 32	Izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov divjega tipa s flagelinskimi mutantami C terminalni regiji flagelina določeno s testom ELISA	59
Sl. 33	Prenos po Westernu (koncentrirano gojišče), stimulacija makrofagov s flagelinskimi mutantami v C-terminanem delu flagelina	60

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Nukleotidno zaporedje uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov

PRILOGA B: Nukleotidna sekvenca flagelina bakterije *Salmonella typhimurium* z dodanim
HIS in STREP-tag

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina, aminokislinski ostanek
Amp	ampicilin
ang.	Angleško
APC	antigen predstavljaljajoče celice
APS	amonijev persulfat
bp	bazni par
CPI	mešanica proteaznih inhibitorjev (ang. protease inhibitor cocktail)
Da / kDa	dalton, enota za molekulsko maso oz. kilo dalton
DMEM	gojišče za celične kulture (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat
ds	dvovijačen (ang. double-stranded)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
FBS	fetalni telečji serum (ang. fetal bovine serum)
FliC	flagelin bakterije <i>Salmonella typhimurium</i>
His	histidinski rep sestavljen iz 6 histidinov
IL	interlevkin
IPTG	izopropil β -D-1-thiogalaktopiranozid (ang. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)
LB	gojišče Luria-Bertani
LPS	lipopolisaharid, imenovan tudi endotoksin
LRR	z levcinom bogate ponovitve (ang. leucine-rich repeat)
PAMP	molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (ang. pathogen-associated molecular patterns)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza (ang. polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	fosfatni pufer s soljo (ang. phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PRR	receptorji, ki prepoznavajo molekulske motive (ang. pattern recognition receptors)
SDS	natrijev dodecil sulfat

TEMED	N,N,N,N -tetrametil-etilendiamin
TLR	Tollu-podoben receptor (ang. Toll-like receptor)
Tween 20	polioksietilensorbitan monolavrat
obr./min	obrti na minuto
% (m/v)	Odstotni delež mase snovi v volumnu (1% pomeni 1g v 100 ml)
NLR	Nodu podoben receptor

1 UVOD

1.1. OPREDELITEV PROBLEMA

Prirojen imunski sistem je osnovni obrambni sistem proti patogenim organizmom. Molekulske vzorce patogenov prepoznavajo membranski Toll-u podobni receptorji (TLR) in citosolni receptorji, med katerimi so tudi NOD-u podobni receptorji (NLR). V skupino receptorjev NLR sodijo tudi inflamasomi. To so citosolni multiproteinski kompleksi, ki zaznavajo mikrobne okužbe in sprožijo produkциjo citokinov in celično smrt.

Inflamasom NAIP/NLRC4 najdemo v celicah primarnega imunskega sistema- makrofagih. Zaznava bakterijski sekrecijski sistem tipa III in flagelin, glavno komponento bakterijskega bička. Stimulacija NAIP/NLRC4 s flagelinom vodi do cepitve pro-kaspaze-1 v aktivno obliko encima, ki cepi pro-interlevkin-1-beta (pro-IL-1 β) v aktivno obliko. Interlevkin-1-beta je signalna molekula, ki se izloča iz celice in je pomembna za aktivacijo pridobljenega imunskega sistema.

Za stimulacijo NAIP/NLRC4 je ključna ohranjena domena C-terminalnega konca flagelina (CD0) (Matusiak in sod., 2015). Pokazali so, da je CD0 domena flagelina bakterije *Salmonella typhimurium*, iz razreda proteobakterij, pomembna za aktivacijo inflamasoma, flagelin *Helicobacter pylori* ne aktivira receptorja TLR5 (Gewirtz in sod., 2003) in bakterija *Campylobacter jejuni* ne aktivira inflamasoma (Bouwman in sod., 2014), kljub temu, da obe uvrščamo med proteobakterije.

1.2. CILJI RAZISKOVANJA

Tekom magistrskega dela bom pripravila različne mutante flagelina, s katerimi bomo natančneje preučili vlogo CD0 dela flagelina na aktivacijo inflamasoma. Poleg tega bomo testirali flageline divjega tipa (*Salmonelle typhimurium*, *Helicobactra pylori* in *Escherichia coli*) ter himerni protein sestavljen iz flagelina *S. typhimurium* in CD0 domeno *H. pylori*. S himernim flagelinom med *S. typhimurium* in CD0 domeno *H. pylori* bomo testirali pomen CD0 domene flagelina za aktivacijo inflamasoma. S točkovno mutagenezo bomo tarčno zamenjali posamezne aminokislinske ostanke v domeni CD0 divjega tipa flagelina *S. typhimurium* in s tem določili vlogo amino kislin domene CD0 na aktivacijo inflamasoma.

1.3. DELOVNE HIPOTEZE

- Za aktivacijo inflamasoma s flagelinom je ključna domena CD0 flagelina.
- Flagelinske mutante povzročijo slabši imunski odziv kot flagelini divjega tipa.
- Flagelin bakterije *Helicobacter pylori* ne aktivira imunskega odziva.

2 PREGLED OBJAV

2.1. IMUNSKI SISTEM

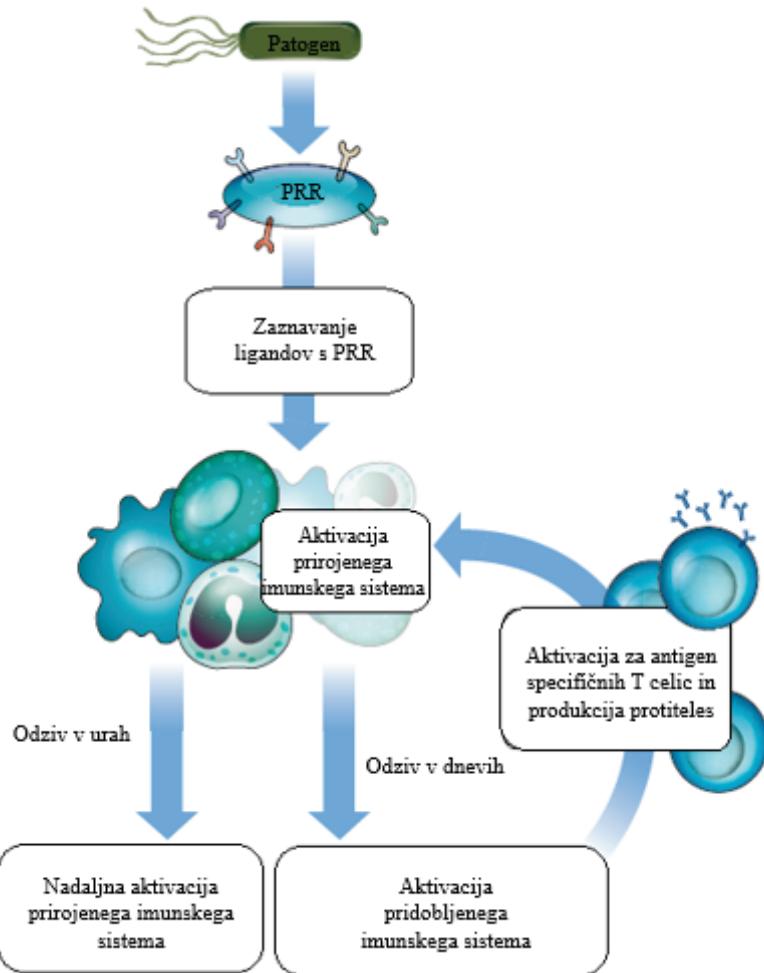
Funkcija imunskega sistema je, da zaščiti telo pred vdorom tujih patogenov kot so bakterije, glive, paraziti, virusi ter tudi pred rakavimi celicami in toksini. V osnovi naš imunski sistem delimo na prirojeni in pridobljeni. Prirojena imunost je prva linija obrambe pred patogeni, je podedovana in omogoča hiter odziv v nekaj minutah ali urah od vdora patogena. Pri pridobljeni imunost pride do tvorbe protiteles, specifičnih za telesu tuje snovi (antigene). Pridobljena imunost omogoča, da se ob ponovnem stiku s tem antigenom odzove s protitelesi specifičnimi za ta antigen. Za produkcijo protiteles je potreben čas, zato se telo odzove z zamikom. Prirojeni in pridobljeni imunski sistem sta tesno povezana in nepopolno delovanje enega ali drugega vodi v nastanek bolezni kot so: avtoimune bolezni, bolezni imunske pomanjkljivosti in alergije (Warrington in sod., 2011).

Veliko celic je vključenih v prirojen imunski odziv. Mednje sodijo fagociti (makrofagi in nevtrofilci), dendritične celice, mastociti, bazofilci, eozinofilci, naravne celice ubijalke, limfociti T. Fagociti se delijo na nevtrofilce in makrofage, skupen jim je proces fagocitoze. Poleg sposobnosti fagocitoze nevtrofilci vsebujejo tudi granule, ki ob sprostitvi svoje vsebine omogočajo uničenje patogenov. Za razliko od nevtrofilcev, ki so kratkoživi, imajo makrofagi daljšo življensko dobo in so vpleteni tudi v predstavljanje antigenov T celicam. Poimenujemo jih glede na to v katerem tkivu so rezidentni. Dendritične celice tudi fagocitirajo in imajo vlogo antigen predstavljačih celic (APC) ter so pomembne za komunikacijo med prirojenim in pridobljenim imunskevim sistemom. Glavna naloga naravnih celic ubijalk je uničenje tumorskih celic in celic okuženih z virusi.

2.1.1. Prirojen imunski sistem

Prirojen imunski sistem zaznava mikrobne infekcije, ki ob aktivaciji aktivira tudi pridobljeno imunost. Receptorji prirojene imunosti prepoznavajo ohranjene strukturne in funkcionalne motive različnih mikroorganizmov kar zagotavlja univerzalnost za prepoznavanje patogenov različnih vrst. Prepoznavanje teh motivov se preko signalnih poti prevede v različne efektorske odgovore specializiranih skupin APC. Več mehanizmov vodi v imunski odziv in vsem je skupna proizvodnja signalnih citokinov. Delovanje prirojenega imunskega sistema je odvisno od receptorjev prirojene imunosti, ki prepoznavajo molekulske motive PRR (ang. »pattern recognition receptors«) (slika 1). Receptorji prepoznavajo evolucijsko ohranjene molekulske motive patogenih mikroorganizmov PAMP (ang. »pathogen-associated

molecular patterns»), kot je bakterijska celična stena, virusna DNA in flagelin. Ti motivi so del stalnega genoma mikroorganizmov, kar pomeni, da se ne spreminjajo iz generacije v generacijo kot se t.i. hipervariabilni deli. Prepoznavanje PAMP-ov s PRR receptorji vodi v aktivacijo vnetja in prirojenega imunskega odziva. Poznamo več PRR receptorjev, ki jih glede na skupne značilnosti delimo v skupine. To so Toll-u podobni receptroji (TLR), Nod-u podobni receptorji (NLR), RIG-u podobni receptorji (RLR), C tip lektinski receptorji (CLR) in z interferonom inducibilni proteini (AIM-2) (Wu in Chen, 2014).



Slika 1: shematski prikaz povezave med pridobljenim in prirojenim imunskim odzivom (Medzhitov, 2007)

2.1.2. Receptorji prirojenega imunskega odziva

Mikrobne tarče, ki jih prepoznavajo PRR so strukturno raznoliki polisaharidi, glikolipidi, lipoproteini, nukleotidi in nukleinske kisline. Naštete zaznava več družin PRR, pri čemer so pomembne za ligande specifične vezavne domene (na primer z levcini bogata domena pri NLRC4 inflamasomu).

Toll-u podobni receptorji (TLR) so transmembranski proteini na površini celic (TLR1, TLR2, TLR5, TLR6 in 10) ali v endosomih (TLR3, TLR7, TLR8 in TLR9), ki se odzivajo na širok nabor stimulusov. TLR receptorji aktivirajo tkivne makrofage, naravne celice ubijalke in epitelijske celice, da producira pro-inflamatorne citokine, ki nadalje koordinirajo lokalne in sistemske inflamatorne odzive. V kontekstu moje magistrske naloge se mi zdi posebej zanimiv

TLR5 receptor, ki se odziva na flagelin. Stimulacija receptorja TLR5 s flagelinom aktivira od MyD88 odvisno signalno pot, kar vodi do zorenja antigen predstavljanjočih celic in izločanje kemokinov ter vnetnih citokinov (Feuillet in sod., 2006).

Poleg transmembranskih receptorjev na celični površini ter endosomalnih kompartimentih poznamo tudi znotrajcelične (citosolne) receptorje, ki prepoznavajo ohranjene motive patogenov. Za te receptorje so značilne specifične domene na podlagi katerih, jih uvrstimo v posamezne družine. Tekom magistrske naloge sem bolj natančno spoznala delovanje inflamasoma NAIP/NLRC4, ki sodi v družino NOD (Nodu podobni receptorji), zato ga bom bolj podrobno opisala v nadaljevanju.

2.2. INFLAMASOM

Inflamasomi so multiproteinske signalne platforme, ki kontrolirajo vnetni odziv in koordinirajo protimikrobnost gostiteljevo obrambo. Sestavijo se pod kontrolo receptorjev, ki prepoznavajo ohranjene antigene patogenov. Danes poznamo sedem receptorjev, ki omogočajo sestavljanje inflamasomov. Uvrščamo jih v družino receptorjev imenovano NOD-u podobni receptorji (ang. »NOD like receptors«). To so NLRP1, NLRP3, proteini, ki so odsotni v melanomu tipa 2 (AIM2 inflamasom), pirinski inflamasom, NLRC4, NLRP6 in IFI16 inflamasom (Broz in Dixit, 2016).

NLRP1 inflamasom je pomemben za odziv na vdor bakterije *Bacillus anthracis*. Aktivira se v prisotnosti smrtnega faktorja, molekule, ki jo izloča bakterija (Hellmich in sod., 2012). Ljudje imamo le en NLRP1 protein, pri glodalcih pa najdemo več paralogov (Broz in Dixit, 2016).

NLRP3 inflamasom se odziva na širok nabor s patogeni ali z nevarnostjo povezanih molekul. Mednje sodijo tudi bakterijska mRNA, bakterijski DNA-RNA hibridi, RNA/DNA virusi, praživali, glive, kristali sečne kisline ter čebelji strup, kar inducira njegovo

sestavljanje in cepitev kaspaze-1 (Man in Kanneganti, 2015). Prvi signal za aktivacijo NLRP3 inflamasoma, tako kot tudi inflamasoma NLRC4, je stimulacija z LPS, na katerega se odzivajo Toll-u podobni receptorji (TLR4), kar vodi v sintezo pro-interlevkinov (Netea in sod., 2009). Nekatere gram negativne bakterije, kot so na primer *Citrobacter rodentium*, *Escherichia coli* in *Vibrio cholerae*, aktivirajo alternativno ne-kanonično pot aktivacije NLRP3, ki privede do aktivacije kaspaze-11.

AIM2 inflamasom prepozna tako gostiteljsko, kot tudi mikrobnou DNA in ob vezavi aktivira kaspazo-1, neodvisno od NLRP3 inflamasoma, Toll-u podobnih receptorjev ali interferonskega signaliziranja (Tenthorey in sod., 2014).

Pirinski inflamasom aktivira toksin B bakterije *Clostridium difficile* in toksin C3 bakterije *Clostridium butulinum* (Hesker in sod., 2012).

Poznamo še druge inflamasomske komplekse. Najbolje karakterizirana sta NLRP6 in IFI16 inflamasom. S testiranjem mutant NLRP6^{-/-} so opazili obsežno invazivno disbiozo mikrobiote, ki je povečala možnost nastanka kemično inducirane kolitisa in s kolitisom povezane tumorigeneze (Zaki, Lamkanfi in Kanneganti, 2011). NLRP6 sodeluje tudi pri zorenju IL-18, ki inducira sintezo protimikrobnih peptidov, mnogi izmed katerih so nujni za diverziteto mikrobiote. To je dober primer pomembnosti komunikacije med mikrobioto in gostiteljskimi celicami (Anand in sod., 2012).

2.2.1. Inflamasom NAIP/NLRC4

Inflamasom NLRC4 so prvič odkrili leta 2001. Pokazali so, da aktiven NLRC4 kompleks interagira s pro-kaspazo-1 in jo cepi v aktivno obliko. Le-ta pa nato cepi pro-IL-1 β in IL-18, ki se izločata v zunajcelični matriks. Ključen za delovanje NLRC4 je senzor NAIP, ki ga uvrščamo v NLR (NOD-u podobni receptorji) družino proteinov. Mišji NAIP5 in NAIP6 prepoznavata citosolni flagelin, medtem ko NAIP1 in NAIP2 prepoznavata notranji paličasti protein sekrecijskega sistema tipa III. Za razliko od miši je v človeškem genomu prisoten le en zapis za NAIP. Zmožnost prepoznavanja flagelina in bakterijskega sekrecijskega sistema omogoča obrambo telesa pred vrsto patogenih bakterij (Pilla in sod., 2014).

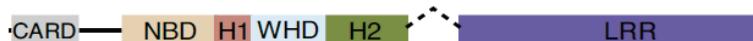
2.2.1.1 Pot aktivacije inflamasoma NAIP/NLRC4

Inhibitorni proteini apoptoze (NAIP) iz družine NLR proteinov, delujejo kot direktni receptorji za bakterijski flagelin in tip III sekrecijski sistem bakterij (Kofoed in Vance,

2011). Vezava liganda vodi v aktivacijo NAIP in oligomerizacijo NLRC4. Aktivirani receptorji spremenijo svojo konformacijo in rekrutirajo adaptorski protein ASC. To vodi v cepitev in aktivacijo kaspaze-1. Po cepitvi, kaspaza-1 procesira pro-interlevkin-1 β (pro-IL-1 β) in pro-interlevkin-18 (pro-IL-18) v aktivno obliko ter cepi gasdermin D, kar sproži obliko celične smrti imenovano piroptoza (Kayagaki in sod., 2015). Tollu podobni receptor TLR4 uravnava sintezo pro-IL-1 β , preko diferenciacijskega mieloidnega proteina (Myd88) in NF- κ B (jedrni faktor κ B). Kaspaza-1 nato cepi pro-IL-1 β v aktivno obliko (Man in Kanneganti, 2015). Biološko aktiven interlevkin se izloči iz celice. Pomembna za delovanje inflamasoma je tudi fosforilacija serinskega aminokislinskega ostanka na mestu 533 NLRC4. Po okužbi celice to vrši proteinska kinaza δ (PKC δ). Zgolj fosforilacija ni dovolj za aktivacijo inflamasoma, je pa nujna za njegovo aktivnost (Matusiak sod., 2015).

2.2.1.2 Struktura inflamasoma NAIP/NLRC

Pri nekaterih NLR so pokazali, da je LRR (levcinsko bogata regija) pomembna za vezavo substrata (Tenthorey in sod., 2014). Dobro poznani člani te skupine so t.i. apoptozni inhibitorji NAIP (ang. »apoptosis inhibitory proteins«) (Wright in sod., 2003). Delujejo kot specifični citosolni receptorji. Po zaznavi liganda, NAIP navzdol rekrutirajo adaptorski protein NLRC4, ki prav tako sodi v isto družino NLR proteinov (Mariathasan in sod., 2006). NAIP in NLRC4 imata homolognih 20 % aminokislinskih ostankov. NAIP je monomeren protein, njegovo ko-oligomerizacijo z NLRC4 inducira vezava liganda (Tenthorey in sod., 2014). NAIP in enote NLRC4 se sestavijo v multiproteinski kompleks imenovan inflamasom (von Moltke in sod., 2013). Poleg nukleotid vezavne domene NBD (ang. »Nucleotide-binding domain«) in LRR domene, vsi NLRC4 vsebujejo tri helične domene, ki so povezane z NBD: helično domeno 1 (HD1), Winged helično domeno (WHD) in helično domeno 2 (HD2) (slika 2).

