



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Blanka CINGL

**PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA  
MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI TLR15**

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Blanka CINGL

**PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA MONOKLONSKIH  
PROTITELES PROTI TLR15**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL  
ANTIBODIES AGAINST TLR15**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes – Biotechnology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnje Biotehnologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v Domžalah.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat in za somentorico asist. dr. Ireno Oven.

Recenzentka: prof. dr. Olgo Zorman Rojs.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: asist. dr. Irena OVEN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Olga ZORMAN ROJS  
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za zdravstveno varstvo perutnine

Datum zagovora:

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

Blanka Cingl

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UDK 577.27(043.2)  
KG imunologija živali/monoklonska protitelesa/receptorji/TLR15  
AV CINGL, Blanka  
SA NARAT, Mojca (mentorica)/OVEN, Irena (somentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2015  
IN PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI TLR15  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija)  
OP IX, 35 str., 7 pregl., 14 sl., 31 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Prirojeni imunski sistem predstavlja prvo linijo obrambe proti okužbam, saj prepozna mikroorganizme in aktivira pridobljeni imunski odziv. Receptorji podobni Toll-u (TLR) so velika skupina receptorjev naravne imunosti. Mikroorganizme prepoznajo tako, da prepoznajo značilne molekulske motive. Vezava liganda na TLR sproži v gostiteljski celici signalno pot, ki aktivira peptide, citokine in kemokine. TLR15 je unikaten receptor, saj so ga doslej našli le pri pticah in so ga prvič odkrili skupaj s ptičjim TLR2, v cekumu piščancev, ki so bili okuženi z bakterijo *Salmonella enterica*. Do nedavnega ligand za TLR15 ni bil znan, zdaj pa je znano, da se z vezavo diacetiliranega peptida aktivirajo značilne poti prirojenega imunskega odziva. Za raziskave strukture in funkcije ter evolucije TLR15, bi bila monoklonska protitelesa zelo dobrodošlo orodje. V magistrski nalogi smo s klasično hibridomsko tehnologijo pripravili monoklonska protitelesa proti podenoti TLR15, sintetičnemu peptidu, ki smo ga poimenovali Peptid 1. Miško smo imunizirali z rekombinantnim proteinom TLR15. Presejalne teste in odbiro klonov smo opravili najprej na podlagi reakcije protiteles z rekombinantnim proteinom TLR15 in nato na podlagi reakcije protiteles s podenotami TLR15, s komercialnimi sintetičnimi peptidi. Te smo izbrali s postopkom napovedovanja epitopov, s programom AbcPred, s katerim smo predvideli, kateri deli TLR15 bi lahko bili nosilci imunogenih epitopov. Naša napoved je bila pravilna samo za enega od štirih peptidov, ki smo ga poimenovali Peptid 1. Ob preverjanju prisotnosti specifičnih protiteles proti Peptidu 1, smo z metodo iDIBA v supernatantu enega od hibridomov zaznali prisotnost monoklonskega protitelesa proti Peptidu 1. Celice klona, ki proizvajajo monoklonska protitelesa proti Peptidu 1 smo poimenovali 5B1/B6.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2  
DC UDC 577.27(043.2)  
CX animal immunology/monoclonal antibodies/receptors/TLR15/  
AU CINGL, Blanka  
AA NARAT, Mojca (supervisor)/ OVEN, Irena (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study in Biotechnology  
PY 2015  
TY PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST TLR15  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes - Biotechnology)  
NO IX, 35 p., 7 tab., 14 fig., 31 ref.  
LA sl  
Al sl/en  
AB Innate immunity provides a first line of host defense against infection through microbial recognition and activating adaptive immune response. Toll-like receptors (TLR) belong to a multigene family that helps to detect foreign invaders by sensing various pathogen-associated molecular patterns. Binding of ligands to TLR activate signal transduction pathways and induce the expression of antimicrobial peptides, cytokines, and chemokines. TLR15 appears to be unique to avian species and was first identified as being up-regulated, together with chTLR2 in the cecum, of chickens after infection with *Salmonella enterica*. Until recently, a ligand for TLR15 was not known. A more recent study reported induction of TLR15 expression and activation of TLR15-mediated immune responses after stimulation with a diacylated lipopeptide. Monoclonal antibodies would be a welcome tool for studying structure and function, and evolution of TLR15. In this master thesis we prepared monoclonal antibodies against subunit of TLR15 (commercial synthetic peptide), named Peptide 1, with classical hybridoma technology. Mouse was immunized with recombinant protein TLR15. Screening test and selection of clones was performed regarding to the reaction of antibodies with recombinant protein TLR15 and later regarding to the reaction of antibodies with subunits of TLR15, with commercial synthetic peptides. With prediction of epitopes of TLR15 with webserver AbcPred, we predicted which peptides are immunogenic epitopes carriers. Our prediction was correct for one of four peptides, named Peptide 1. We continued screening hybridoma supernatants with method iDIBA and in one hybridoma supernatant we detected monoclonal antibody against Peptide 1. Clone cells which are producing monoclonal antibodies against Peptide 1 were named 5B1/B6.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>1</b>
2.1 PRIROJENI IN PRIDOBLJENI IMUNSKI SISTEM .....	1
<b>2.1.1 Prirojeni imunski sistem pri ptičih</b> .....	<b>2</b>
2.2 RECEPTORJI PODOBNI TOLLU (TLR) .....	3
<b>2.2.1 Zgradba TLR</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2.3 Signalna pot TLR</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2.4 Evolucija TLR</b> .....	<b>4</b>
2.3 TLR15 .....	5
<b>2.3.1. Filogenija TLR15</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3.2 Zgradba TLR15</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3.3 Ligandi TLR15</b> .....	<b>6</b>
2.4 NAPOVEDOVANJE EPITOPOV .....	7
<b>2.4.1 Napovedovanje B celičnih epitopov</b> .....	<b>8</b>
2.5 PROTITELESA .....	9
<b>2.5.1 Poliklonska protitelesa</b> .....	<b>10</b>
<b>2.5.2 Monoklonska protitelesa</b> .....	<b>10</b>
2.6 MONOKLONSKA PROTITELESA V RAZISKOVALNEM DELU .....	12
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>13</b>
3.1 PRIPRAVA ANTIGENA ZA IMUNIZACIJO IN TESTIRANJA .....	13
<b>3.1.1 Sintetični peptidi TLR15</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1.2 Metoda ABCpred</b> .....	<b>14</b>
3.2 PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI TLR15 .....	14
<b>3.2.1 Imunizacija</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2.2 Izolacija vranice, priprava vraničnih in mielomskih celic za fuzijo</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2.3 Fuzija</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2.4 Kloniranje</b> .....	<b>15</b>
3.3 ODBIRA SPECIFIČNIH PROTITELES .....	16
<b>3.3.1 SDS-PAGE elektroforeza</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3.2 Prenos po Westernu</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3.3 Imunodetekcija</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3.4 Indirektni encimskoimunski test - iDIBA</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3.5 Encimskoimunska metoda – ELISA</b> .....	<b>19</b>
<b>4 REZULTATI</b>	<b>21</b>

4.1 SPECIFIČNA PROTITELESA V SUPERNATANTIH HIBRIDOMOV .....	21
<b>4.1.1 Detekcija TLR15 v lizatu <i>E.coli</i> z uporabo SDS-PAGE in prenosom po Westernu .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1.2 iDIBA .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.3 ELISA .....</b>	<b>27</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>29</b>
<b>6 POVZETEK</b>	<b>32</b>
<b>7 VIRI</b>	<b>33</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Primerjava prisotnosti oziroma odsotnosti receptorjev TLR pri različnih organizmih (Kasamatsu, 2013: 7). .....	4
Preglednica 2: Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih hibridomov. ....	23
Preglednica 3: Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih klonov 2C11, 5B1 in 5D3. ....	24
Preglednica 4: Preverjanje reakcije protiteles s sintezniimi peptidi. ....	25
Preglednica 5: Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti Peptidu 1 v supernatantih hibridomov iz plošč PL 1, 2, 3, 4 in 6. ....	26
Preglednica 6: Preverjanje prisotnosti monoklonskih protiteles proti Peptidu 1 v supernatantu klona 5B1/B6 pri različnih redčitvah in z različnimi sekundarnimi protitelesi. ....	27
Preglednica 7: Rezultati testa ELISA supernatantov plošč 1, 2, 3, 4 in 6 s Peptidi 1, 2, 3 in 4. ....	28



## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Filogenetska rekonstrukcija ptičjih TLR na podlagi metode, ki temelji na združevanju sosedov («neighbor joinig method») (Alcaide in Edwards, 2011: 1707). ....	5
Slika 2: Zgradba receptorja TLR15. Črn kvadrataek predstavlja transmembransko domeno (Higgs in sod., 2005: 1695).....	6
Slika 3: Model aktivacije TLR15 (Zoete in sod., 2011: 4972). ....	7
Slika 4: Zgradba imunoglobulina: L = lahka veriga; H = težka veriga; V <sub>L</sub> in V <sub>H</sub> = vezišče za antigen (Vozelj, 2000).....	9
Slika 5: Hibridizacija celic (Vozelj, 2000).....	11
Slika 6: Izvedbene različice imuno-encimskih testov za določanje antigenov (substrat je lahko npr. hrenova peroksidaza) (Abnova, 2015).....	12
Slika 7: Nanos antigena (3 µl na kvadrataek) na membrano. ....	18
Slika 8: Spiranje trakcev membrane v PBS s 0,05% (v/v) Tween-20.....	19
Slika 9: Proteinski profil lizata <i>E.coli</i> z TLR15 po barvanju s Coomassie modrim; 1 → velikostni standard. 2 → lizat z TLR15; 3 → lizat brez TLR15. S puščicami sta označeni predvideni mesti, kjer se nahaja TLR15. ....	21
Slika 10: Inkubacija v mišjem serumu in komercialnih poliklonskih kunčjih protitelesih: 1 → velikostni standard; 2 → lizat z TLR15 v serumu; 3 → lizat brez TLR15 v serumu; 4 → lizat z TLR15 v poliklonskih protitelesih; 5 → lizat brez TLR15 v poliklonskih protitelesih;.....	22
Slika 11: Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih hibridomov iz PL5; 1 → velikostni standard, 2 → 5B5, 3 → 5B1. S puščicama sta označeni predvideni mesti TLR15 pri molskih masah 48-63 kDa in 100-135 kDa... 23	23
Slika 12: Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih klonov PL5; 1 → velikostni standard, 2 → 5B1/A4, 3 → 5B1/B6. S puščicama sta označeni predvideni mesti TLR15. ....	24
Slika 13: Barvanje Ag (peptida 1) z barvilom Coomassie modrim. ....	25
Slika 14: Ovrednotenje različno močnega obarvanja pri vezavi protiteles proti TLR15 na Peptid 1. ....	25