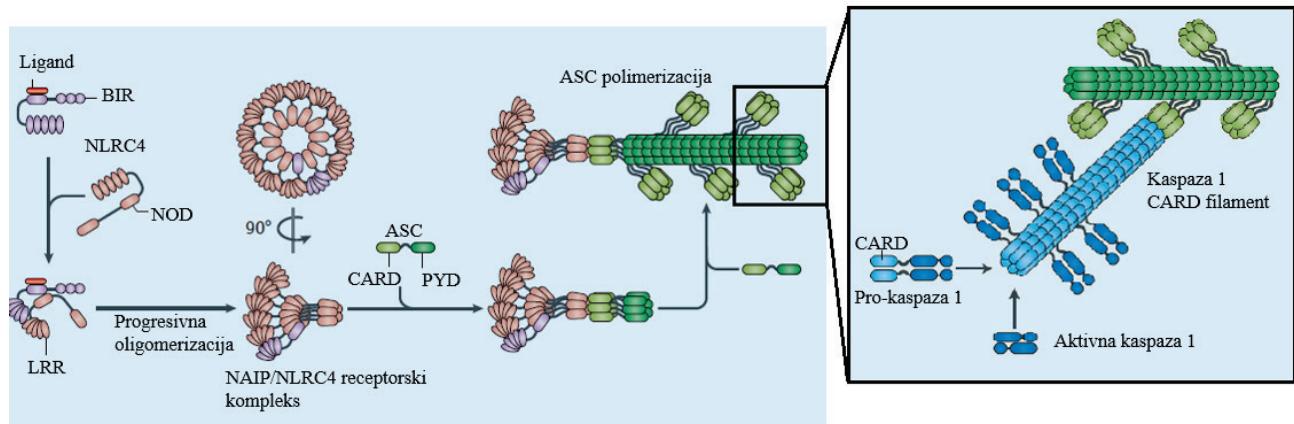


Slika 2: shematski prikaz strukturne enote NLRC4 (Vance, 2015)

Vse štiri domene skupaj poenostavljeno imenujemo tudi NACHT domena. NAIP se od ostalih predstavnikov NLR receptorjev razlikujejo po prisotnosti specifične domene, ki ima zavajajoče ime. To je Baculovirusna apoptozo-inhibitorna domena (ang. »Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeats«). Natančna funkcija te domene ni poznana (Kofoed in Vance, 2012). Na N terminalnem koncu NLRC4 je domena CARD, ki služi rekrutaciji in aktivaciji

kaspaze-1 (ang. »Activating and Recruitment Domain«). Kaspazo-1 lahko aktivira z direktno vezavo najno ali pa posredno z vezavo na adaptersko molekulo ASC (slika 2).

Poleg specifične domene BIR, ima NAIP/NLRC4 še nekaj značilnosti, ki veljajo le zanj in jih ločijo od ostalih inflamasomov. NAIP/NLRC inflamasomi so edini, ki se aktivirajo ob vezavi specifičnega liganda. Značilna je kooperativna vezava dveh NLR proteinov: NAIP, ki deluje kot senzor in NLRC4, ki deluje kot adaptor. Posebnost NAIP/NLRC4 pa je tudi, da lahko delujejo neodvisno od ASC molekule (Broz in sod., 2010). NAIP/NLRC4 inflamasom najdemo predvsem v makrofagih, vendar pa so prisotni tudi v drugih specifičnih tkivih kot so intestinalne epitelne celice, kjer pomembno vplivajo na omejevanje okužb s *Salmonello*. Končni NAIP/NLRC4 kompleks je sestavljen iz več podenot in je po obliki podoben disku. Vsebuje 9-11 molekul NLRC4 in eno podenoto NAIP (Hu in sod., 2015). Po aktivaciji receptorskega kompleksa, se slednji z domeno CARD veže na domeno CARD molekule molekul ASC, kar povzroči polimerizacijo molekul ASC (slika 3).



Slika 3: sestavljanje inflamasoma NAIP/NLRC4 (Broz in Dixit, 2016)

2.2.1.3 Molekula ASC

Kompleks NAIP/NLRC4 rekrutira adaptor ASC, ki se nadalje poveže s pro-kaspazo-1. Oligomerizirane molekule ASC so našli tudi v zunajceličnem prostoru, kjer povečajo vnetni odziv (Franklin in sod., 2014). Čeprav lahko NAIP/NLRC4 sam cepi pro-kaspazo-1 v aktivno obliko, so opazili pri mutantah brez ASC močno zmanjšano količino izločenega IL-1 β , kar kaže na to, da je ASC tesno povezan s produkcijo interlevkinov, ne vpliva pa na procesiranje gasdermina D oziroma na piroptozo. Za aktivacijo NAIP je potreben en sam ligand, ki rekrutira več molekul NLRC4 in slednji povzroči oligomerizacijo ASC molekul,

ki imajo več vezavnih mest za kaspazo-1. To vodi v močno ojačanje signala in hiter celični odziv (Franklin in sod., 2014).

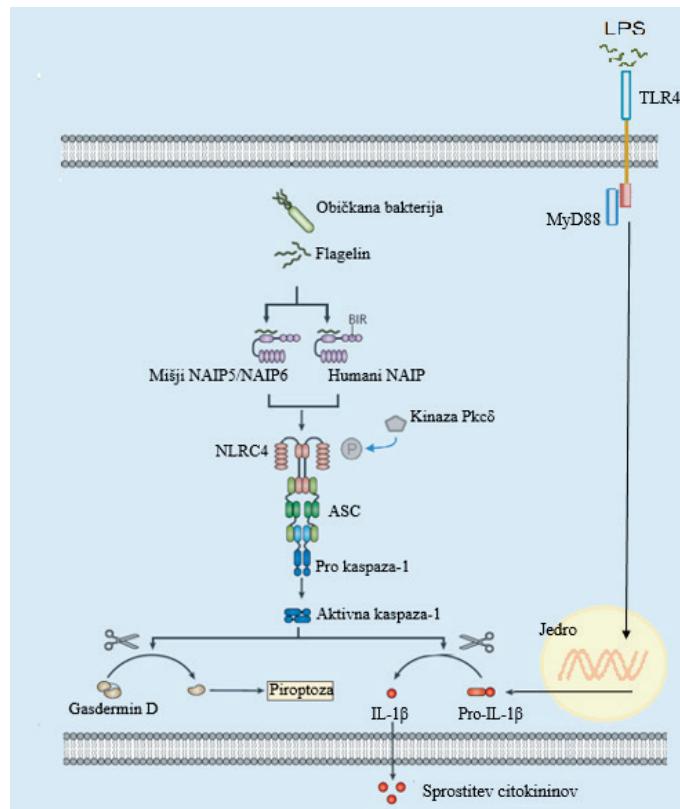
2.2.1.4 Kaspaza-1

Kaspaze so evolucijsko ohranjene cisteinske proteaze, ki cepijo svoj substrat za aspartatnimi ostanki (Lamkan in sod., 2003). Rezultat proteolize s kspazami je aktivacija ali inaktivacija signalnih kaskad, ki regulirajo celično smrt, diferenciacijo in celično proliferacijo (Lamkanfi, sod., 2006). Kaspaza-1 regulira inflamatorne in obrambne odzive gostitelja proti mikrobnim patogenom tako da procesira prekurzorje pro-inflamatorne citokine interleukin-1-beta in interleukin-18 v biološko aktivno obliko, ki je izločena iz aktiviranih makrofagov in monocitov. Ti citokini nadalje regulirajo lokalni in sistemski imunski odziv na vnetje oziroma vročino, migracijo levkocitov na mesto poškodbe in infekcije ter aktivacijo in polarizacijo T celic pomagalk (Dinarello, 2009). Citokini stimulirajo pritegnitev nevtrofilcev, ki zajamejo in ubijejo ekstracelularne bakterije. Delovanje kaspaze ima torej dve sinergistični vlogi: piroptozo in rekrutacijo nevtrofilcev, kar odstranjuje bakterije (Miao in sod., 2010). Poleg tega kaspaza-1 regulira sproščanje z nevarnostjo povezanih molekul (ang. »DAMP, Danger associated molecular pattern«) iz makrofagov okuženih s fakultativnim znotrajceličnim mikrobom *Salmonella typhimurium* (Broz, Newton, in sod., 2010). Kaspaza-1 aktivira kaspazo-7, ki aktivira encime glikolize in inducira piroptozo, ki je specifična oblika celične smrti. Piroptzo se morfološko razlikuje od apoptoze. Zanjo je značilno nabrekanje celice, liza in sproščanje celične vsebine, verjetno zaradi formacije por v membrani (Fink in Cookson, 2005). Za indukcijo piroptoze je potreben gasdermin D (Kayagaki et al., 2015). Gasdermin D je substrat inflamatornih, ne pa tudi apoptotskih kspaz. Rezultat cepitve je N-terminalni fragment, ki povzroči piroptozno celično smrt. Točen mehanizem delovanja še ni znan.

ASC je aktivator kaspaze-1 in procesiranje lahko poteče zaradi homotipične interakcije CARD domen obeh. Supramolekulsko sestavljanje ASC imenujemo tudi piroptosom. Slednji predstavlja mesto regulacije aktivnosti kaspze-1 in inflamatorne celične smrti. Aktivacija oziroma cepitev kaspaze-1 pomeni njen razpad na dve podenoti, p20 (velikosti 20 kDa) in p10 (velikosti 10 kDa), ki se tako kot citokini izločajo v zunajcelični prostor (Fernandes-Alnemri in sod., 2007).

2.1.4.5 Citokini

Citokini so majhni proteini pomembni za medcelično komunikacijo. Producija citokinov vodi v sintezo protiteles ter drugih (gliko)proteinov, ki aktivirajo komplementni sistem (Turvey in Broide, 2010). Biološko aktivna IL-1 β in IL-18, ki se sproščata ob aktivaciji inflamasoma (slika 4) sta pomembna za vnetno reakcijo in koordinacijo pridobljenega imunskega sistema. Noben izmed njiju nima signalne sekvence in se sproščata neodvisno od endoplazemskega retikuluma in Golgijskega aparata. Točen mehanizem sproščanja teh interlevkinov še vedno ni popolnoma znan (Monteleone, Stow in Schroder, 2015). Drugi člani IL-1 družine interlevkinov prav tako nimajo signalne sekvence in jih drugače poimenujemo tudi alarmini. Študije kažejo, da je glavni način sproščanja interlevkinov, vsaj pri makrofagih, liza celice. Zato sta IL-1 β in IL-18 morda unikatna alarmina, saj je potrebna njuna cepitev, da postaneta biološko aktivna. Drugi tipi celic, na primer nevtrofilci, pa imajo drugačen mehanizem sproščanja interlevkinov, saj ne gredo v piroptozo (Monteleone, Stow in Schroder, 2015).



Slika 4: shematski prikaz aktivacije in delovanja inflamasoma NAIP5/NLRC4 (Broz in Dixit, 2016)

2.3 VIRULENTNI DEJAVNIKI IN FLAGELIN

Gostitelj ima več površin, ki jih naseljujejo mikroorganizmi, kot je na primer koža, prebavilo, respiratorni trakt in urogenitalni trakt. Večino jih kolonizira endogena mikrobiota, ki ima pomembno vlogo. Z zasedanjem niše namreč preprečuje naselitev drugih, potencialno patogenih bakterij, nekateri sekundarni mikrobni metaboliti v prebavilu pa pomembno vplivajo tudi na naše zdravje (Hacker in Carniel, 2001).

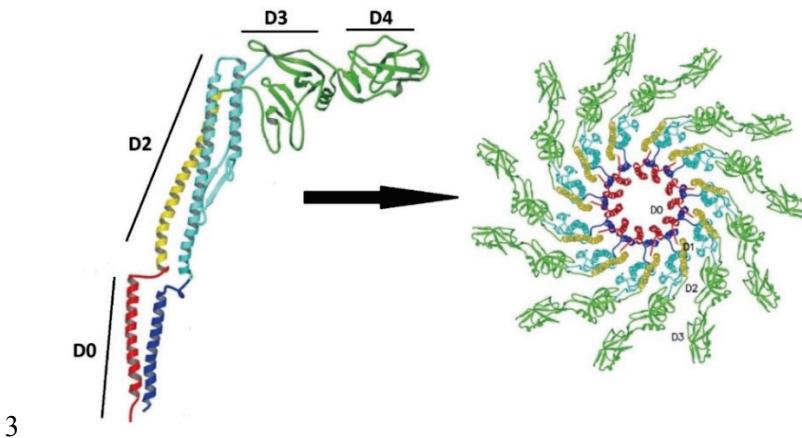
Virulentni dejavniki bakterij so pomembni za kolonizacijo specifičnih ekoloških niš (prilagajanje na specifično okolje) kot tudi invazijo in kolonizacijo gostitelja. Odvisno od niše, ki jo kolonizirajo, virulentni dejavniki omogočajo invazijo v znotrajcelične kompartmente, pritrjanje na celično površino, premikanje in premikanje iz gostitelja na gostitelja. Pogosto imajo bakterije zapis zanje na mobilnih genetskih elementih (plazmidi, genomski otoki) in se lahko prenašajo med bakterijami znotraj vrste ali celo med kompetentnimi bakterijami različnih vrst. Problem horizontalnega prenosa genov je tudi širjenje rezistenčnih genov (Gal-Mor in Finlay, 2006).

2.3.1 Bakterijski biček

Med pomembnejše virulentne dejavnike sodi protein bakterijskega bička, flagelin. Zaradi njegove pomembnosti pri invaziji gostitelja, so se oblikovali specifični receptorji, ki prepoznavajo evolucijsko ohranjene dele flagelina (Gal-Mor in Finlay, 2006).

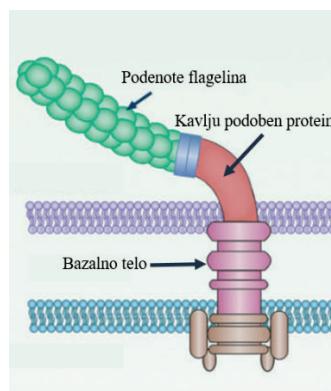
Bakterijski biček je prijet na bakterijsko površino in je ključna struktura, ki omogoča bakterijsko premikanje. Flagelinski polimer je sestavljen iz ponavljajočih se flagelinskih monomerov, ki se drug na drugega helično nalagajo. Monomerni flagelin je velik od 30 do 60 kDa, odvisno od bakterijske vrste in se izloča na površino skozi eksportni sistem. Strukturno se karboksilni C-terminalni konec upogne nazaj k amino N-terminalnemu koncu. Celotno molekulo sestavljajo štiri domene: D0, D1, D2 in D3 in tvorijo bumerangu podobno strukturo (Yonekura in sod., 2003). Približno 40 aminokislin tvori vsak terminalni del flagelinske molekule in skupaj tvorita D0 domeno. D1 domeno sestavlja 100 ostankov iz N-terminalnega konca in 50 aminokislinskih ostankov iz C-terminalnega konca. Preko intramolekularnih kontaktov med D1 in dveh sosednjih monomerov se flagelinske molekule vzdolžno nalagajo druga na drugo in tvorijo filament. 11 profilamentov tvori flagelinski filament, ki je votla cev, približno 15 µm v dolžino (Samatey in sod., 2001). D0 in bližnja D1 domena profilamenta tvorita zunanje in notranje jedro votlega filimenta. D2 in D3

domeni, ki sta v centru filimenta, pa formirata projekcije na zunanjo stran filimenta (Yonekura in sod., 2003). D0 in D1 imata α helično strukturo, medtem ko D2 in D3 gradijo β strukture. D0 in D1 domeni sta ključni za sestavljanje helične strukture, zato so močno evolucijsko ohranjene med različnimi vrstami bakterij. Drugi dve domeni pa sta hipervariabilni.



Slika 5: sestavljanje flagelinskih podenot v funkcionalen biček (Yonekura in sod., 2003)

Bakterijski biček je v bakterijsko steno vsidran preko bazalnega telesa, ki je motorni protein. Povezavo med filamentom flagelina in bazalnim telesom predstavlja fleksibilen, kavlju podoben protein (Chevance in Hughes, 2008). Filament, kavlju podoben protein in basalno telo sestavljajo napravo, ki z rotacijo filimenta omogoča premikanje oziroma plavanje bakterije. Gibanje je za bakterijo pomembno, saj omogoča iskanje nutrientov in izogibanje nevarnim substancam. Biček je pomemben tako za pritrjanje na podlago ter kot že omenjeno, za invazijo v gostitelja ter zasedanje specifične ekološke niše (Zhao & Shao, 2015).



Slika 6: strukturne enote bakterijskega bička (Zhao in Shao, 2015)

2.3.2 S flagelinom posredovana aktivacija inflamasoma NAIP/NLRC4

Campylobacter jejuni in *Helicobacter pylori* sta pomembna patogena, ki sta polarno običkana in z okvarjenimi bički ne moreta kolonizirati našega prebavnega trakta (Ottemann in Miller, 1997). Bakterijski biček je ključna tarča gostiteljevega imunskega sistema. Variacije flagelinov povzročijo nastanek protiteles, ki so specifična za različne serotipe bakterij. Flagelin se raziskuje tudi zaradi možnosti uporabe kot adjuvans pri cepivih.

Najmanjši flagelinski fragment, ki še inducira sestavljanje NLRC4 je terminalnih 35 aminokislinskih ostankov C-terminalnega konca flagelina. Od teh 35 aminokislinskih ostankov so za aktivacijo NLRC4 esencialni trije levcinski aminokislinski ostanki in interagirajo z NAIP5 receptorjem ter inducirajo piroptozo (Lightfield in sod., 2011). NLRC4 zaznava tako flagelin kot tudi proteine T3SS sekrecijskega sistema, saj zavzemata podobno konformacijo, kljub različnemu aminokislinskemu zaporedju (Nagai in sod., 2005). NAIP6 je najbolj homologen NAIP5 (približno 95% aminokislinskih ostankov je enakih) in tudi prepoznavata bakterijski

flagelin (Kofoed in Vance, 2011). Bakterijski patogeni so razvili mehanizme izogibanja z NLRC4 posredovanim imunskim odzivom. Pogosto izključijo izražanje ligandov za NAIP receptorje. Na primer *Yersinia* spp. izključi izražanje flagelina pri 37°C v gostitelju, čeprav njen flagelin aktivira NAIP/NLRC4. Podobno tudi *S. typhimurium* izklopi sintezo sekrecijskega T3SS sistema po uspešni invaziji gostitelja (Edward A Miao in sod., 2010).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 1: uporabljene kemikalije

Proizvajalec	Kemikalije
BioWhittaker	FBS (Fetal Bovine Serum)
Epicentre	T5 exonuclease
Fermentas	DNA-standardi: 1 kb DNA Ladder, Gene Ruler DNA Ladder mix, nanašalni pufer za DNA elektroforezo, PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, restrični encimi (<i>DpnI</i> , <i>HindIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i>),
Fluka	SDS, DMSO
Inalco	IPTG
Invitrogen	DMEM + GlutaMAX™-I, DNA-polimeraza AccuPrime <i>Pfx</i> , 10-kratni AccuPrime <i>Pfx</i> pomnoževalni pufer, Opti-MEM I medij brez seruma (1-kratni), coelenterazine, proteinski standard SeeBlue Plus 2 PreStained Standard, ProLong® Gold Antifade Reagent
InvivoGen	Blasticidin, rec FLA (rekombinantni flagelin bakterije <i>S.typhimurium</i>)
Merck	Lipopolisaharid bakterije <i>E. coli</i> etanol, metanol, izopropanol, NaCl, ocetna kislina, bakteriološki agar
New England Biolabs	DNA ligaza TAq, DNA polimeraza Phusion
IDT (Integrated DNA Technologies)	začetni oligonukleotidi
Polyplus-transfection	transfekcijski reagent JetPEI in JetPRIME
Promega	5-kratni lizni pufer, luciferin
Sigma (Aldrich)	akrilamid, N,N'-metilen-bis-akrilamid, agarosa, bromfenolmodro, gojišče LB po Millerju, nitrocelulozna membrana (45 µm), EDTA, ampicilin, amonijev persulfat, Tris, etidijev bromid, raztopina Tripsin EDTA (1-kratna), dNTP, Tween 20, SDS, glicerol, β-merkaptoetanol
	Nigericin
Thermo Fisher Scientific	I-BLOCK

Preglednica 2: uporabljeni komercialno dostopni kiti

Proizvajalec	Komplet
Thermo Scientific	kit za izolacijo fragmentov DNA iz agaroznega gela: GeneJet PCR purification kit Extraction
Thermo Scientific	kit za izolacijo plazmidne DNA: GeneJet Plasmid Miniprep Kit
eBioscience	kit za ELISA test

Preglednica 3: raztopine in pufri uporabljeni za pripravo DNA konstruktorov

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
50-kratni TAE pufer (za agarozno elektroforezo)	242 g Tris, 57.1 mL ledocetna kislina, 100 mL 0.5 M EDTA, destilirana voda do 1 L, pH 8.
6x nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	0.25% bromofenolmodro, 0.25% ksilencianol, 40% (w/v) glukoze v destilirani vodi
zmes dNTP	1.25 mM ATP, 1.25 mM CTP, 1.25 mM GTP, 1.25 mM TTP
5x izotermalni (ISO) reakcijski pufer za lepljenje po Gibsonu	25% PEG 8000, 8 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 1 mM vsakega dNTP in 5 mM NAD

3.1.2 Raztopine, pufri in standardi

Preglednica 4: raztopine, pufri in standardi, uporabljeni pri detekciji in izolaciji proteinov

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
Lizni pufer za proteine, označene s histidinskim repom	10 mM Tris (pH 8), 0.1% DOC (deoksiholat)
CPI-His	Mešanica proteaznih inhibitorjev za His tag proteine, brez EDTA
Pufer za spiranje 0	20 mM TRIS, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol
Pufer za spiranje 1	20 mM TRIS, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol
Pufer za spiranje 2	20 mM TRIS, 300 mM NaCl, 50 mM imidazol
Elucijski pufer	20 mM TRIS, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol
Pufer W	100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl
Pufer E	100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 2.5 mM desthiobiotin
Stop pufer za ELISA test	1M H ₃ PO ₄

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 4: raztopine, puferi in standardi, uporabljeni pri detekciji in izolaciji proteinov.

4-kratni reducirajoči vzorčni pufer z SDS	1.25 mL 0,5 M Tris/HCl (pH 6.8), 3.05 mL destilirane vode, 0.665 mL 30-odstotnega akrilamid/bisakrilamid, 50 µL 10-odstotnega SDS, 25 µL 10-odstotnega APS, 5 µL TEMED (navedeno za dva gela širine 1 mm)
10-odstotni ločitveni gel	2.5 mL 1.5 M Tris/HCl (pH 8.8), 4.1 mL destilirane vode, 3.3 mL 30-odstotnega akrilamid/bisakrilamida, 100 µL 10-odstotnega SDS, 50 µL 10-odstotnega APS, 5 µL TEMED (navedeno za 1 gel širine 1.5 mm)
15- odstotni ločitveni gel	2.6 mL 1.5 M Tris/HCl (pH 8.8), 2.2 mL destilirane vode, 5 mL 30-odstotnega akrilamid/bisakrilamida, 100 µL 10-odstotnega SDS, 100 µL 10-odstotnega APS, 10 µL TEMED (navedeno za 2 gela širine 1 mm)
4-odstotni vstopni gel	1.25 mL 0,5 M Tris/HCl (pH 6.8), 3.05 mL destilirane vode, 0,665 mL 30-odstotnega akrilamid/bisakrilamid, 50 µL 10-odstotnega SDS, 25 µL 10-odstotnega APS, 5 µL TEMED (navedeno za dva gela širine 1 mm)
10-kratni elektroforezni pufer z SDS	30 g Tris, 10 g SDS, 144 g glicina, dopolnimo do 1 L z destilirana voda; pred elektroforezo pufer 10-krat redčimo z destilirano vodo
Pufer za mokri prenos proteinov na membrano	6.057 g Tris, 28.8 g glicina, 400 mL metanola, dopolnimo z destilirano vodo do 2 L
Raztopina za spiranje	1 X PBS (0.058 M Na ₂ HPO ₄ , 0.017M NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 0.068 M NaCl), 0.01% Tween 20
Raztopina za blokiranje	0.2% I-BLOCK v raztopini za spiranje
Blue-Ranger Pre-Stained Protein Molecular Weight Marker Mix	vsebuje proteinske standarde velikosti 215 kDa, 120 kDa, 84 kDa, 60 kDa, 39,2 kDa, 28 kDa, 18,3 kDa

3.1.3 Laboratorijska oprema

Preglednica 5: uporabljena laboratorijska oprema

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Beckman	centrifuga J2-HS
BioRad	aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (Mini Protean II) in moker prenos proteinov na membrano (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell), aparatura za agarozno elektroforezo DNA, kivete Gene Pulser, elektroporator Gene Pulser Xcell™
Biometra	hibridizacijska pečica, vakuumska črpalka
BioTek Synergy Mx	čitalec mikrotiterskih plošč
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture
Canon	fotoaparat za slikanje gelov
Euromax	svetlobni mikroskop
TPP	posodice za gojenje celičnih linij, 96 well, 24 well in 6 well plošče za gojenje celičnih kultur
Ibidi	komorice za mikroskopiranje z 8 luknjicami: µSlide 8 well
Invitrogen	naprava za avtomatsko štetje celic (Cauntess™)
Tehnica Železnik	tehnicna ET-1111
Moulinex	mikrovalovna pečica SYBIO
Eppendorf	avtomatske pipete
Gilson	avtomatske pipete
Hettich	centrifuga Universal 32R
Kambič	parni sterilizator A-500/700
Leica Mycrosystems	Leica TCS SP5 konfokalni mikroskop in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
Sigma- Aldrich	parafilm
Syngene	G:BOX in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
Thermo Scientific	NanoDrop 1000 in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
PlastiBrand	nastavki za avtomatske pipete
Privileg	aparatura za varjenje vrečk

3.1.4 Uporabljena protitelesa

Preglednica 6: uporabljena protitelesa

Protitelo	Opis
Primarna protitelesa proti p20 (Adipogen) za prenos po Westernu	Mišja monoklonska protitelesa, ki prepozna p20 podenoto kaspaze.
Sekundarna protitelesa proti mišjim protitelesom (Santa Cruz) za prenos po Westernu	Kozja poliklonska protitelesa proti mišjim protitelesom IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo.
Lovilno protitelo proti IL-1 β (za test ELISA)	Mišje monoklonsko protitelo, ki prepoznavata IL-1 β .
Primarno protitelo proti IL-1 β (za test ELISA)	Mišje monoklonsko telo proti epitopu (različnem od epitopa, ki ga prepozna lovilno protitelo) antigena IL-1 β .
Detekcijsko protitelo (za test ELISA)	Sekundarna protitelesa proti mišjim IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo.

3.1.5 Plazmidi

Preglednica 7: uporabljeni vektorji in plazmidi

Vir	Vektor	Opis
Novagen	pET19b	Vektor za izražanje proteinov v bakterijah z IPTG inducibilnim promotorjem T7, terminatorjem T7 in histidinskim repom. V vektorju smo pripravili mutante flagelina.

3.1.6 Organizmi

Preglednica 8: bakterijski sevi, uporabljeni v magistrskem delu

Sev	Genotip	Vir
DH5 α	F $^-$ / supE44, $\Delta lacU169$ ($\phi 80$ lacZ $\Delta M15$) $hsdR17$ $recA1$ $endA1$ $gyrA96$, $thi-1$, $relA1$	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana
BL21[DE3]pLysS	F $^-$, $ompT$, $hsdS_B$ (r_B^- , m_B^-), gal , dcm DE3) pLysS (Cam R)	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana
NiCo21[DE3]	$can::CBD$ $fhuA2$ [lon] $ompT$ gal (λ DE3) $[dcm]$ $arnA::CBD$ $slyD::CBD$ $glmS6Ala$ $\Delta hsdS$ λ DE3 = λ $sBamH1o$ $\Delta EcorI-B$ $int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1)$ $i21$ $\Delta nin5$	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana

Preglednica 9: celične linije uporabljeni v magistrskem delu

Celična kultura	Vir	Opis
Makrofagi divjega tipa	Hornung in sod., 2008	Imortalizirani mišji makrofagi
Makrofagi Nlrc3 ^{-/-}	Hornung in sod., 2008	Imortalizirani mišji makrofagi z izbitim genom za NLRP3

3.1.7 Gojišča

Bakterije *E. coli* smo gojili v gojišču Luria-Bertani (LB). Za selekcijo uspešno transformiranih kolonij smo v gojišče dodali antibiotik ampicilin. Zapis za rezistenco nanj nosi transformirani plazmid.

Preglednica 10: tekoče gojišče LB

Kemikalija	Količina
Gojišče LB po Millerju	25 g/L

Preglednica 11: trdno gojišče LB

Kemikalija	Količina
Gojišče LB po Millerju	25 g/L
Agar	15 g/L
Ampicilin	50 µg/mL

3.1.7.1 Tekoče gojišče LB

Tekoče gojišče LB smo pripravili tako, da smo ustrezno količino gojišča LB po Millerju raztopili v destilirani vodi in ga sterilizirali v avtoklavu. V ohlajeno sterilno gojišče smo inokulirali bakterijsko kulturo. Pred inokulacijo bakterij smo gojišču dodali antibiotik ampicilin (končna koncentracija 50 µg/mL). Nacepljeno gojišče smo inkubirali 16 ur oziroma pri fermentaciji 4-8 ur na stresalniku pri 37°C in 160 obr./min.

3.1.7.2 Gojišče za celične kulture

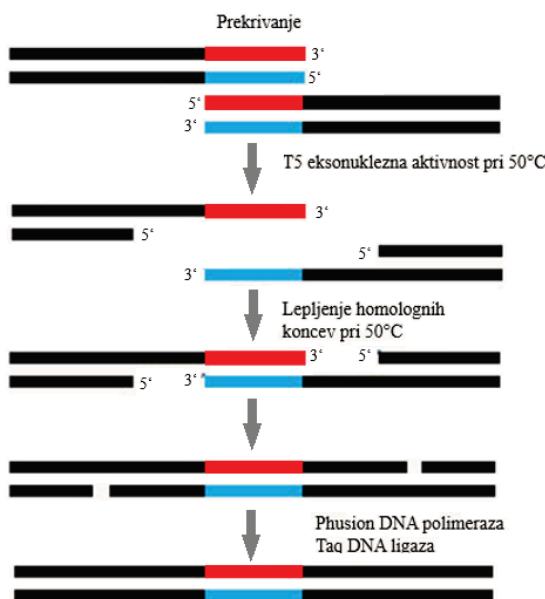
Za gojenje celične linije makrofagov divjega tipa in makrofagov Nlrc3^{-/-} smo uporabljali gojišče DMEM z 10% FBS.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava genskih konstruktov

3.2.1.1 Priprava oligonukleotidnih začetnikov za združevanje PCR pomnožkov

Metoda temelji na združevanju PCR pomnožkov s homolognimi konci (slika 7). Zato oblikujemo oligonukleotidne začetnike s prekrivajočimi konci za združevanje PCR pomnožkov. Med fragmenti, ki jih želimo združiti, je potrebno približno 40 bp dolga homologna regija. Oligonukleotidni začetnik je sestavljen iz 20 bp dolgega štrlečega konca, ki se prilega fragmentu, s katerim ga želimo združiti ter 20 bp dolgega konca, ki se prilega na matrico. Z ustreznim načrtovanjem oligonukleotidnih začetnikov lahko v matrico ali v štrleči konec vnesemo spremenjene kodone in na ta način spremenimo aminokislinsko zaporedje proteina.



Slika 7: shematski prikaz metode lepljenja po Gibsonu

Preglednica 12: uporabljeni oligonukleotidi začetniki

Ime	Opis
Strep_pET19b_F	Naleganje na vektor pET19b, uvajanje streptavidinskega repa na C terminalni konec flagelina.
Flic_strep_R	Naleganje na C terminalni del flagelina, uvajanje streptavidinskega repa.

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 12: uporabljeni oligonukleotidni začetniki.

pET19b_HIS_F	Naleganje na N terminalni del flagelina, prekrivanje z histidinskim repekom.
pET19b_HIS_R	Naleganje na vektor pET19b, prekrivanje N-terminalnim delom flagelina..
A491S_F	Naleganje na vektor, prekrivanje s C terminalnim delom flagelinom in uvajanje serina na mestu 491 v mutanto VLSLL_5A.
A491S_R	Naleganje na C terminalni del flagelina, uvajanje serina na mestu 491 v mutanto VLSLL_5A, prekrivanje z vektorjem pET19b

3.2.1.2 Verižna reakcija s polimerazo

S pomočjo verižne reakcije s polimerazo smo z ustreznimi oligonukleotidnimi začetniki pomnožili genske odseke in jih nato s pomočjo lepljenja po Gibsonu klonirala v plazmidni vektor pET19b.

Preglednica 13: sestava reakcijske mešanice reakcije PCR s polimerazo Kappa

Komponenta	Volumen v μL za 1 reakcijo
reakcijski pufer s polimerazo (2x)	12.5
Matrična DNA (10-15 ng)	1
Primer 1 (5 pM)	0.75
Primer 2 (5 pM)	0.75
Destilirana voda	10
Skupni volumen	25

Preglednica 14: temperaturni profil reakcije PCR s polimerazo Kappa

Stopnja	Temperatura	Čas
1. začetna denaturacija	95 °C	2 min
2. 30 ciklov	denaturacija	95 °C
	prileganje*	65 °C
	podaljševanje	68 °C
3. zaključno podaljševanje	68 °C	7 min
4. konec	4 °C	neskončno

* Temperaturo prileganja smo izračunali po spodnji enačbi (T_m , ang. melting temperature):

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \quad \dots (1)$$

kjer pomenijo oznake G, C, A in T število posameznih nukleotidov v delu začetnega oligonukleotida, ki prilega na matrico.

3.2.1.3 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost PCR reakcij smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Metoda temelji na ločevanju DNA glede na velikost, kar dosežemo z različno zamreženostjo gela. Uporabljali smo 1% (w/v) gel. Zatehtali smo agarozo in jo zmešali z 1x TAE pufrom. Raztopili smo jo s segrevanjem in ji po ohlajanju dodali etidijev bromid (končna koncentracija 10g/L). Pred nanosom vzorcev DNA na gel, smo jih zmešali z nanašalnim pufrom. Poleg vzorcev smo nanesli še standard (GeneRule 1kb DA Ladder), ki nam omogoča določanje dolžine fragmentov. Elektroforeza je potekala v 1xTAE pufru pri konstantni napetosti 120 V približno pol ure. Gel smo nato slikali pod UV lučjo.

3.2.1.4 Čisčenje fragmentov DNA iz gela

Iz agarognega gela smo izrezali fragmente DNA pričakovane velikosti. PCR pomnožke smo iz gela očistili s pomočjo kita (GeneJet PCR purification kit Extraction). Očiščenim DNA pomnožkom smo določili koncentracijo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 260nm, ter jim določili čistost iz razmerja A_{260}/A_{280} .

3.2.1.5 Lepljenje po Gibsonu

V reakciji PCR, smo z oligonukleotidnimi začetniki pomnožili željene genske fragmente in plazmidni vektor. V pripravljeno reakcijsko mešanico smo dodali ustrezne PCR produkte, ki smo jih žeeli združiti in inkubirali 1 uro pri 50°C. Nato smo mešanico transformirali v kompetentne celice.

Preglednica 15: sestava reakcijske mešanice za reakcijo lepljenja po Gibsonu

Komponenta	Volumen
Puffer ISO (5x)	320 µL
Eksonukleaza T5 (10 U/µL)	0.64 µL
DNA polimeraza Phusion (2 U/µL)	20 µL
DNA ligaza Taq (40 U/µL)	160 µL
MQ	700 µL
Skupni volumen	1.2 mL

3.2.1.6 Transformacija kompetentnih celic *E. coli*

Vse plazmide z vstavljenimi konstrukti smo namnožili v kompetentnih bakterijskih celicah DH5α. Transformacijo smo izvedli s topotnim šokom. Pripravljene kompetentne celice, ki so bile shranjene na -80°C, smo odtajali na ledu in jim dodali ligacijsko mešanico in vnos DNA izvedli s temperaturnim šokom pri 42°C, 2 minuti. Po topotnem šoku smo celice prenesli nazaj na led za nekaj minut. Nato smo celicam dodali 1 mL gojišča LB in jih inkubirali 45 min pri 37°C s stresanjem. Po eni uri inkubacije smo celice zbrali s centrifugiranjem 3 minute pri 7000 obr./min. Celični pelet smo resuspendirali v 50 µL gojišča in jih razmazali na LB plošči z dodanim antibiotikom. Po prekonočni inkubaciji na 37°C smo kolonije, ki so zrasle na plošči s sterilnim zobotrebcem prenesli v 10 mL tekočega gojišča LB z dodanim antibiotikom ter zopet inkubirali čez noč pri 37°C.

3.2.1.7 Izolacija plazmidne DNA

Za izolacijo plazmidne DNA smo uporabili komercialno dostopen komplet (GeneJet Plazmid Miniprep Kit) in izolacijo izvedli po navodilih proizvajalca. Izolacija plazmidne DNA temelji na alkalni lizi celic in vezavi plazmidne DNA na kolono. DNA smo eluirali v 50 µL sterilne vode in izolirani DNA izmerili koncentracijo s pomočjo naprave NanoDrop (določanje koncentracije DNA v vzorcu pri valovni dolžini 260 nm). Raztopine plazmidne DNA smo shranjevali pri -20 °C.

3.2.1.8 Določanje nukleotidnega zaporedja

Za potrditev pravilnega nukleotidnega zaporedja smo konstrukte poslali podjetju GATC Biotech v Nemčijo, ki je določilo nukleotidno zaporedje. Dobljene rezultate smo preverili s pomočjo programa GATC viewer in EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (EBI).

Preglednica 156: uporabljene flagelinske mutante

Mutanta	Sprememba aminokisline	Sprememba kodona
D455A	Asparaginska kislina → alanin	GAT → GCG
D457A	Asparaginska kislina → alanin	GAC → GCG
Y458A	Tirozin → alanin	TAC → GCG
R467A	Arginin → alanin	CGC → GCG
T476A	Treonin → alanin	ACC → GCG
L479A	Levcin → alanin	CTG → GCG
Q484A	Glutamin → alanin	CAG → GCG
P486A	Prolin → alanin	CCG → GCG
N488A	Asparagin → alanin	AAC → GCG
S491A	Serin → alanin	TCT → GCG
sub_VLSLL_5A	Valin, lizin, serin, lizin, lizin → alanin	GTC CTC TCT TAA CTG → GCG
A491S_povrnjena	Alanin → serin	GCG → TCT
R494A	Arginin → alanin	CGT → GCG
R494E	Arginin → glutamatska kislina	CGT → GAA

S kloniranjem po Gibsonu smo mutantam D455A, D457A, Y458A in T476A uvedli streptag. Prav tako smo s kloniranjem naredili alaninsko mutantno A491S_povrnjena, kjer sem na mesto 491 mutantni VLSLL_5A povrnili serin. Ostali genske konstrukte za proteinsko produkcijo so iz plazmine zbirke laboratorija L-12 oziroma od delovne mentorice Vide Forstnerič.