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APC	Antigen predstavitvena celica (ang. »antigen presenting cell«)
CD80	Ko-stimulatorne molekule (ang. »cluster of differentiation«)
CpG	Dvonukleotidni motiv citozina in gvanina (ang. »cytosine-phosphate-Guanosine«)
Da	Dalton, enota za molekulsko maso
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Encimsko imunski test (ang. »enzyme-linked immunosorbent assay«)
T <sub>H</sub> 1	Diferenciacija naivnih celic T pomagalk (angl. »T-helper cells«) v fenotip 1
T <sub>H</sub> 2	Diferenciacija naivnih celic T pomagalk (angl. »T-helper cells«) v fenotip 2
PAM3CSK4	Triacil lipopeptid (ang. »triacylated lipoprotein«)
HAT	Medij, ki vsebuje hipoksantin, aminopterin in timidin
HCS	Visoko ohranjeni segmenti (ang. »highly conserved segments«)
iDIBA	Indirektni encimsko imunski test (ang. »indirect dot immunobinding assay«)
IKK	Inhibitorna kapa B kinaza (ang. »I $\kappa$ B kinase«)
Ig	Imunoglobulin (IgG je, na primer, imunoglobulin G oziroma protitelo IgG)
IRAK	Kinaza, povezana z receptorjem IL-1 (ang. »IL-1 receptor-associated kinase«)
kDa	Kilo Da (1000 Da)
Konc.	Koncentracija
LPS	Lipopolisaharid (endotoksin)
LRR	Z levcinom bogata ponovitev (ang. »leucine-rich repeat«)
Mal/TIRAP	Adapterski protein podoben MyD88 (ang. »MyD88-adaptor-like/TIR domain containing adaptor molecule«)
MyD88	Diferencijski mieloidni protein 88 (ang. »myeloid differentiation primary response protein 88«)
NF- $\kappa$ B	Jedrni faktor $\kappa$ B (ang. »nuclear factor $\kappa$ B«)
ODN	Oligodeoksinukleotid
PAMP	Molekulski motiv, značilen za patogene mikroorganizme (ang. »pathogen-associated molecular pattern«)
PRR	Receptor za prepoznavanje patogenih motivov (ang. »pattern recognition receptor«)
RAG	Rekombinacije aktivirajoči gen
RNK	Ribonukleinska kislina
TIR	Domena Toll-interlevkanskega receptorja (ang. »Toll-interleukin receptor domain«)
TLR	Tollu-podoben receptor (ang. »Toll-like receptor«)
VS	Variabilni segmenti

## 1 UVOD

Sposobnost organizma, da lahko zazna prisotnost mikroorganizmov oziroma telesu tujih substanc, je ključna za preživetje. V ta namen so se v evoluciji razvile receptorske molekule, proteini, ki prepoznajo mikrobne molekule. Ob vezavi za mikrobe značilnih molekul na receptorske molekule naravne imunosti, se sprožijo v celicah gostitelja signalne poti, ki aktivirajo imunski odziv. Skupina receptorjev prirojenega imunskega sistema, ki prepoznajo molekularne motive, značilne za mikroorganizme, so tudi receptorji podobni Tollu (toll like receptors, TLR) (Zoete in sod., 2011).

Poznamo več receptorjev TLR, eden izmed njih je receptor TLR15, ki je bil doslej opisan samo pri pticah, dokazan pa samo pri kokoših. Evolucija tega receptorja ni znana in je predmet raziskav. Domneva je, da TLR15 nadomešča nekatere receptorje, ki jih najdemo pri sesalcih, ptice pa jih nimajo in jih nadomešča TLR15 in verjetno predstavlja funkcionalni homolog sesalskim TLR2. Vloga ali celo evolucijski razvoj receptorja TLR15 je lahko povezan z zaščito pred patogeni, katerih preferenčni gostitelji so ptice. Zgradba TLR15 je enaka značilni zgradbi receptorjev TLR. Funkcije in delovanje receptorja TLR15 so slabo raziskane. Za proučevanje funkcije in evolucije molekul so izjemnega pomena monoklonska protitelesa. Po podatkih, zbranih v literaturi, so na voljo le poliklonska protitelesa, ki prepoznajo TLR15, vendar dajejo reakcije tudi z drugimi proteini. Monoklonska protitelesa, specifična za TLR15, bi omogočila nadaljnje raziskave na tem področju, jih pa po dostopnih podatkih še ni.

### 1.1 NAMEN DELA

Priprava in karakterizacija monoklonskih protiteles proti receptorju TLR15, ki bodo uporabna za evolucijske študije, za raziskave delovanja TLR15 in interakcije z ligandom.