3.2.2 Izolacija proteinov

3.2.2.1 Transformacija plazmidov v bakterije in precepljanje v tekoče gojišče LB
Bakterijske kolonije seva BL21 in NiCo21, ki so bile transformirane z ustreznim plazmidom (z vstavljenim genom za flagelin divjega tipa ali flagelinsko mutantno), smo nasadili na trdno LB gojišče z dodanim ampicilinom. Po tri bakterijske kolonije iz ene plošče, smo sterilno precepili v 100 mL tekočega gojišča LB, kateremu smo predhodno dodali antibiotik. Bakterijsko kulturo smo inkubirali na stresalniku preko noči pri 37°C, 160 obr./min.

3.2.2.2 Vzgoja bakterij za pridobivanje proteinov

Prekonočni bakterijski kulturi smo določili optično gostoto (OD) pri 600 nm. Za nadaljnjo fermentacijo smo v 0,5 L gojišča prenesli toliko prekonočne bakterijske kulture, da je OD₆₀₀ znašal 0,1. Za izračun smo uporabili formulo:

$$V(\text{inokuluma}) = A(\text{željena}) \times V(\text{gojišča}) / A(\text{OD}600) \quad \dots (2)$$

V 30 minutnih intervalih smo spektrofotometrično spremljali bakterijsko rast. Ko je dosegla logaritemsko fazo rasti (OD₆₀₀= 0,6-0,8) smo sprožili produkциjo proteinov z dodatkom IPTG (končna koncentracija 1mM). Po dodatku induktorja, smo bakterijsko kulturo gojili 4 ure pri 37°C in 160 obr./min.

Po 4 urah smo bakterijsko kulturo zbrali s centrifugiranjem pri 4°C in 5500 obr./min. Bakterijski pelet smo zamrznili čez noč pri -20°C. Ta korak je pomemben, saj kristali ledu, ki nastanejo ob zamrzovanju, poškodujejo bakterijsko celično steno, kar izboljša nadaljnje korake proteinske izolacije.

3.2.2.3 Liza celic in soniciranje

Zaradi občutljivosti proteinov so vsi korake izolacije so potekali na ledu in z ohljenimi pufri. Bakterijski pelet smo resuspendirali v 20 mL liznega pufra (0.2% DOC), dodali 2 µL/mL CPI in celice sonicirali pri nastavitevah pulza 1 s ON, 2 s OFF pri amplitudi 35%, 10 minut. Po soniciranju smo vzorce prenesli v centrifugirke in centrifugirala 45 minut pri 12000 obr./min. in 4°C.

3.2.2.4 Preverjanje izražanja proteina s pomočjo SDS poliakrilamidne elektroforeze

Pred nanosom celičnega lizata na kolono smo preverili uspešnost izražanja proteina z SDS poliakrilamidno elektroforezo.

Priprava SDS- poliakrilamidnega gela

Najprej smo pripravili 10 % separacijski gel, ki omogoča ločbo proteinov glede na velikost zaradi zamreženosti.

Preglednica 167: sestava 10% ločevalnega SDS gela (volumen za 2 gela)

Komponenta	Volumen
LOČITVENI GEL (10%)	
MQ	4.1 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 mL
10% (w/v) SDS	100 µL
30% akrilamid/bis	3.3 mL
10% APS	50 µL
TEMED	5 µL

Ko se je separacijski gel strdil smo vlili še vstopni 4% gel.

Preglednica 178: sestava 4% vstopnega SDS gela (volumen 2 gela)

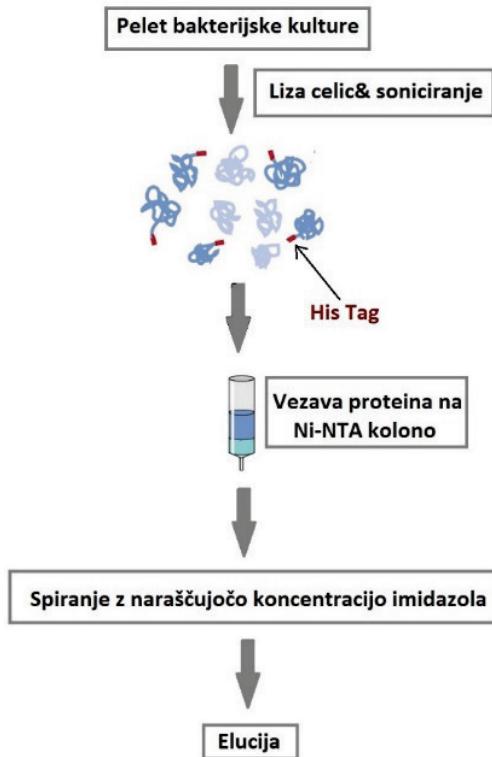
Komponenta	Volumen
VSTOPNI GEL (4%)	
Destilirana voda	3.05 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 mL
10% (w/v) SDS	50 µL
30% akrilamid/bis	0.665 mL

Po centrifugiranju smo del supernatanta prenesli v mikrocentrifugirko in dodali SDS pufer z reducentom. Tako pripravljene vzorce smo nanesli v žepke gela, v prvi žepek smo nanesli standard. Za elektroforezo smo uporabili vertikalni sistem Mini-Protean II. Elektroforeza je tekla 45 minut pri konstantni napetosti 200 V. Po elektroforezi smo gel pobarvali z barvilkom Coomassie brilliant blue.

3.2.2.5 Izolacija proteinov z afinitetno kromatografijo

Za ločevanje proteinov označenih s histidinskim repkom smo uporabili Ni-NTA kolono s 5 mL polnila Ni-NTA (slika 8). Kolono smo pred pričetkom dela sprali z destilirano vodo in nato s pufrom 0. Po centrifugiranju smo bakterijski supernatant nanesli na kolono in inkubirali ob konstantnem mešanju. Nevezane proteine smo iz kolone odstranili s spiranjem, pri čemer smo uporabili pufre 0, 1, 2 (30 mL vsakega) v zapisanem zaporedju. Med spiranjem smo lovili vzorce in spektrofotometrično preverjali prisotnost proteinske frakcije do vrednosti OD₂₈₀ 0.03.

Protein smo eluirali z 250 mM imidazolom, ki se kompetitivno veže na Ni-NTA. V vseh eluatih smo preverili prisotnost proteina in njegovo čistost.



Slika 8: delovna shema postopka izolacije proteina na koloni Ni-NTA

3.2.2.6 Čiščenje proteinov z afinitetno kromatografijo s STREP-tag

Proteinom, ki jih želimo čistiti s STREP nosilecem, je potrebno dodati strep-tag označevalec, ki se specifično veže na nosilec. Vzorec proteinov smo vezali na kolono 1 uro pri 4°C. Nevezane frakcije smo sprali s pufrom W, označen protein pa smo iz kolone eluirali s pufrom E, ki vsebuje destibiotin, ki se kompetitivno veže na nosilec.

3.2.2.7 Dializa

Proteinskim frakcijam, ki smo jih nameravali uporabiti za aktivacijo celične kulture makrofagov, smo z dializo zamenjali elucijski pufer s PBS.

3.2.2.8 Koncentriranje vzorcev

Za koncentriranje proteinskih frakcij smo uporabila polietersulfonatne membrane. Metoda temelji na principu ultra filtracije. Centrifugirke z vzorci smo centrifugirali v 5 minutnih intervalih pri 4°C in po vsakem centrifugiranju pomerili absorbanco, dokler nismo dobili željene koncentracije 1-2 mg/mL.

3.2.2.9 Merjenje koncentracije proteinov z metodo BCA

Koncentracijo proteina v vzorcu smo določali z metodo BCA (ang. »bicinchoninic acid assay«). Raztopina BCA, ki jo zmešamo z vzorcem proteinov vsebuje dve ključni

komponenti: bakrove ione in bikinhonsko kislino. Peptidne vezi v proteinih reducirajo bakrove ione v raztopini BCA pri 37°C. Količina reduciranih bakrovih ionov je proporcionalna količini reduciranega proteina. Dve molekuli bikinhonske kisline nato reagirata z reduciranimi bakrovimi ioni. Tako nastane vijoličen kompleks, ki dobro absorbira pri 562 nm. Iz umeritvene krivulje standarda raztopine BSA, smo določili koncentracijo proteina v vzorcu.

3.2.2.10 Določanje čistosti izoliranih flagelinov

Čistost proteina v vzorcu smo določili s pomočjo SDS poliakrilamidne elektroforeze. Na gel smo nanesli 5 ng proteina, kateremu smo predhodno določili koncentracijo z metodo BCA. Postopek priprave vzorcev in elektroforeze sem podrobnejše opisala pri preverjanju izražanja proteinov (poglavje 3.2.2.4).

3.2.3 Delo s celično linijo

3.2.3.1 Postopek shranjevanja v parah tekočega dušika

Celice smo gojili do polne preraščenosti v posodi za gojenje T75. Nato smo jim zamenjali gojišče in jih postrgali s podlage. Prenesli smo jih v centrifugirko ter zbrali s centrifugiranjem. Nato smo odstranili gojišče in celice resuspendirali v mešanici DMSO in FBS v razmerju 9:1. Po 1.5 mL resuspendiranih celic smo razdelili v krioviale, jih zavili v vato ter jih hitro zamrznili na -80°C. Naslednji dan smo jih prenesli v tekoč dušik za dolgoročno shranjevanje.

3.2.3.2 Gojenje celične linije makrofagov divjega tipa in NLRC3^{-/-}

Celično kulturo smo gojili v za to namenjenih posodah v inkubatorju pri 37°C in 5% CO₂. Celice se pritrdirjo na dno v 2 dneh in nato rastejo v monosloju. V času 48 ur po odmrzovanju celične linije gojišča ne menjamo, saj bi tako odstanili večino celic. Po 2 dneh je celicam potrebno zamenjati gojišče. Za poskus so uporabne en teden po odmrzovanju oziroma približno 4 pasaže.

3.2.3.3 Določanje števila celic

Celično kulturo, ki je prerasla celotno površino posode za gojenje smo postrgali iz podlage in resuspendirali v gojišču. 10 µL celic smo odpipetirali v mikrocentrifugirko in dodali 10µL tripan modrila, ki vstopi le v celice s poškodovano celično membrano (mrtve celice).

Suspenzijo celic obarvano s tripan modrim smo odpipetirali v števno celico in viabilnost celične linije določili s pomočjo aparature za štetje celic Countess.

Celice, ki smo jih naslednji dan uporabljali za eksperiment, smo ustrezno redčili v gojišču DMEM z 10% FBS in nacepili na ploščo s 96 in na ploščo s 6 luknjami. Na ploščo s 96 luknjami smo nacepili 1.5×10^5 celic/luknjo (v 200 μL gojišča), na ploščo s 6 luknjami pa 2×10^6 celic/luknjo (v 1mL gojišča).

3.2.3.4 Stimulacija celične linije makrofagov divjega tipa in NLRC3^{-/-}

Na dan eksperimenta (zjutraj), smo odmrznili alikvit LPS raztopljen v destilirani vodi in ga redčili na koncentracijo 0,2 mg/mL ter ga 15 minut stresali pri največji hitrosti vorteks mešalnika. Nato smo LPS redčili na delovno koncentracijo 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ v gojišču DMEM brez FBS. Iz gojitvene posodice s celicami smo odstranili gojišče in ga nadomestili z gojiščem s primešanim LPS. Stimulacija z 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS je trajala 6 ur. Odmrznjenim vzorcem flagelina smo pomerili koncentracijo z metodo BCA in jih redčili na enako koncentracijo (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) v 20 mM pufri Hepes. Ločeno smo pripravili mešanico DOTAP reagenta v 20 mM Hepesa. Transfekcijski reagent DOTAP, ki tvori komplekse s proteini, smo uporabili za vnos flagelina v celico. Količino DOTAP-a smo dodali glede na koncentracijo oziroma maso dodanega proteina (razmerje DOTAP:flagelin=5:1). Mešanico DOTAP-a s Hepesom in mešanico redčenih flagelinov v pufri Hepes smo združili ter 15 minut inkubirali na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo mešanico flagelina, pufra in reagenta zmešali z ustreznim volumnom gojišča brez dodanega FBS. Odstranili smo gojišče, ki je vsebovalo LPS, in ga nadomestili z gojiščem, ki je vseboval flagelin. Končna koncentracija flagelina na celicah je bila 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Za vsak vzorec flagelina v plošči s 96 luknjami smo naredili eksperiment v treh paralelkah, na plošči s šestimi luknjami pa v eni paralelki. Po štirih urah stimulacije smo pripravili vzorce za analizo IL-1 β in cepitev kaspaze.

3.2.3.5 Priprava vzorcev za prenos po Westernu: obarjanje proteinov z metanolom

Po štirih urah inkubacije smo iz celic odstranili gojišče in ga po 300 μL prenesli v 2 mL mikrocentrifugirke. V vsako mikrocentrifugirko smo nato dodalali 1,6 mL ledeno-hladnega metanola in čez noč pustili na -80°C. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali (4°C, 17500 obr./min.) eno uro. Po centrifugiranju smo odstranili metanol in preostanek odparili na 65°C v hibridizacijski pečici. Oborjene proteine smo resuspendirali v destilirani vodi, vzorce iz treh mikrocentrifugirk združili in dodali 4xSDS pufer z reducentom. Tako pripravljene

vzorce smo nanesli na SDS poliakrilamidni gel. Elektroforezi je sledil prenos na nitrocelulozno membrano.

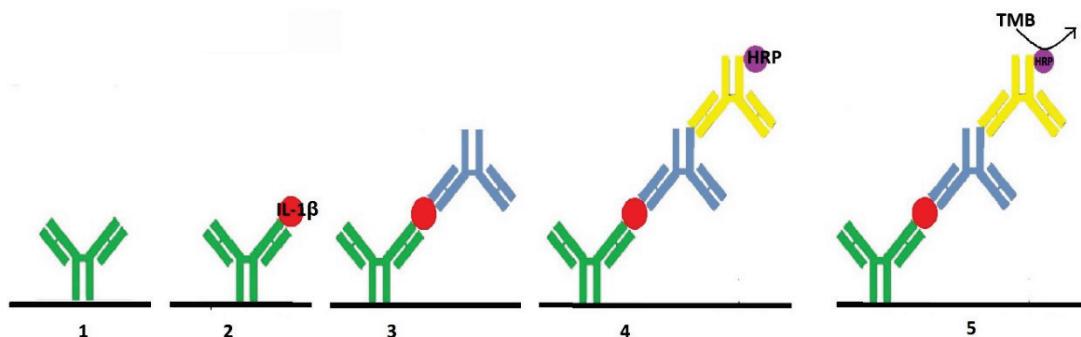
3.2.3.6 Prenos po Westernu

Po končani elektroforezi smo poliakrilamidni gel sprali z destilirano vodo in ga namočili v pufru za moker prenos. S pufrom smo prepjili tudi filter papir in nitrocelulozno membrano. Napravo za prenos smo pripravili po navodilih proizvajalca. Prenos iz gela na membrano je potekal 1.5 ure pri konstantnem toku 350 mA. Po končanem prenosu smo membrano potopili v 0.2 % I-BLOCK in pustili čez noč na 4°C. Naslednji dan smo membrano inkubirali s protitelesi proti podenoti p20 aktivne kaspaze-1 tri ure ter jo pred inkubacijo s sekundarnimi protitelesi sprali v pufru za spiranje. Prisotnost primarnih protiteles smo detektirali s sekundarnimi protitelesi (uporabljeni protitelesi so navedena v preglednici 6) konjugiranimi s HRP (hrenovo peroksidazo). Aktivnost hrenove peroksidaze smo zaznali z luminolom, ki ga HRP razgradi. Ob tem se sprošča svetloba, ki jo zaznamo fotografsko.

3.2.3.7 Priprava vzorcev za test ELISA: določanje interlevkina-1 β

Po štirih urah inkubacije smo s pomočjo multikanalne pipete iz celic odstranili gojišče in ga prenesli v svežo ploščo s 96 luknjami ter jo shranili do naslednjega dne na -20°C.

3.2.3.8 Test ELISA za detekcijo interlevkina-1 β



Slika 9: shematski prikaz testa ELISA

Za zaznavanje IL-1 β smo uporabili komplet ELISA za detekcijo IL-1 β (eBioscience). Postopek smo izvajali po navodilih proizvajalca (slika 9). Dan pred izvedbo detekcije smo na ploščo s 96 luknjami vezali lovilno protitelo za IL-1 β (1). Naslednji dan smo sprali nevezana protitelesa s pufrom za spiranje. Nezasedena vezavna mesta smo blokirali 1 uro z pufrom priloženim v kompletu. Na ploščo smo nato nanesli redčitve standardov ter svoje vzorce ter inkubirali 2 uri ali čez noč v hladilniku (2). Po inkubaciji in spiranju smo dodali

primarna protitelesa proti drugemu epitopu na IL-1 β (250x redčena) (3). Po 1 uri inkubacije smo luknjice sprali s pufrom za spiranje in vezali sekundarna protitelesa na katera je konjugiran encim hrenova peroksidaza (HRP) (250x redčena) (4). Po 30 minutni inkubaciji smo sprali odvečna sekundarna protitelesa in dodali substrat TMB (5). Encimsko reakcijo smo po nekaj minutah ustavili z 1 M H₃PO₄. Nato smo pomerili absorbanco na čitalcu mikrotiterskih plošč. Iz izmerjenih vrednosti absorbance redčenih standardov smo pripravili umeritveno krivuljo, ki nam služi za kvantifikacijo koncentracije IL-1 β v vzorcih.

3.2.4 Konfokalna mikroskopija

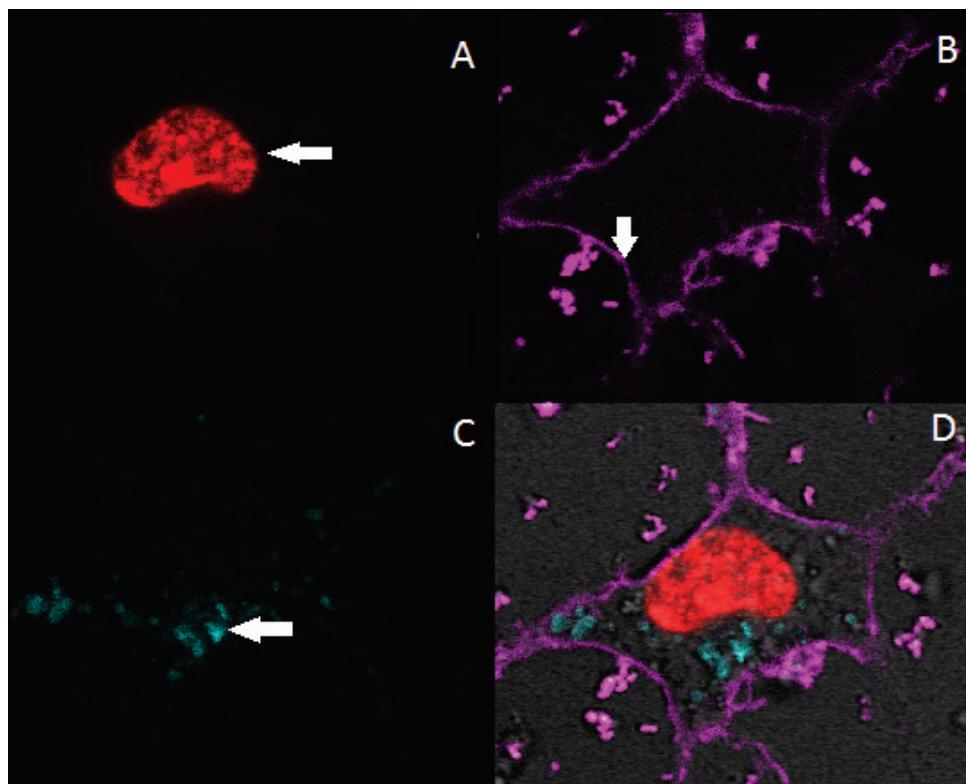
Makrofage smo nacepili v mikroskopirno komorico z osmimi luknjicami v gostoti 1x10⁵ celic/luknjo. Po 24 urah, ko so se celice pritrstile, smo jim dodali fluorescenčno označen flagelin, kasneje pa smo celicam dodali še barvilo Hoechst in podenoto B kolera toksina konjugirano z barvilo Alexa Fluor. Za upodabljanje celične membrane, jedra in fluorescenčno označenega flagelina smo uporabili konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 na Leica DMI 6000 CS stojalu, za analizo slik smo uporabljali računalniški program Leica LAS AF Lite.

Uporabljali smo 63× oljni imerzijski objektiv z numerično aperturo 1.40. Glede na vrsto fluorofora smo uporabili ustrezne laserje. Poleg ustreznega laserja smo za detekcijo oddane svetlobe fluorofora nastavili še sledeče parametre: moč laserskega žarka, dihroična zrcala, območje detekcije oddane svetlobe, napetost na fotopomnoževalki. Himerne fluorescentno označene proteine smo vzbujali z laserjem valovne dolžine 488 nm, oddano fluorescenco pa detektirali pri valovni dolžini 520-550 nm. Za barvanje celičnega jedra smo uporabili barvilo Hoechst 34580, ki smo ga vzbujali pri valovni dolžini 405 nm, emitirano svetlubo pa zaznali pri 430-460 nm. Barvilo se veže na DNA. Alexa Fluor 647 smo vzbujali z laserjem 330 nm, detektirali pa pri 650-700 nm.

4 REZULTATI

4.1 OPAZOVANJE CELIČNIH STRUKTUR IN FLAGELINA ZNOTRAJ MAKROFAGOV

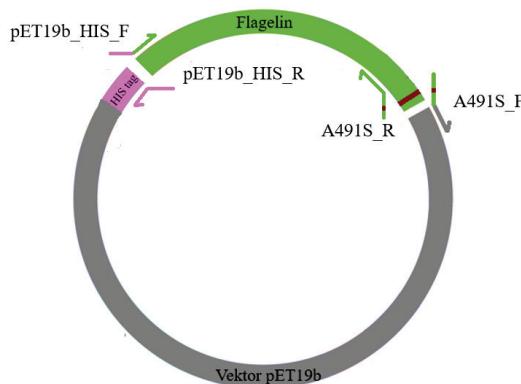
Z vizualizacijo makrofagov, ki smo jim dodali flagelin označen z barvilo Alexa Fluor 488, smo želeli potrditi, da flagelin vstopi v makrofage. Za upodabljanje smo uporabili makrofage, ki smo jih tretirali z označenim flagelinom ter barvali jedra in membrane. Po standardnem postopku šest urne stimulacije z LPS, smo s pomočjo reagenta DOTAP flagelin označen s fluoroforom dodali makrofagom. Nato smo na celice dodali barvilo Hoechst 34580 (0.1 µg/mL), ki se veže na DNA molekule, s čimer smo lokalizirali jedro. Nazadnje pa smo na celice nanesli še barvilo Alexa Fluor 647 (0.1 µg/mL). Pokazali smo, da flagelin že po eni uri vstopi v celico (slika 10).



Slika 10: makrofagi z dodanim flagelinom in barvani s Hoechst 34580 in Alexa Fluor 647. S puščico označene celične strukture; A: jedro makrofaga (rdeče), B: celična membrana (roza), C: flagelin (modro), D vse tri strukture označene na isti sliki

4.2 PRIPRAVA GENSKIH KONSTRUKTOV FLAGELINSKIH MUTANT

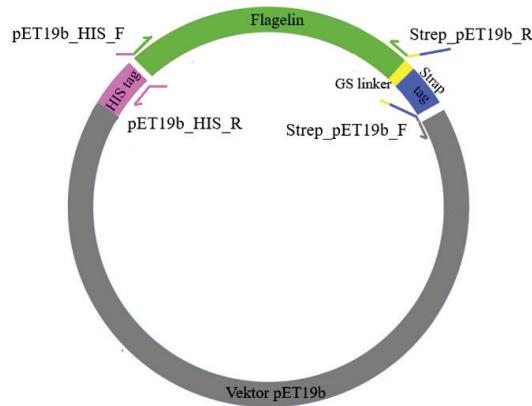
V okviru magistrskega dela smo pripravili eno mutanto. Mutanti sub_VLSLL_5A, ki ima zadnjih pet aminokislinskih ostankov spremenjenih v alanin, smo alanin na mestu 491 spremenili nazaj v serin (slika 11). S tem smo želeli preveriti, da serin nima vpliva pri aktivaciji inflamasoma, kar smo eksperimentalno tudi potrdili. Pri tem smo uporabili oligonukleotidne začetnike, A491S_F in A491S_R (preglednica 12). Ostale flagelinske mutante za proteinsko produkcijo smo dobili že pripravljeni iz zbirke plazmidov Kemijskega inštituta.



Slika 11: shematski prikaz vnosa točkovne mutacije s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov

4.3 PRIPRAVA FLAGELINSKIH MUTANT S STREPTAVIDINSKIM REPKOM

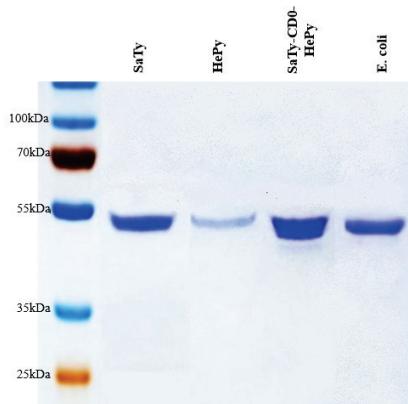
Flagelinskim mutantam podvrženim proteolizi, smo na C terminalni del proteina s kloniranjem uvedli streptavidinski rep. Konstrukte smo pripravili s postopkom lepljenja po Gibsonu, pri čemer smo uporabili oligonukleotidne začetnike strep_pET19b_F in strep_pET19b_R (preglednica 12) (slika 12).



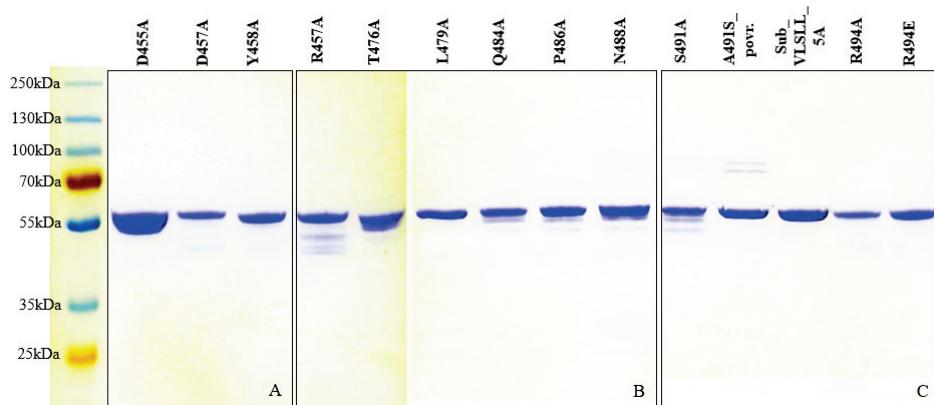
Slika 12: shematski prikaz uvedbe streptovidinskega repka s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov

4.4 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE FLAGELINOV

Za produkcijo proteinov smo uporabili postopek opisan v poglavju materiali in metode. Po zaključku bakterijske fermentacije smo proteine očistili z afinitetno kromatografijo ter po dializi ter koncentriranju določili koncentracijo proteinov. Čistost proteinov smo določili z SDS poliakrilamidno elektroforezo. Iz slik gelov je razvidno (slika 13 in 14), da so bili izolirani proteini čisti in niso vsebovali razgradnih produktov. Majhen delež razgrajenih proteinov smo zaznali pri mutantah R457A in S491A.



Slika 13: slika poliakrilamidnega gela flagelinov divjega tipa prikazuje flageline divjega tipa *Salmonella typhimurium* (*SaTy*), *Helicobacter pylori* (*HePy*) in *Escherichia coli* (*E. coli*) ter himernega flagelina *Salmonelle typhimurium*, kjer smo 35 aminokislinskih ostankov CD0 regije zamenjali s aminokisinami iz flagelina *Helicobacter pylori*



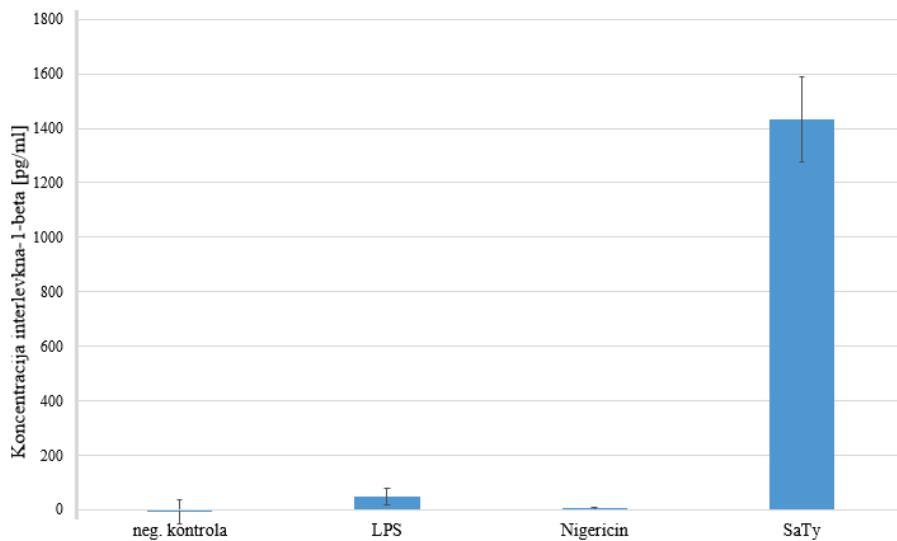
Slika 14: slika poliakrilamidnega gela flagelinskih mutant. (A) Mutante iz povezovalne regije flagelina, (B) mutante iz alfa helične regije CD0 regije flagelina in (C) mutante iz končnega dela CD0 regije flagelina

4.5 STIMULACIJA INFLAMASOMA NAIP/NLRC4

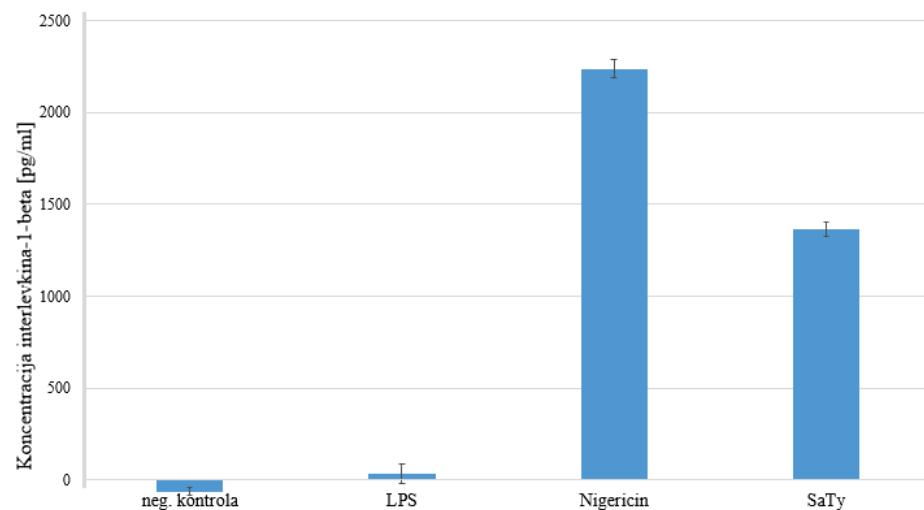
Aktivacijo inflamasoma NAIP5/NLRC4 smo preverjali na dva načina. Sproščanje interlevkina (IL-1 β) smo določili s testom ELISA. S prenosom po Westernu pa smo preverjali prisotnost cepljene kaspaze-1, ki se cepi ob aktivaciji inaflamasoma.

Makrofagi vsebujejo dva glavna inflamasoma NLRC3 ter NLRC4. V magistrski nalogi smo uporabljali makrofage z obema inflamasomoma. Zato smo kot kontrolo uporabili tudi makrofage z okvarjenim NLRC3. Na ta način smo ovrednotili prispevek NLRC3. Makrofage smo predaktivirali z LPS in jih nato stimulirali z različnimi flagelini. Pri makrofagih NLRC3 $^{-/-}$ smo pričakovali, da pri nigericinu ne bo odziva, zaradi odsotnosti NLRC3, kar se je tudi zgodilo (slika 15).

Z namenom ovrednotenja rezultatov smo naredili več kontrol (slika 15 in 16 ter slika 17). Z netretiranimi celicami (negativna kontrola) smo preverili morebitno aktivnost zaradi staranja celic. Naslednja kontrola je bila stimulacija le z bakterijskim lipopolisaharidom LPS, ki preko receptorja TLR4 na površini celice, sproži sintezo pro-interlevkina-1-beta. Tretja kontrola je bil nigericin (pozitivna kontrola), toksin bakterije *Streptomyces hygroscopicus*, ki aktivira inflamasom NLRC3. S to kontrolo smo preverili delovanje makrofagov divjega tipa. Pri makrofagih NLRC3 $^{-/-}$ nismo pričakovali odziva. Za primerjavo in umestitev rezultatov, ki smo jih pridobili iz nepovezanih eksperimentov, smo pri vsakem setu eksperimentov celice stimulirali tudi s flagelinom bakterije *Salmonella typhimurium* (SaTy), za katerega je znano, da sproži aktivacijo inflamasoma (Yang in sod., 2014). Stimulacija s tem flagelinom je služila kot standard, s katerim smo določili znižanje oziroma zvišanje aktivacije inflamasoma.

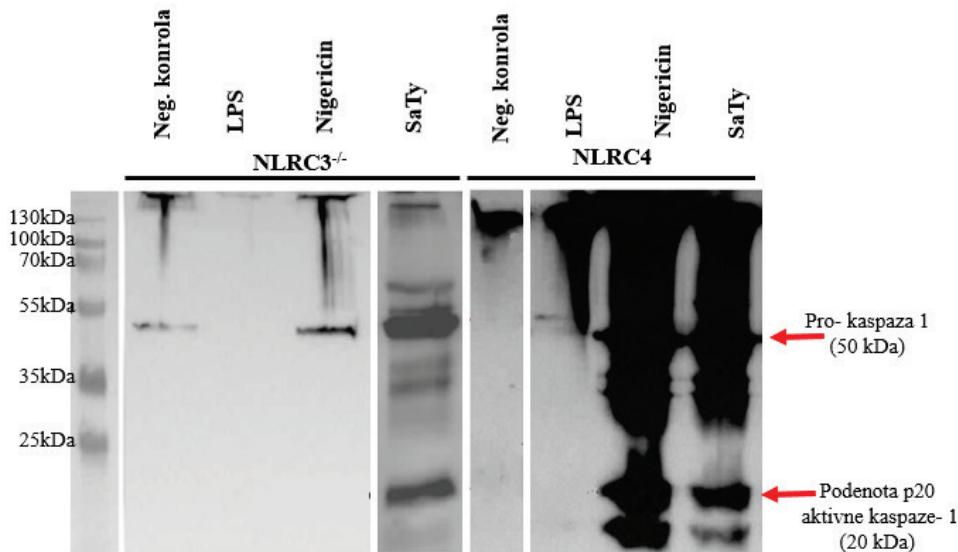


Slika 15: izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov NLRC3 $^{-/-}$ določeno s testom ELISA



Slika 16: izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov divjega tipa določeno s testom ELISA

Rezultati (slika 15) stimulacije NLRC3 $^{-/-}$ makrofagov so potrdili predvidevanje, da dodatek flagelina stimulira celice, ne pa tudi preostale kontrole. Pri makrofagih divjega tipa (slika 16) smo detektirali sproščanje IL-1 β ob stimulaciji z nigericinom, ki aktivira NLRC3 inflamasom, in s flagelinom, ki aktivira NLRC4.



Slika 17: prenos po Westernu (koncentrirano gojišče), kontrole. Označena prokaspaza-1 in podenota p20 aktivne kaspaze-1

Rezultate izločanja IL-1 β smo potrdili tudi preko aktivacije kaspaze-1. Pokazali smo, da ob stimulaciji makrofagov divjega tipa pride do procesiranja kaspaze-1 ob dodatku nigericina in flagelina bakterije *Salmonella typhimurium*. Pri stumulaciji makrofagov NLRC3 $^{-/-}$ z nigericinom ne pride do aktivacije kaspaze-1 (slika 17).

4.5.1 Stimulacija inflamasoma s flagelini divjega tipa

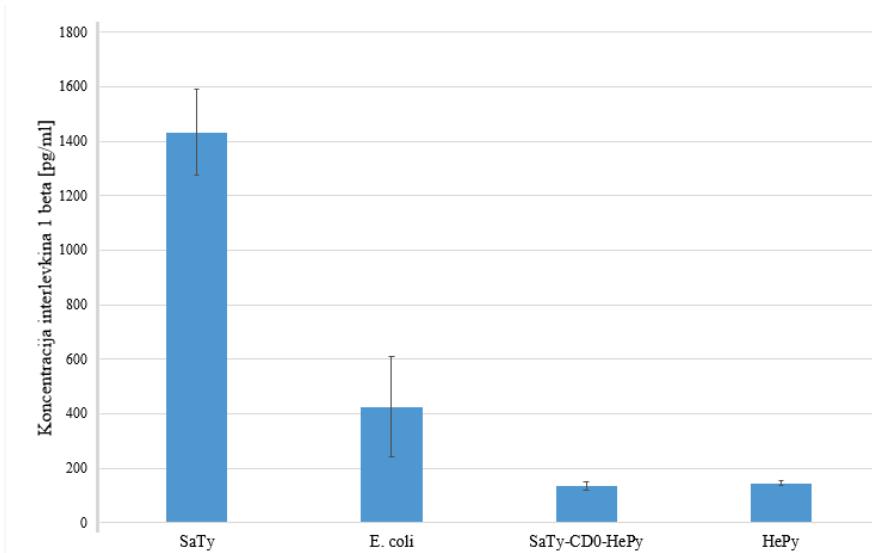
V naslednjem koraku smo preverili učinkovitost flagelina različnih bakterij pri aktivaciji inflamasoma. Primerjali smo flageline bakterij *Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli*. V primerjavo smo vključili tudi flagelin bakterije *Helicobacter pylori*, za katero je poznano, da ne aktivira receptorjev TLR5 (Lee in sod., 2003) (slika 16).