Predpostavljali smo, da je protein, receptor TLR15, ali vsaj njegove podenote, za miške imunogene molekule in bodo zato aktivirale pridobljeni imunski odziv in v okviru tega limfocite B. Pričakovali smo, da bomo s standardno metodo pridobivanja monoklonskih protiteles (mAb) uspeli pridobiti več različnih mAb, ki bodo specifično reagirali s TLR15.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PRIROJENI IN PRIDOBLENJI IMUNSKI SISTEM

Organizmi so proti okužbam z mikroorganizmi razvili različne obrambne mehanizme, ki jih lahko razdelimo v dve skupini: prirojeni in pridobljeni imunski odziv. Prirojeni imunski sistem je evolucijsko starejši kot pridobljeni in je univerzalna oblika obrambe proti patogenim organizmom. Najdemo ga pri vseh mnogoceličnih organizmih, ki so jih preučili. Več kot 98% mnogoceličarjev se pri obrambi proti okužbam z mikrobi zanaša izključno na prirojeni imunski sistem (Medzhitov, 2008).

Prirojeni imunski odziv deluje z različnimi mehanizmi, ki imajo različno vlogo pri obrambi proti antigenom: s površinskim epitelijem, fagocitozo, sistemom komplementa, s proteini akutne faze, celicam naravnim ubijalkam, z eozinofilci, bazofilci, mastociti in z drugimi. Nekateri od teh mehanizmov so se razvili neodvisno eden od drugega in se pojavljajo na različnih stopnjah filogenetskega razvoja organizmov, medtem ko so drugi prisotni pri vseh mnogoceličarjih. Nekateri mehanizmi so funkcionalno povezani, medtem ko drugi delujejo sami (Medzhitov, 2008).

Pridobljeni imunski sistem najdemo samo pri čeljustnih vretenčarjih, njegov razvoj pa naj bi bil posledica prisotnosti rekombinacije aktivirajočega gena (RAG), ki se je pojavil pri skupnem predniku vretenčarjev (Medzhitov, 2008). V predhodnih celicah B in nezrelah celicah B so opredelili RAG-1 in RAG-2, ki sinergistično vzpodbujata rekombinacijo imunoglobulinskih genov. Ko celice B dozori in se konča preurejanje, ta gena ne delujeta več. Sta koristna označevalca nezrelah celic B (Vozelj, 2000).

Največja razlika med prirojenim in pridobljenim imunskim sistemom je v mehanizmu delovanja in v prepoznavanju antigena oz. tarče. Pridobljeni imunski sistem lahko prepoznava ogromno število različnih antigenov zaradi velikega nabora za antigen specifičnih receptorjev, medtem ko prirojeni imunski sistem prepoznava omejeno število različnih antigenov. Prirojeni imunski sistem se zanaša na receptorje, ki so zapisani v zarodni liniji. S temi receptorji gostiteljski organizmi zaznajo nekatere strukture, ki so prisotne na številnih mikrobih. Pri pridobljenem imunskem sistemu za antigen specifične receptorje izražajo telesne celice, ki pripadajo celicam imunskega sistema. Pridobljeni imunski odziv deluje s časovnim zamikom, je specifičen in ustvarja imunski odziv. Pri prirojenem imunskem odzivu so obrambni mehanizmi vedno prisotni, jih ni potrebno aktivirati, zato je prirojeni imunski odziv takojšen, vendar je manj specifičen (Medzhitov, 2008).

Osnovna funkcija imunskega odziva je ločevanje med telesu lastnimi in tujimi (antigenimi) molekulami. Ločevanje temelji na prepoznavanju molekulskih motivov značilnih za patogene mikroorganizme (angl. beseda, PAMP), za katere je značilno, da jih gostitelj ne sintetizira. Pogosta značilnost molekul PAMP je, da imajo pomembno fiziološko vlogo in so esencialni za preživetje mikroorganizma, kar pomeni, da bi bila izguba, inaktivacija ali mutacija tega motiva letalna ali bi vsaj močno neugodno vplivala na preživetje mikroorganizma (Medzhitov, 2008).

### **2.1.1 Prirojeni imunski sistem pri ptičih**

Imunski sistem ptičev predstavlja neprecenljiv model za preučevanje osnov imunologije, še posebej veliko raziskav izvajajo na udomačeni kokoši *Gallus gallus domesticus*. Ptiči in sesalci so se razvili iz skupnega prednika pred več kot 200 milijoni let in so zato nasledili podoben imunski sistem (Davison, 2008).