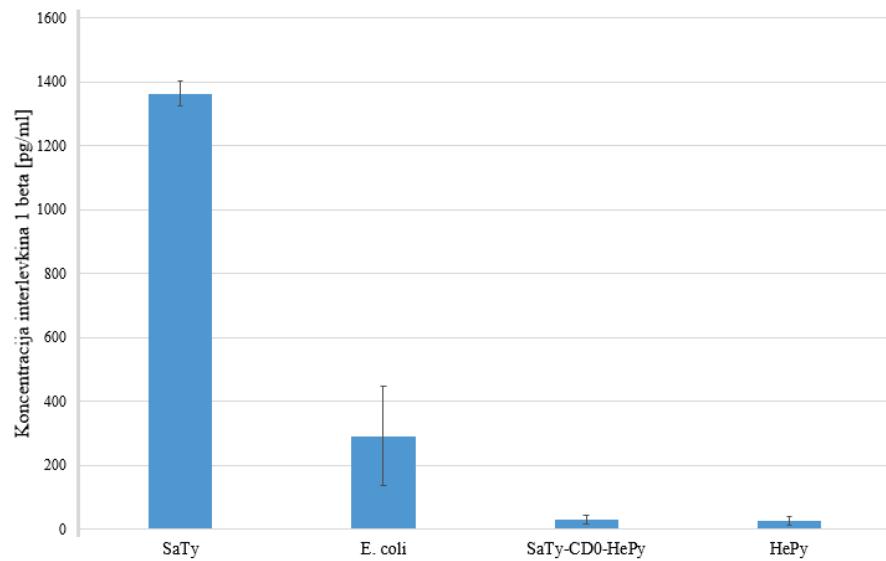
Slika 18: aminokislinska poravnava CD0 regije flagelinov divjega tipa. Sivo so označeni aminokislinski ostanki, ki so skupni flagelinu bakterije *Salmonella typhimurium* in *Helicobacter pylori*. Z modro so označeni aminokislinski ostanki, ki so skupni flagelinu bakterije *Escherichia coli* in *Helicobacter pylori*. Z zeleno so označeni aminokislinski ostanki, ki so skupni flagelinu bakterije *Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli*. Z rumeno so označeni aminokislinski ostanki, ki so skupni vsem trem flagelinom, torej so evolucijsko najbolj ohranjeni

Pri stimulaciji inflamasoma s flagelini divjega tipa opazimo očitne razlike pri odzivu. V primerjavi s flagelinom bakterije *Salmonella typhimurium* je odziv pri stimulaciji s flagelinom bakterije *Escherichia coli* več kot polovico manjši. Flagelin bakterije *Helicobacter pylori* ne povzroči procesiranja IL-1 β in cepitve kaspaze-1 (sliki 19, 20 in 17). Kljub večjemu odstotku homologije flagelinov *Salmonelle typhimurium* in *Helicobacter pylori* v CD0 regiji, nismo pričakovali podobnih rezultatov. Rezultate smo potrdili tudi na celični liniji makrofagov NLRC3 $^{-/-}$ (graf 4). Rezultate testa ELISA smo podkrepili z dokazom cepitve prokaspaze s prenosom po Westernu (slika 21). Kljub manjši aktivaciji inflamasoma, oziroma procesiranju pro-IL-1 β pri stimulaciji s flagelinom bakterije *E. coli* makrofagov divjega tipa, je slabo vidna p20 podenota aktivne kaspaze.

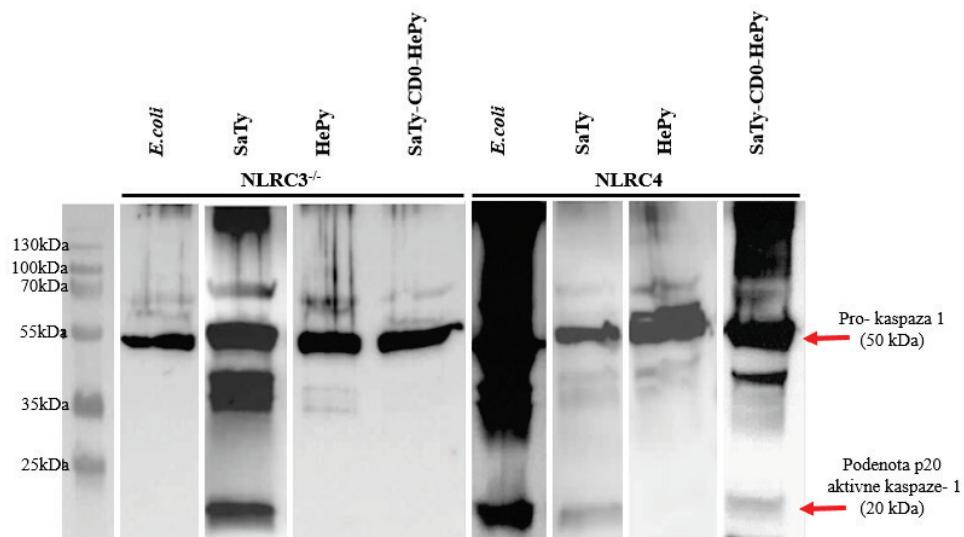
Zanimalo nas je ali je neodzivnost makrofagov na flagelin bakterije *Helicobacter pylori* posledica CD0 domena. V ta namen smo pripravili himerni flagelin *Salmonelle typhimurium*, ki ima CD0 domeno zamenjano s CD0 domeno flagelina bakterije *Helicobacter pylori*. Pri stimulaciji s himernim proteinom SaTy-CD0-HePy pričakovano ni bilo procesiranja IL-1 β . Meritve IL-1 β in kaspaze-1 so potrdili predvidevanje, da CD0 domena flagelina bakterije *Helicobacter pylori* ni pomembna za aktivacijo inflamasoma.



Slika 19: izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov NLRC3 $^{-/-}$ s flagelinom divjega tipa in himernim flagelinom določeno s testom ELISA

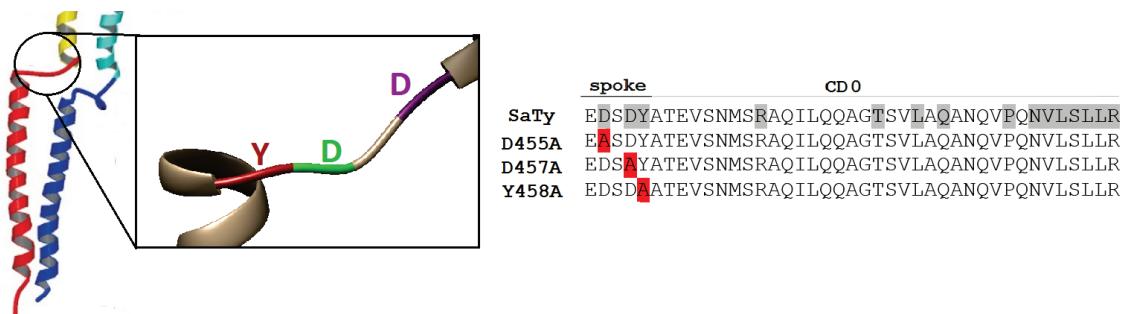


Slika 20: izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov divjega tipa s flagelinom divjega tipa in himernim flagelinom določeno s testom ELISA



Slika 21: prenos po Westernu (koncentrirano gojišče), stimulacija makrofagov s flagelinom divjega tipa.
Označena prokaspaza-1 in podenota p20 aktivne kaspaze-1

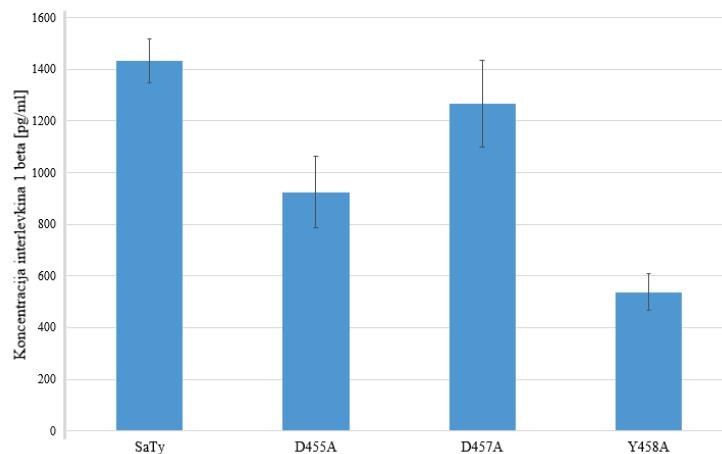
4.5.2 Stimulacija inflamasoma NAIP/NLRC4 z mutantami v povezovalni (ang. »spoke«) regiji flagelina



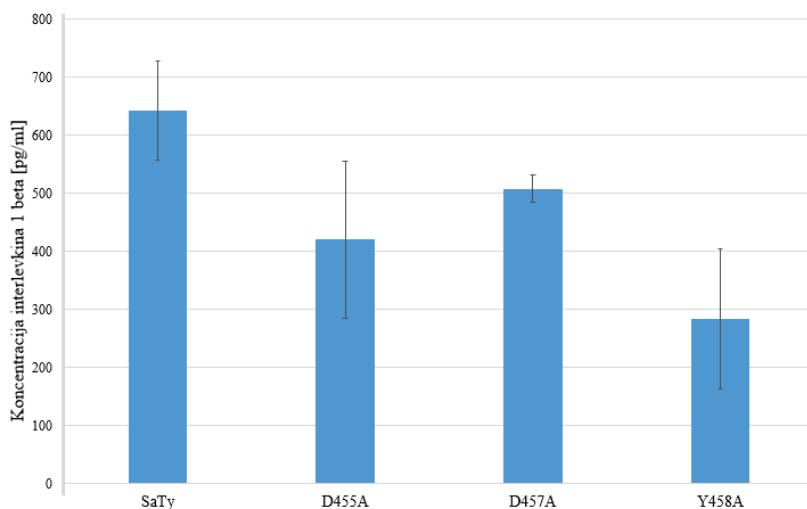
Slika 22: označene aminokisline v povezovalni regiji flagelina. Levo označene aminokisline v povezovalni regiji flagelina, ki smo jih spremenili z mutagenezo; desno aminokislinska poravnava CD0 regije flagelinskih mutant

Pokazali smo, da himerni protein SaTy-CD0-HePy slabo aktivira inflamasom NLRC4, iz česar smo sklepali, da so v aktivacijo vpletene aminokisline CD0 regije. Želeli smo preveriti ali so tudi aminokisline v povezovalni regiji vpletene v aktivacijo inflamasoma. Pripravili smo mutante D455A, D457A in Y458A, ki smo jih očistili in uporabili za aktivacijo inflamasoma NLRC4 v makrofagih.

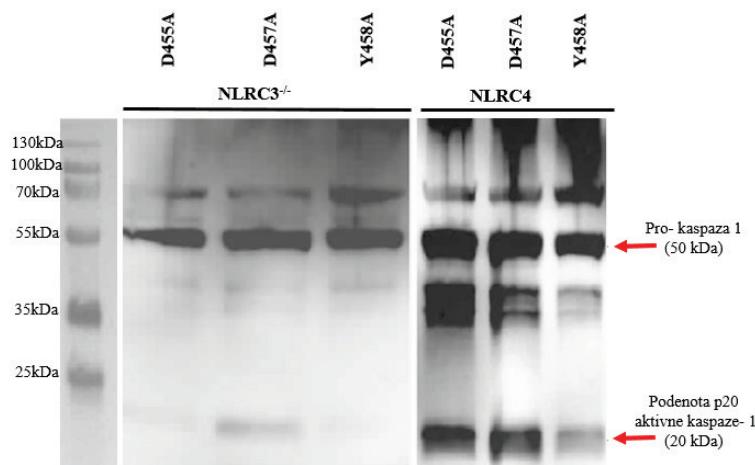
Pri spremeljanju odziva pri mutantah v t.i povezovalni (ang. »spoke«) regiji flagelina, smo pokazali, da alaninski mutanti D455A in D457A dobro aktivirata inflamasom, slabše pa mutanta Y458A (sliki 23 in 24), kar pomeni, da ima aminokislina na tem mestu pomembnejšo vlogo pri inflamasomski aktivaciji. Rezultati prenosa po Westernu se ujemajo z rezultati ELISE (slika 25).



Slika 23: izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov NLRC3 $^{-/-}$ s flagelinskimi mutantami v povezovalni regiji flagelina določeno s testom ELISA

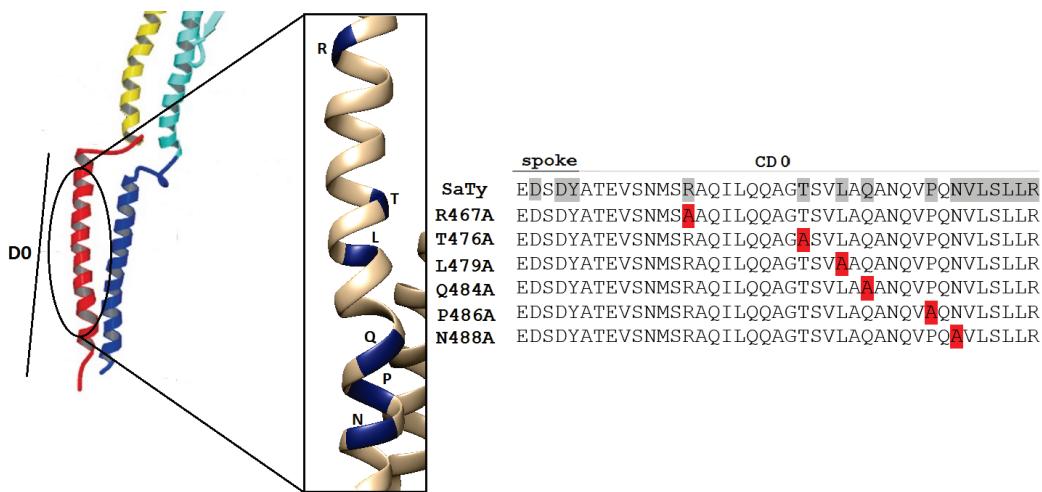


Slika 24: izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov divjega tipa s flagelinskimi mutantami v povezovalni regiji flagelina določeno s testom ELISA



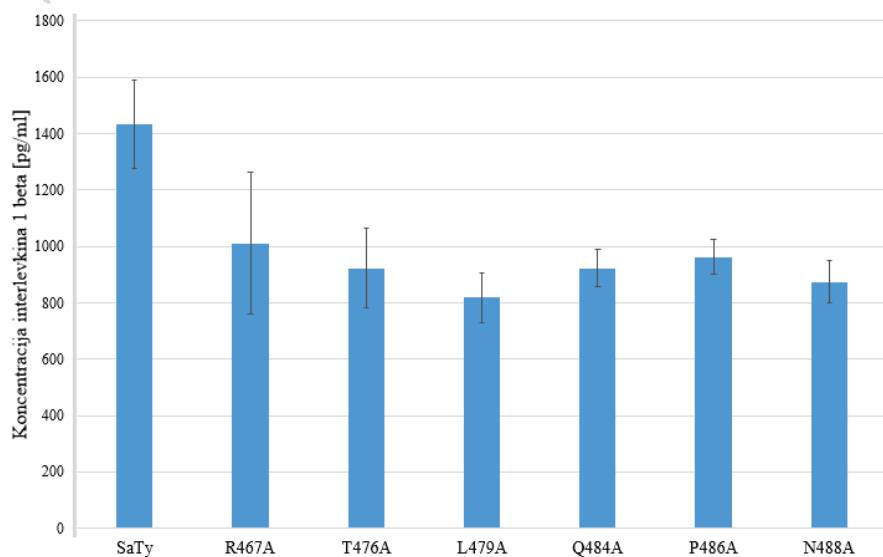
Slika 25: prenos po Westernu (koncentrirano gojišče), stimulacija makrofagov z mutantami flagelina v povezovalni regiji flagelina. Označena prokaspaza-1 in podenota p20 aktivne kaspaze-1

4.5.3 Stimulacija inflamasoma NAIP5/NLRC4 s flagelinskimi mutantami v alfa helični CD0 regiji flagelina

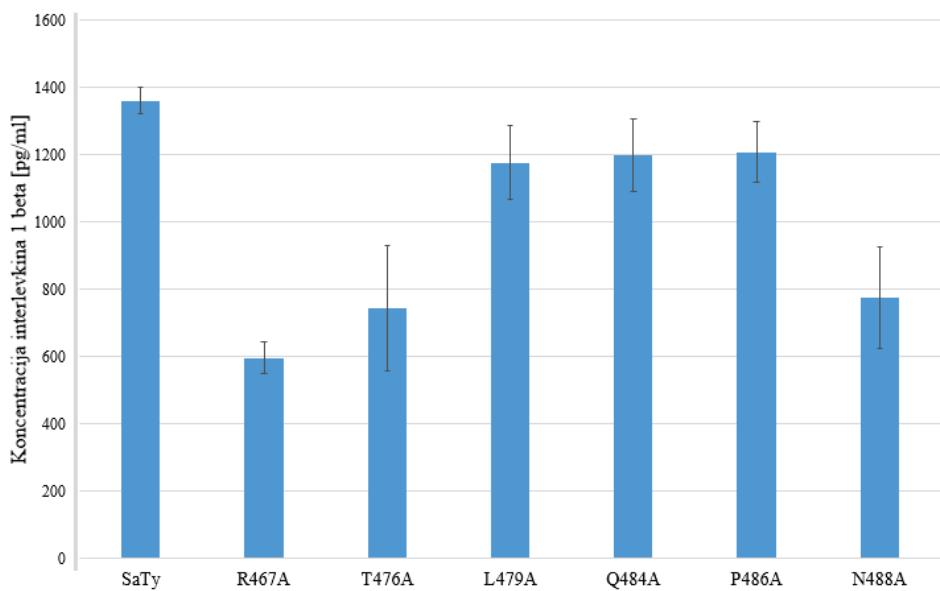


Slika 26: označene aminokisline v alfa helični CD0 regiji flagelina. Levo označene aminokisline v alfa helični CD0 regiji flagelina, ki smo jih spremenili z mutagenezo; desno aminokislinska poravnavo CD0 regije flagelinskih mutant

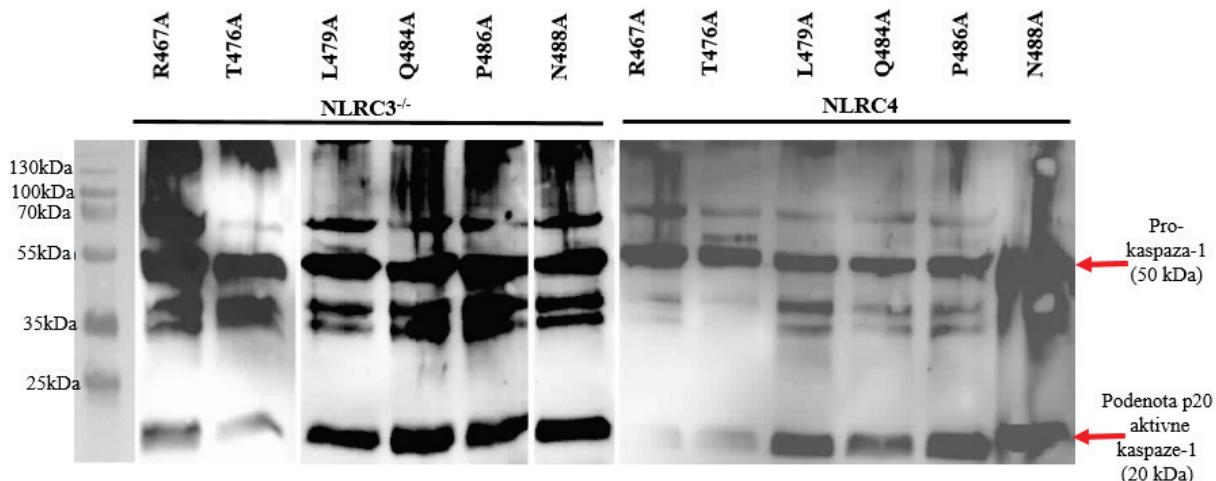
V nadaljevanju nas je zanimalo, kakšen je pomen celotne CD0 domene pri aktivaciji NLRC4. Pripravili smo sledeče mutante R467A, T476A, L479A, Q484A, P486A in N488A. Izbira mutant je temeljila na podobnostih v aminokislinskem zaporedju med flagelini bakterije *Salmonella typhimurium* in *Helicobacter pylori*.



Slika 27: izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov NLRC3/- s flagelinskimi mutantami v alfa helični regiji flagelina določeno s testom ELISA



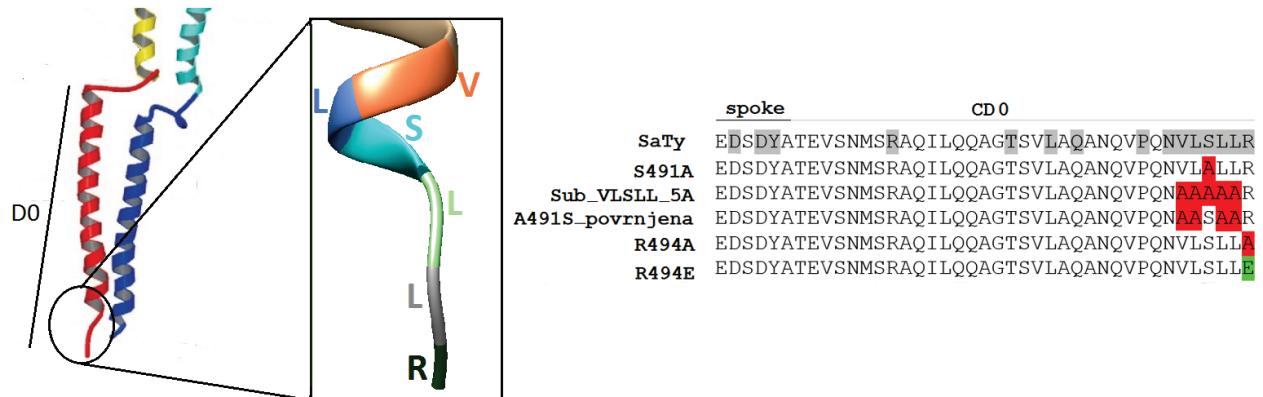
Slika 28: izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov divjega tipa s flagelinskimi mutantami v alfa helični regiji flagelina določeno s testom ELISA



Slika 29: prenos po Westernu (koncentrirano gojišče), stimulacija makrofagov z mutantami v alfa helični CD0 regiji flagelina. Označena prokaspaza-1 in podenota p20 aktivne kaspaze-1

Alaninske mutante v alfa helični regiji v manjši meri zmanjšajo aktivacijo inflamasoma v primerjavi s stimulacijo s flagelinom bakterije *S. typhimurium* (sliki 27 in 28). Mutante T476A, L479A, Q484A in P486A imajo medsebojno primerljiv učinek na aktivacijo inflamasoma. Aktivacija se ne spremeni veliko, iz česar lahko zaključimo, da niso pomembne za inflamasomsko aktivacijo in procesiranje kaspaze-1 (slika 29).

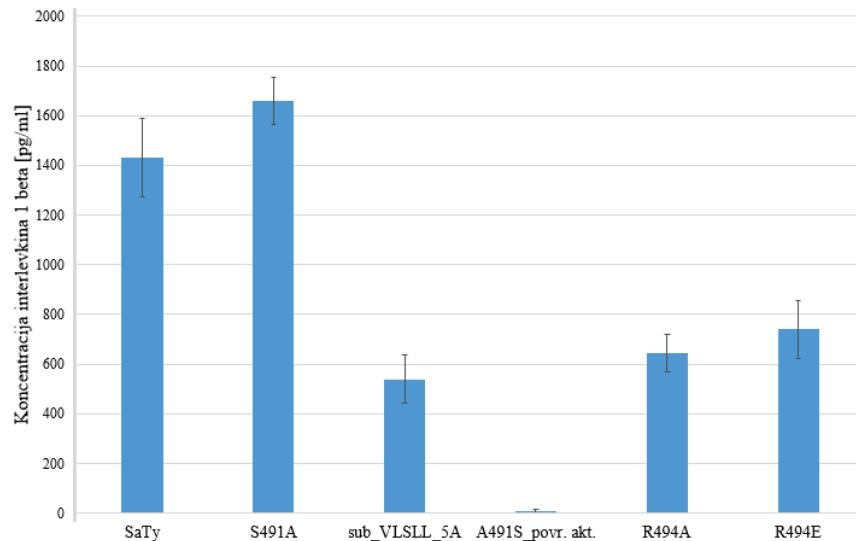
4.5.4 C-terminalni konec flagelina je ključen za aktivacijo inflamasoma



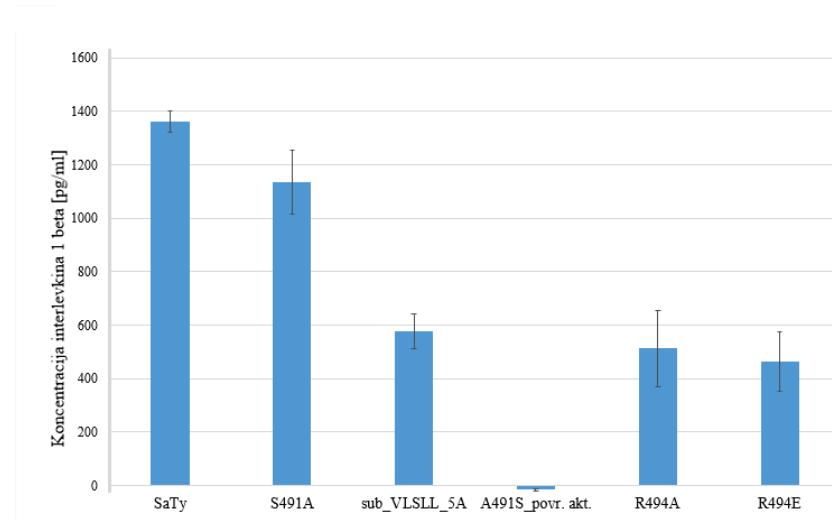
Slika 30: označene aminokisline v začetnem delu CD0 regije flagelina. Levo označene aminokisline v začetnem delu CD0 regije flagelina, ki smo jih spremenili z mutagenezo; desno aminokislinska poravnava CD0 regije flagelinskih mutant

Že iz predhodnih objav je razvidno, da je C-terminalni segment flagelina pomemben za aktivacijo NLRC4 (Lightfield in sod., 2008). Želeli smo preveriti katera aminokislina je v tem delu ključna. Izolirali smo mutante sub_VLSLL_5A, S491A, A491S_povrnjena (povrnjen serin na mestu 491), R494A in R494E. Zmanjšano aktivacijo inflamasoma smo pokazali z mutantom sub_VLSLL_5A, kjer smo aminokisline od mesta 489 do 493 zamenjali z alanini. Aktivacija inflamasoma se je zmanjšala za več kot polovico (slike 31 in 32). Z mutantom A491_povrnjena smo želeli preveriti vlogo serina na mestu 491. Tudi mutanta S491A_povrnjena ne aktivira inflamasoma. Z njo smo potrdili, da serin ni ključen za aktivacijo inflamasoma. Rezultati testa ELISA se ujemajo z prisotnostjo oziroma odsotnostjo podenote aktivne kaspaze-1 (p20) (slika 33).

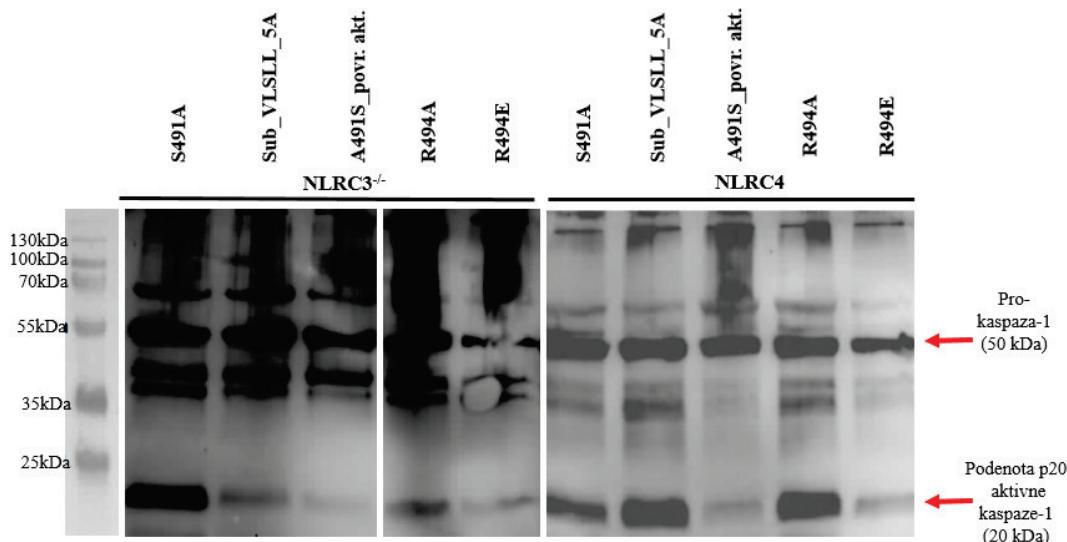
Mutanta R494A zmanjša aktivacijo inflamasoma, kar pomeni, da ima pomembno vlogo pri aktivaciji. Vpliv naboja na aktivacijo inflamasoma smo želeli preveriti z mutantom R494E. Iz rezultatov je razvidno, da tudi sprememba naboja vpliva na aktivacijo inflamasoma. Sprememba naboja ima enak učinek kot zamenjava aminokisline v alanin.



Slika 31: izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov NLRC3 $^{-/-}$ s flagelinskimi mutantami v C terminalni regiji flagelina določeno s testom ELISA



Slika 32: izločanje IL-1 β po stimulaciji makrofagov divjega tipa s flagelinskimi mutantami C terminalni regiji flagelina določeno s testom ELISA



Slika 33: prenos po Westernu (koncentrirano gojišče), stimulacija makrofagov s flagelinskimi mutantami v C-terminanem delu flagelina. Označena prokaspaza-1 in podenota p20 aktivne kaspaze-1

5 RAZPRAVA

Evolucijsko ohranjene antigene patogenov (ang. »PAMP«) zaznava prirojen imunski sistem z receptroji, ki so prisotni na površini celice ali v njeni notranjosti (Vance in sod., 2009). Bakterijski flagelin je tipičen predstavnik teh antigenov in ga prepoznavata tako TLR5 na površini celice (Hayashi in sod., 2001) ter citosolni inflamasomski receptor NLRC4 inflamasoma (Zhao in sod., 2011), ki sta se razvila ločeno. TLR5 zaznava flagelin na površini in sproži z MyD88 posredovano signalno pot, rezultat česar je sinteza citokinov, kemokinov in protimikrobnih snovi (Ramos in sod., 2004). NAIP/NLRC4 zaznava flagelin v citosolu, njegova aktivacija pa vodi v aktivacijo kaspaze-1 in procesiranja IL-1 β (Martinon in sod., 2002). Dvojni senzor omogoča zaznavanje lokacije patogena, ne zgolj njegovo prisotnost (Vance in sod., 2009). Flagelin je glavni strukturni protein bakterijskega bička in je pomemben za njihovo gibanje. Ohranjena domena na N ozziroma C terminalnem koncu je ključna za aktivacijo tako TLR5 kot tudi NLRC4 (Lightfield in sod., 2008). Spreminjanje D1 vpliva na aktivacijo TLR5 (Eaves-Pyles in sod., 2001). Zaradi pomembnosti flagelina pri aktivaciji prirojene imunosti, smo se odločili podrobnejše preučiti mehanizem aktivacije inflamasoma s flagelinom.

Tekom magistrske naloge smo se lotili produkcije in izolacije proteina bakterijskega bička-flagelina. Z izoliranimi proteini smo pokazali internalizacijo flagelina in njegovo stimulacijsko učinkovitost ozziroma aktivacijo znotrajceličnega multiproteinskega kompleksa NAIP/NLRC4. Videti je, kot da se flagelin zapakira v znotrajcelične vezikle, ali pa vidimo lokalizacijo flagelinskih monomerov na multiproteinskem kompleksu inflamasoma.

Ugotovili smo razlike v stimulaciji med različnimi flagelini divjega tipa ter kako posamezne spremembe aminokislin v CD0 regiji vplivajo na stimulacijo inflamasoma z merjenjem izločanja IL-1 β in zaznavanjem aktivirane kaspaze-1.

Kot testne celice smo uporabili makrofage divjega tipa ter makrofage, ki so imeli izbit gen za inflamasom NLRC3. Ker se inflamasom NLRC3 ne odziva na flagelin, smo pri obeh celičnih linijah pročakovali enake rezultate. Pri rezultatih vseeno vidimo manjša odstopanja pri koncentraciji izločenega interlevkina. Pogosteje je odziv pri NLRC3 $^{-/-}$ manjši, vendar je trend odziva pri obeh linijah enak. Manjšo občutljivost makrofagov NLRC3 $^{-/-}$ lahko pripisemo temu, da je pri makrofagih divjega tipa prisoten inflamasom NLRC3, ki se odziva

na reagent DOTAP, ki smo ga uporabljali za vnos proteinov v celice. Pri optimizaciji uporabljenih količin flagelina

in reagenta smo namreč opazili, da daljša inkubacija celic z reagentom povzroči povečanje odziva. Poleg tega NLR proteini pogosto delujejo sinergistično (Vance, 2015), torej se lahko ob daljši stimulaciji celic v umetnem sistemu vklopijo tudi drugi inflamasomski kompleksi. Pri stimulaciji inflamasoma s flagelini divjega tipa opazimo očitne razlike pri aktivaciji inflamasoma. V primerjavi s flagelinom bakterije *Salmonella typhimurium* je odziv pri stimulaciji s flagelinom bakterije *Escherichia coli* več kot polovico manjši. Za flagelin bakterije *E. coli* je znano, da povzroči imunski odziv (Yang in sod., 2014). Odstotek homologije v 35 aminokislinskih ostankih CD0 regiji med flagelinoma teh dveh bakterijskih vrst je majhen, čemur pripisujem razliko v odzivu inflamasoma. Razlog za to je lahko dejstvo, da je *E. coli* pogost črevesni komenzalni organizem pri sesalcih, zato je smiselno, da ima imunski sistem nanj tolerančni odziv. Flagelin bakterije *Helicobacter pylori* ne povzroči procesiranja IL-1 β , povzroči pa aktivacijo inflamasoma NAIP/NLRC4 oziroma fosforilacijo serinskega aminokislinskega ostanka na mestu 533 v molekuli NLRC4 (Matusiak in sod., 2015). Kljub večjemu odstotku homologije flagelinov *Salmonelle typhimurium* in *Helicobacter pylori* v CD0 regiji, nismo pričakovali podobnih rezultatov. Bakterija naseljuje zelo ozko ekološko nišo človeškega želodca in se uspešno izmika imunskemu sistemu (Algood in Cover, 2006). Bližnji sorodnik *Campylobacter jejuni* prav tako ne povzroči aktivacije NLRC4 (Bouwman in sod., 2014).

Pri stimulaciji s himernim proteinom SaTyCD0HePy, kjer smo 35 aminokislinskih ostankov CD0 regije flagelina bakterje *S. typhimurium* zamenjali s 35 aminokislinskimi ostanki flagelina bakterije *H. pylori*, pričakovano ni bilo procesiranja IL-1 β . S tem smo potrdili, že objavljene rezultate iz literature (Lightfield et al., 2008), da je za aktivacijo NLRC4 pomembna CD0 regija flagelina.

Amnokisline v t.i. povezovalni (ang. »spoke«) regiji flagelina, D455, D457 in Y458 vplivajo na aktivacijo inflamasoma. Aminokislini D455 in D457 nista imeli velikega vpliva na zmanjšanje aktivacije, aminokislina Y458 pa je v večji meri zmanjšala aktivacijo. Zvitje flagelina bi bil lahko vzrok za aktivnosti. Na podlagi tega sklepamo, da ima konformacijska sprememba »spoke« regije flagelina z alaninsko mutagenezo na mestu 458 večji vpliv na vezavo z inflamasomskim kompleksom NAIP/NLRC4 in s tem na njegovo aktivacijo.

Aminokislinski ostanki T476, L479, Q484 in P486 nepomembno vplivajo na zmanjšanje aktivacije inflamasoma, torej za njegovo stimulacijo niso esencialne. Pri makrofagih divjega tipa opazimo večji vpliv na aktivacijo pri stimulaciji z mutanto T467A, pri makrofagih *Nlrc3^{-/-}* pa je ta razlika manjša. Ker je trend aktivacije enak pri obeh linijah, menimo, da točkovna mutacija na tem mestu nima večjega pomena za stimulacijo inflamasoma.

V začetnem delu CD0 regije so za aktivacijo inflamasoma pomembni trije levcinski aminokislinski ostanki na mestih 490, 492 in 493 (Lightfield in sod., 2011). Zmanjšano aktivnost smo pokazali z mutantom sub_VLSLL_5A, kjer smo aminokisline od mesta 489 do 493 zamenjali z alanini. Aktivacija inflamasoma se je zmanjšala za več kot polovico. Da smo pokazali vlogo serina na mestu 491, smo pripravili mutant S491A. Pripravili smo tudi mutant, kjer smo mutanti sub_VLSLL_5A povrnili serin na mesto 491. Omenjena mutanta ni aktivirala inflamasoma, kar potrjuje, da so za aktivacijo pomembni V, L in LL (Lightfield in sod., 2011).

Z zamenjavo R na mestu 494 smo potrdili, da aminokislina pomembno vpliva na aktivacijo inflamasoma. Iz kartiranja pomembnosti aminokislin za aktivacijo inflamasoma smo potrdili pomembno regijo skrajne C terminalnega dela flagelina. Najpomembnejše so hidrofobne aminokisline (*H. pylori*) in skrajni pozitivno nabiti aminokislinski ostanek *S. typhimurium*. Končna aminokislina v flagelinu bakterije *E.coli* je glicin, kar je verjetno razlog za delno zmanjšanje aktivacije inflamasoma NLRC4.

6 SKLEPI

- Flagelin bakterije *Escherichia coli* sproži imunski odziv oziroma aktivacijo NAIP5/NLRC4 inflamasoma, vendar v manjši meri kot flagelin bakterije *Salmonella typhimurium*. *E. coli* je del normalne mikrobiote in se je nanjo verjetno razvil tolerančni odziv, hkrati pa inflamasom predstavlja mehanizem omejitve širjenja bakterij v našem telesu in razlikovanje med škodljivimi in komentalnimi organizmi.
- Flagelin bakterije *Helicobacter pylori* ne povzroči zorenja kaspaze-1 in procesiranja IL-1 β , kar je eden izmed ključnih razlogov za uspešno izmikanje gostiteljevemu imunskemu odzivu.
- Ključna regija za stimulacijo inflamasoma je evolucijsko ohranjen začetni del CD0 regije, kar vidimo pri alaninski mutanti sub_VLSLL_5A in ostalih mutantah v tej regiji.
- Alaninske mutante v povezovalni (ang. »spoke«), razen mutante na mestu 458, regiji flagelina, kot tudi mutante v alfa helični regiji, nimajo signifikantnega vpliva na aktivacijo inflamasoma, saj opazimo le delno zmanjšanje odziva v primerjavi z odzivom pri stimulaciji s flagelinom bakterije *Salmonella typhimurium*.