Prirojeni imunski odziv pri ptičih uravnavajo levkociti (heterofilci in makrofagi). Ptičji makrofagi imajo pomembno regulatorno vlogo pri imunskem odzivu, saj so prisotni v telesnih

tekočinah in tkivih ptičev in lahko izločajo širok spekter vnetnih mediatorjev in citokinov, podobno kot makrofagi pri sesalcih (Ciraci in Lamont, 2011). Poglavitna funkcija pa je prepoznavanje tujkov preko receptorjev naravne imunosti.

Pomembno vlogo pri prepoznavanju molekularnih motivov pri prirojenem imunskem sistemu imajo poleg drugih tudi TLR.

## 2.2 RECEPTORJI PODOBNI TOLLU (TLR)

Receptorje TLR so odkrili v mnogo celicah (makrofagih, heterofilcih in celicah B), kjer uravnavajo odziv gostitelja na antigene s spodbujanjem celične aktivacije in sinteze citokinov in kemokinov (Paul in sod., 2013). Predstavljajo vez med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom. Prvotno so jih odkrili pri vretenčarjih kot homologe transmembranskega proteina Toll, ki je pri vinski mušici *Drosophila melanogaster* pomemben pri embrionalnem razvoju, hkrati pa povezuje mehanizme prirojenega imunskega sistema (Higgs in sod., 2006).

### 2.2.1 Zgradba TLR

TLR so sestavljeni iz zunajcelične domene, transmembranskega dela in iz citosolne signalne domene toll/interleukin-1 (TIR). S kristalografskimi študijami zunajceličnih domen so ugotovili, da imajo receptorji TLR zgradbo v obliki konjskega kopita (Alcaide in Edwards, 2011). Poleg naštetega imajo receptorji TLR z levcinom bogate ponovitve (LRR), s katerimi prepoznavajo različne molekule. LRR ponovitve so sestavljene iz visoko ohranjenih (HCS) in variabilnih segmentov (VS) (Matsushima in sod., 2007).

Pri sesalcih so odkrili 13 različnih TLR (TLR1-13), ki prepoznavajo različne ligande, medtem ko so jih pri pticah odkrili 10 (Brownlie in Allan, 2011). Podrobneje so opisani pod točko 2.2.4.

Pri ptičih je najbolj obilno izražanje genov za protein TLR15 v kostnem mozgu in Fabricijevi bursi, ki nista povezana s primarno obrambno funkcijo, ampak z razvojem limfocitov. Nekoliko nižje izražanje mRNA TLR15 je v vranici, ki ima primarno imunološko funkcijo. Najmanj prepisov tega receptorja je v jetrih, tankem črevesu in cekumu (Higgs in sod., 2006).

### 2.2.3 Signalna pot TLR

Pomemben del prirojenega imunskega sistema je signalna pot TLR. Dokazali so jo pri različnih vrstah, od členonožcev do višjih primatov, tudi pri ljudeh. Ocenjujejo, da je signalna pot TLR stara vsaj 900 milijonov let in je skozi leta ohranila svojo funkcijo, torej v njej delujejo visoko ohranjeni proteini. Ob preučevanju genoma strunarjev so ugotovili, da se pojavljajo taksonomsko specifične razlike med določenimi komponentami signalne poti TLR (Cormican, 2009).

Vezava TLR na ligand sproži dimerizacijo receptorja, kar omogoči domeni TIR, da deluje na adaptorske proteine, kot so MYD88, Mal, TRAM in/ali TRIF. Z nadaljnjim signaliziranjem se v jedru aktivirajo translokacijski in transkripcijski faktorji NF- $\kappa$ B in/ali IRF3. Sproži se izločanje citokinov in drugih mediatorjev imunskega odziva (Zoete in sod., 2011). Ti povzročijo zorenje antigen predstavitvenih celic (APC) in uravnavajo izražanje ko-stimuliratornih molekul CD80 (angl. »cluster of differentiation«, CD) in CD86 (Paul in sod., 2013).