7 POVZETEK

Inflamasom ima osrednjo vlogo pri delovanju imunskega sistema, saj s svojo aktivacijo povzroči procesiranje pro-interleukina-1 β , ki deluje kot medcelična signalizacijska molekula. Poznamo več inflamasomov, ki se odzivajo na različne organizemu nevarne molekule. Med pomembnejše sodi NAIP/NLRC4, ki prepoznavata bakterijski protein bička, flagelin. Zato smo se tekom magistrskega dela lotili natančnejše analize aktivacije NAIP/NLRC4 s flagelini divjega tipa ter z alaninskim mutantami flagelina. Flagelinsko mutagenezo smo naredili s pomočjo molekularne tehnike kloniranja (lepljenje po Gibsonu). Z dodatkom histidinskega in steptavidinskega repka na proteine smo proteine izolirali s pomočjo afinitetne kromatografije in njihovo čistost preverili s poliakrilamidno elektroforezo. Z izoliranimi proteini smo nato stimulirali celično linijo makrofagov divjega tipa in celično linijo makrofagov z izbitimi geni za inflamasom NLRC3, s čimer smo ovrednotili prispevek NLRC3. Za izvedbo eksperimenta smo celice predstimulirali z LPS, nato pa smo jih stimulirali z različnimi flagelini. Ob aktivaciji inflamasoma pride do aktivacije kaspaze-1, ki cepi pro-interlevkin-1 β v aktivno obliko, ki se izloča iz celice. S testom ELISA smo potrdili prisotnost aktivnega IL-1 β v celičnem mediju, s pomočjo prenosa po Westernu pa smo potrdili prisotnost aktivne kaspaze-1. Izhodna hipoteza, da je za aktivacijo inflamasoma ključna CD0 domena flagelina, je potrjena. Ob primerjavi flagelinov divjega tipa smo potrdili, da flagelin bakterije *Helicobacter pylori* ne inducira aktivacije inflamasoma, ugotovili pa smo tudi, da flagelin bakterije *Escherichia coli* v manjši meri vpliva na aktivacijo. Najpomembnejše so hidrofobne aminokisline (*H. pylori*) in skrajni pozitivno nabiti aminokislinski ostanek *S. typhimurium*. Končna aminokislina v flagelinu bakterije *E. coli* je glicin, kar je verjetno razlog za delno zmanjšanje aktivacije inflamasoma NLRC4. Z alaninsko mutagenezo smo identificirali posamezne aminokisline, ki so ključne pri aktivaciji inflamasoma. To je aminokislina Y458 v povezovalni regiji flagelina ter aminokislino začetnega CD0 regije flagelina. Pri mutantah sub_VLSLL_5A, S491A_povrnjena, je opaziti močno zmanjšanje aktivacije, kar potrjuje pomembnost levcinskih aminokislinskih ostankov v tej regiji pri aktivaciji inflamasoma ter kaže na to, da serin na mestu 491 ni pomemben za aktivacijo inflamasoma. Prav tako je za aktivacijo pomemben aminokislinski ostanek R494. Raziskovanje bakterijskih virulentnih dejavnikov je pomembno za razumevanje patogeneze in zdravljenje bakterijskih okužb.

8 VIRI

- Algood, H. M. S., Cover, T. L. 2006. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 4: 597–613
- Anand, P. K., Malireddi, R. K. S., Lukens, J. R., Vogel, P., Bertin, J., Lamkanfi, M., Kanneganti, T.D. 2012. NLRP6 Negatively Regulates Innate Immunity and Host Defense Against Bacterial Pathogens. *Nature*, 488, 7411: 389–393
- Bouwman, L. I., de Zoete, M. R., Bleumink-Pluym, N. M., Flavell, R. A., van Putten, J. P. 2014. Inflammasome activation by *Campylobacter jejuni*. *J Immunol*, 193,9: 4548–4557
- Broz, P., Dixit, V. M. 2016. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*, 16, 7: 407–420
- Broz, P., Newton, K., Lamkanfi, M., Mariathasan, S., Dixit, V. M., Monack, D. M. 2010. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against *Salmonella*. *The Journal of Experimental Medicine*, 207, 8: 1745–1755
- Broz, P., Von Moltke, J., Jones, J. W., Vance, R. E., Monack, D. M. 2010. Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing. *Cell Host and Microbe*, 8: 471–483
- Chevance, F. F. V., Hughes, K. T. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 6: 455–465
- Dinarello, C. A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology*, 27: 519–50
- Eaves-Pyles, T. D., Wong, H. R., Odoms, K., Pyles, R. B. 2001. *Salmonella* Flagellin-Dependent Proinflammatory Responses Are Localized to the Conserved Amino and Carboxyl Regions of the Protein. *The Journal of Immunology*, 167, 12: 7009–7016
- Fernandes-Alnemri T., Wu J., Yu J.W., Datta P., Miller B., Jankowski W., Rosenberg S., Zhang J., Alnemri E.S. 2007. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation*, 14: 1590–1604
- Feuillet V., Medjane S., Mondor I., Demaria O., Pagni P. P., Galán J. E., Flavell R. A., Alexopoulou L. 2006. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 33: 12487-12492
- Fink, S. L., Cookson, B. T. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic

Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 73, 4: 1907–1916

- Franklin B. S., Bossaller L., De Nardo D., Ratter J. M., Stutz A., Engels G., Brenker C., Nordhoff M., Mirandola S. R., Al-Amoudi A., Mangan M. S., Zimmer S., Monks B. G., Fricke M., Schmidt R. E., Espevik T., Jones B., Jarnicki A. G., Hansbro P. M., Bustos P., Marshak-Rothstein A., Hornemann S., Aguzzi A., Kastenmüller W., Latz E. 2014. The adaptor ASC has extracellular and “prionoid” activities that propagate inflammation. *Nature Immunology*, 15, 8: 727–737
- Gal-Mor, O., Finlay, B. B. 2006. Pathogenicity islands: A molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular Microbiology*, 8, 11: 1707–1719
- Hacker, J., Carniel, E. 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Reports*, 2, 5: 376–381
- Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J.K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 6832: 1099–1103
- Hesker P. R., Nguyen M., Kovarov, M., Ting, J., Koller B. H. 2012. Genetic Loss of Murine Pyrin, the Familial Mediterranean Fever Protein, Increases Interleukin-1b Levels. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0051105. 7, 11: 1-9
- Hornung V., Bauernfeind F., Halle A., Samstad E.O., Kono H., Rock K.L., Fitzgerald K. A., Latz E. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology*, 9, 8: 847–856
- Hu Z., Zhou Q., Zhang C., Fan S., Cheng W., Zhao Y., Shao F., Wang H.W., Sui S. F., Chai J. 2015. Structural and biochemical basis for induced self-propagation of NLRC4. *Science*, 350, 6259: 399–404
- Kayagaki N., Stowe I. B., Lee B. L., O'Rourke K., Anderson K., Warming S., Cuellar T., Haley B., Roose-Girma M., Phung Q.T., Liu P.S., Lill J.R., Li H., Wu J., Kummerfeld S., Zhang J., Lee W. P., Snipas S. J., Salvesen G. S., Morris L. X., Fitzgerald L., Zhang Y., Bertram E. M., Goodnow C. C., Dixit V. M. 2015. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526, 7575: 666–671
- Kofoed, E. M., Vance, R. E. 2011. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature*, 477, 7366: 592–595
- Kofoed, E. M., Vance, R. E. 2012. NAIPs: Building an innate immune barrier against bacterial pathogens: NAIPs function as sensors that initiate innate immunity by detection of bacterial proteins in the host cell cytosol. *BioEssays*, 34, 7: 589–598

- Lamkan® M., Declercq W., Kalai M., Saelens X., Vandenabeele P. (n.d.). 2002. News and Commentary Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell death and differentiation*, <http://doi.org/10.1038/sj/cdd/4400989>: 358–361
- Lamkanfi M., Declercq W., Vanden Berghe T., Vandenabeele P. 2006. Caspases leave the beaten track: Caspase-mediated activation of NF-B. *Journal of Cell Biology*. 173, 165–171
- Lee S. K., Stack A., Katzowitsch E., Aizawa S. I., Suerbaum S., Josenhans C. 2003. Helicobacter pylori flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes and Infection*, 5, 15: 1345–1356
- Levinsohn J. L., Newman Z. L., Hellmich K.A., Fattah R., Getz M. A., Liu S., Sastalla I., Leppla S. H., Moayeri M. 2012. Anthrax Lethal Factor Cleavage of Nlrp1 Is Required for Activation of the Inflammasome. *PLoS Pathogens*, 8, 3: 1-7
- Lightfield K. L., Persson J., Brubaker S. W., Witte C. E., von Moltke J., Dunipace E. A., Henry T., Sun Y. H., Cado D., Dietrich W. F., Monack D. M., Tsolis R. M., Vance R. E. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by conserved carboxy-terminal domain of flagellin. 2008. *Nature Immunology*, 9, 10: 1171–1178
- Lightfield K. L., Persson J., Trinidad N. J., Brubaker S. W., Kofoed E. M., Sauer J. D., Dunipace E. A., Warren S. E., Miao E. A., Vance R. E. 2011. Differential requirements for NAIP5 in activation of the NLRC4 inflammasome. *Infection and Immunity*, 79,4: 1606–1614
- Man S. M., Kanneganti T .D. 2015. Regulation of inflammasome activation. *Immunological Review*, 265, 1: 6–21
- Mariathasan S., Weiss D. S. Newton K., McBride J., O'Rourke K., Roose-Girma M., Lee W. P., Weinrauch Y., Monack D.M., Dixit V. M. 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440, 7081: 228–232
- Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J. 2002. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-β. *Molecular Cell*, 10, 2: 417–426
- Matusiak, M., Van Opdenbosch, N., Vande Walle, L., Sirard, J. C., Kanneganti, T.D., Lamkanfi, M. 2015. Flagellin-induced NLRC4 phosphorylation primes the inflammasome for activation by NAIP5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 5: 1541–1546
- Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449, 7164: 819–826

- Miao E.A., Leaf I.A., Treuting P. M., Mao D. P., Dors M., Sarkar A., Warren S. E., Wewers M. D., Aderem A. 2010. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nature Immunology*, 11, 12: 1136–1142
- Monteleone M., Stow J. L., Schroder K. 2015 Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine*, 74: 213–218
- Nagai H., Cambronne E. D., Kagan J. C., Amor J. C., Kahn R. A., Roy C. R. 2005. A C-terminal translocation signal required for DotIcm-dependent delivery of the Legionella RalF protein to host cells. *PNAS, Proceedings in National Academy of Sciences USA*; 102: 826–883
- Netea M.G.; Nold-Petry C. A., Nold M. F., Joosten L. A., Opitz B., van der Meer J. H., van de Veerdonk F. L., Ferwerda G., Heinrichs B., Devesa I. 2009. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 in monocytes and macrophages. *Blood*, 113: 2324–2335
- Ottemann, K. M., Miller J. F. 1997. Roles for motility in bacterial – host interactions. *Molecular Microbiology*, 24, 6: 1109–1117
- Pillaa D. M., Hagarb J. A., Haldara A. K., Masonc A. K., Degrandid D., Pfefferd K., Ernstc R. K., Yamamotoe M., Miaob E. A., Coersa J., 1. 2014. Guanylate binding proteins promote caspase-11– dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *PNAS*, 111, 16: 6046-6051
- Ramos H. C., Rumbo M., Sirard J.C. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in Microbiology*, 12, 11: 509–517
- Samatey F. A., Imada K., Nagashima S., Vonderviszt F., Kumazaka T., Yamamoto M., Namba K. 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 410, 6826: 331–337
- Tenthorey J. L., Kofoed E. M., Daugherty M. D., Malik H. S., Vance, R. E. 2014. Molecular basis for specific recognition of bacterial ligands by NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Molecular Cell*. 54, 1: 17–29
- Turvey S. E., Broide D. H., ChB, M. (n.d.). 2010. Chapter 2: Innate Immunity. *J Allergy Clinical Immunology*, doi:10.1016/j.jaci.2009.07.016, 17
- Vance R. E. 2015. The NAIP/NLRC4 inflammasomes. *Current Opinion in Immunology*, 32: 84–89
- Vance R. E., Isberg R. R., Portnoy D. A. 2009. Patterns of Pathogenesis: Discrimination of Pathogenic and Nonpathogenic Microbes by the Innate Immune System. *Cell Host and Microbe*, 6: 10–21

- von Moltke J., Ayres J. S., Kofoed E. M., Chavarría-Smith J., Vance R. E. 2013. Recognition of Bacteria by Inflammasomes. *Annual Review of Immunology*, 31, 1: 73–106
- Warrington R., Watson W., Kim H. L., Antonetti F. 2011. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma, Clinical Immunology*, 7: 1-8
- Wright E. K., Goodart S. A., Gowney J. D., Hadinoto V., Endrizzi M. G., Long E. M., Sadigh K, Abney A. L., Bernstein-Hanley I., Dietrich W. F. 2003. Naip5 Affects Host Susceptibility to the Intracellular Pathogen *Legionella pneumophila*. *Current Biology*, 13, 1: 27–36
- Yang J., Zhang E., Liu F., Zhang Y., Zhong M., Li Y., Zhou D., Chen Y., Cao Y., Xiao Y., He B, Yang Y., Sun Y., Lu M., Yan H. 2014. Flagellins of *Salmonella Typhi* and Nonpathogenic *Escherichia coli* Are Differentially Recognized through the NLRC4 Pathway in Macrophages. *Journal of Innate Immunity*, 6, 1: 47–57
- Yonekura, K., Maki-Yonekura S., Namba K. 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 424, 6949: 643–650
- Zaki, M. H., Lamkanfi, M., Kanneganti, T. D. 2011. Inflammasomes and intestinal tumorigenesis. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 8 :3-4
- Zhao, Y., Shao, F. 2015. The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Immunological Reviews*, 265, 1: 85–102
- Zhao, Y., Yang, J., Shi, J., Gong, Y.-N., Lu, Q., Xu, H., Liu L., Shao, F. 2011. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature*, 477, 7366: 596–600

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Romanu Jerali za priložnost opravljanja magistrskega dela na Odseku za biotehnologijo in imunologijo.

Zahvaljujem se doc. dr. Mojci Benčina za prevzem mentorstva, hitro in kritično popravo magistrskega dela ter nasvete tekom eksperimentalnega dela.

Vidi Forstnerič se zahvaljujem za vso pomoč in potrežljivost ter neprecenljive nasvete pri eksperimentalnem delu tudi v trenutkih, ko se eksperimenti niso odvijali po načrtih.

Prof. dr. Simonu Horvatu se zahvaljujem za hitro in natančno recenzijo magistrske naloge.

Zahvaljujem se rednim in občasnim prebivalcem Laboratorija za biotehnologijo in imunologijo za krajšanje ur preživetih v laboratoriju ter moralno podporo ob eksperimentih.

Zahvaljujem se staršem in sestri, ki so mi stali ob strani tekom študija in me s prijaznimi besedami vedno vodili v pravo smer.

Zahvaljujem se tudi »mojim« biologom Barbari, Tini, Jerneju in Blažu za nepozabno študijsko in obštudijsko življenje na magistrski stopnji študija.

PRILOGE

PRILOGA A

Nukleotidno zaporedje uporabljenih oligonukleotidnih začetnikov

- pET19b_HIS_F

3' C GAC AAG CAT ATG CTC GAG ATG GCA CAA GTC ATT AAT ACA AAC 5'

- pET19b_HIS_R

3' GT ATT AAT GAC TTG TGC CAT CTC GAG CAT ATG CTT GTC GTC 5'

- A491S_F

3' GTT CCG CAA AAC GCA GCA TCT GCA GCA CGT TAA GGA TCC GGC TGC TAA
CAA AGC 5'

- A491S_R

3' ACC TCC GTT CTG GCG CAG GCG AAC CAG GTT CCG CAA AAC GCA GCA TCT
GCA GCA 5'

- Strep_pET19b_F

3' TCT GGT TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA TAA GGC TGC TAA CAA AGC
CCG AAA GGA AGC 5'

- Strep_pET19b_R

3' CCG CAA AAC GTC CTC TCT TTA CTG CGT TCT GGT TGG AGC CAC CCG CAG
TTC GAA AAA TAAG 5'

PRILOGA B

Nukleotidna sekvenca flagelina bakterije *Salmonella typhimurium* z dodanim HIS in STREP-tag

ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAG
CATATGCTCGAGATGGCACAAGTCATTAATACAAACAGCCTGTCGCTGTTGACCCAGAATAACCTG
AACAAATCCCAGTCCGCTCTGGCACCAGCTATCGAGCGTCTGTCTCCGGTCTCGTATCAACAGC
GCGAAAGACGATGCGGCAGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTTACCGCGAACATCAAAGGTCTGACT
CAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGTATCTCCATTGCGCAGACCAGTGAAGGCGCGCTGAACGAA
ATCAACACAACACTGCAGCGTGTGCGTAACTGGCGGTTCACTGCTAACAGCACCAACTCCAG
TCTGACCTCGACTCCATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGCCTGAACGAAATCGACCGTGTATCCGGC
CAGACTCAGTTAACGGCGTGAAAGTCCTGGCGCAGGACAACACCCCTGACCATTCCAGGTTGGTGC
AACGACGGTCAAAGTATCGATATCGATCTGAAGCAGATCAACTCTCAGACCCCTGGGCTGGATACG
CTGAATGTGCAACAAAAATATAAGGTAGCGATACGGCTGCAACTGTTACAGGATATGCCGATACT
ACGATTGCTTAGACAATAGTACTTTAAAGCCTCGGCTACTGGTCTGGTGGTACTGACCAGAAA
ATTGATGGCGATTAAAATTGATGATACGACTGGAAAATATTACGCCAAGTTACCGTTACGGGG
GGAACCTGGTAAAGATGGCTATTATGAAGTTCCGTTGATAAGACGAACGGTGAGGTGACTCTGCT
GGCGGTGCGACTTCCCCGCTTACAGGTGGACTACCTGCGACAGCAACTGAGGATGTGAAAATGTA
CAAGTTGCAAATGCTGATTGACAGAGGCTAAAGCCGATTGACAGCAGCAGGTGTTACCGGCAC
AGCATCTGTTGTTAAGATGTCTTAACTGATAATAACGGTAAAATATTGATGGTGGTTAGCAGTT
AAGGTAGGCGATGATTACTATTCTGCAACTCAAATAAAGATGGTCCATAAGTATTAATACTACG
AAATACACTGCAGATGACGGTACATCCAAAATGCACAAACAAACTGGTGGCGCAGACGGCAA
AACCGAAGTTGTTCTATTGGTGGTAAAACCTACGCTGCAAGTAAAGCCGAAGGTACAACATTAA
AGCACAGCCTGATCTGGCGGAAGCGGCTGCTACAACCACCGAAAACCGCTGCAGAAAATTGATG
CTGCTTGGCACAGGTTGACACGTTACGTTCTGACCTGGTGCCTGACAGAACCGTTCAACTCCGC
TATTACCAACCTGGCAACACCGTAAACAAACCTGACTTCTGCCGTAGCCGTATCGAAGATTCCGA
CTACGCGACCGAACGTTCCAACATGTCTCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCT
GGCGCAGGCGAACCAAGGTTCCGAAACCGTC CTCTTTACTGCGT **TGT CGT** **TGG AGC CAC CCG**
CAG TTC GAA AAA TAA

Legenda

- Flagelin bakterije *Salmonella typhimurium*
- His-tag
- Linker
- STREP-tag