Ligandi TLR-jev lahko preko citokinov vplivajo na diferenciacijo naivnih celic T pomagalk (angl. »T-helper cells«) v fenotip T<sub>H</sub>1 ali T<sub>H</sub>2. Ker je od liganda TLR-jev odvisno kako se bo aktiviral pridobljeni odziv, se organizem bori proti mikrobom značilno po poti, ki je za določen mikrob najbolj učinkovita (Paul in sod., 2013).

## 2.2.4 Evolucija TLR

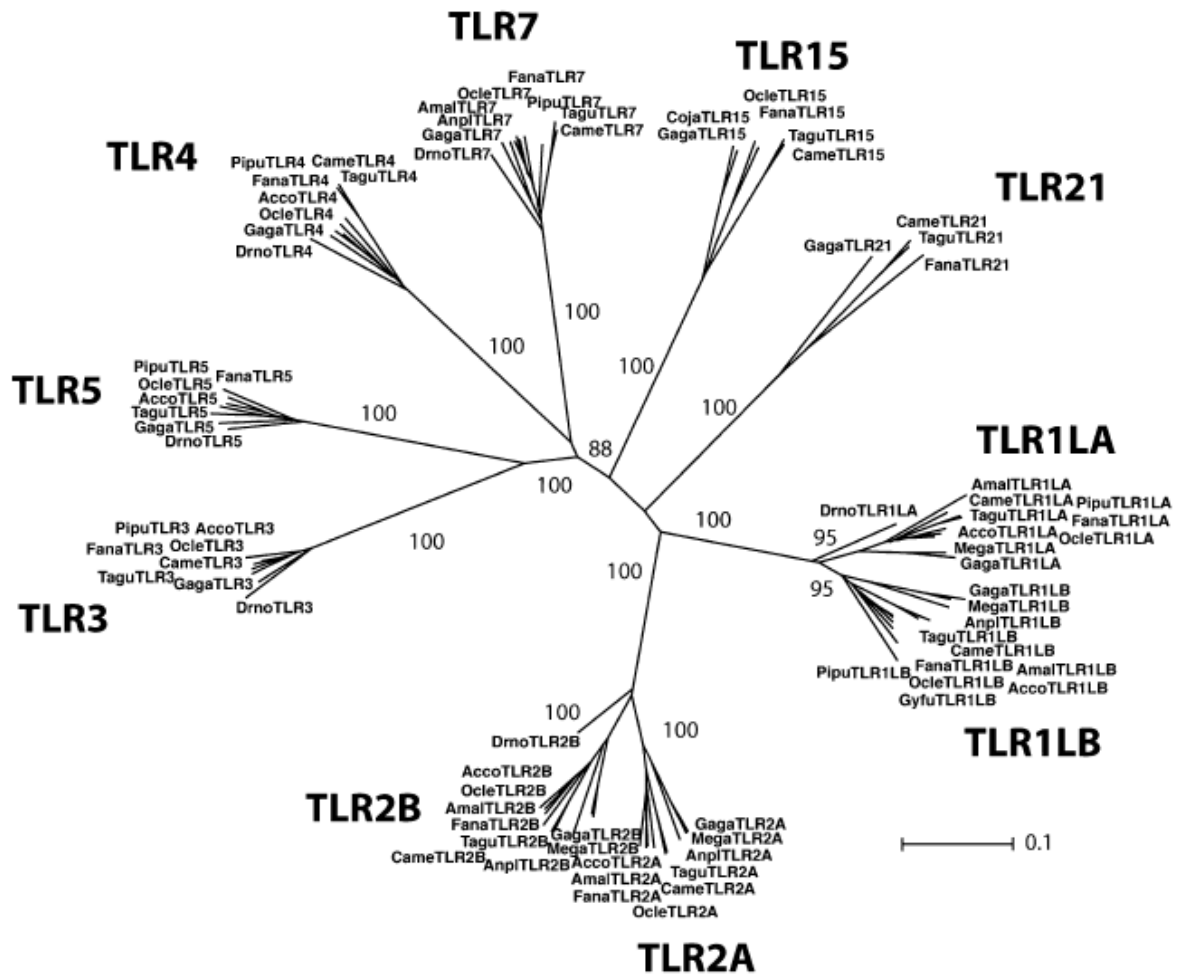
Receptorje TLR lahko filogenetsko razdelimo v skupine TLR, ki se odzivajo na podobne ligande. Večino članov skupine TLR3, TLR4, TLR5 in TLR7/8/9 prepozna virusno DNA, bakterijske LPS, bakterijski flagelin in različne tipe DNA ter RNA. Zanimivo je, da lahko pri ptičih najdemo večino funkcionalnih homologov človeških TLR, čeprav se je razvojna linija ptic odcepila od sesalcev že pred 300 milijoni let (Zoete in sod., 2011).

Pri ptičih so do sedaj opisali 10 TLR, od tega so TLR2a, TLR2b, TLR3, TLR4, TLR5 in TLR7 ortologi tistim, ki jih najdemo pri sesalcih. Ptičji TLR21, ki je pri sesalcih odsoten, je po funkciji homolog sesalskemu TLR9, ki prepozna motive CpG na DNA. V družino ptičjih TLR2 spadajo poleg TLR2a in TLR2b še TLR1La in TLR1Lb ter TLR15. Pri ptičih niso odkrili ortologov sesalskih TLR6 in TLR10 (Oven in sod., 2013).

Preglednica 1: Primerjava prisotnosti oziroma odsotnosti receptorjev TLR pri različnih organizmih (Kasamatsu, 2013: 7).

	Ljudje	Miši	Kokoši	Žabe	Ribe
TLR1	+	+	+	+	+
TLR2	+	+	+	+	+
TLR3	+	+	+	+	+
TLR4	+	+	+	+	+
TLR5	+	+	+	+	+
TLR6	+	+	<i>psd</i>	-	-
TLR7	+	+	+	+	+
TLR8	+	+	-	+	+
TLR9	+	+	-	+	+
TLR10	+	<i>psd</i>	-	-	-
TLR11/12	-	+	-	+	+
TLR13	-	+	-	+	-
TLR14	-	-	-	+	+
TLR15	-	-	+	-	-
TLR21	-	-	+	+	+
TLR22/23	-	-	-	+	+
TLR24	-	-	-	-	-

+ obstaja; - ne obstaja; *psd* pseudogen



Slika 1: Filogenetska rekonstrukcija ptičjih TLR na podlagi metode, ki temelji na združevanju sosedov (»neighbor joining method«) (Alcaide in Edwards, 2011: 1707).

## 2.3 TLR15

### 2.3.1. Filogenija TLR15

TLR15 je osamljen receptor, saj so s filogenetskimi študijami odkrili, da ga zanesljivo ne moremo uvrstiti med nobeno družino receptorjev TLR. TLR15 so odkrili v vseh dostopnih genomih ptičev, delne sekvence pa se nahajajo tudi v genomu plazilcev, odkrili so jih pri kuščarju *Anolis carolinensis*. Ptiči, plazilci in sesalci spadajo v isto taksonomsko skupino (klad) Reptiliomorpha, ki se je odcepila od sestrskega klada Amphibia pred 330-350 milijoni let. Klada Synapsida (sesalci in izumrli predniki) ter Diapsida (plazilci, ptiči in izumrli predniki) sta se odcepila pred 312-330 milijoni let. Filogenetske študije nakazujejo, da je TLR15 nastal z izbrisom podvojenega gena pri predniku TLR1/2 pred 330-260 milijoni let, po odcepitvi klada Raptiliomorpha od Amphibia-e in preden so se odcepili ptiči od plazilcev. Iz tega lahko sklepamo, da predstavlja TLR15 razširitev nabora receptorjev TLR, ki so se pojavljali pri ptičih in plazilcih (Boyd in sod., 2012).

S poravnavo sekvenc znanih človeških in mišjih receptorjev TLR, so TLR15 najprej uvrstili v skupino TLR1/TLR2/TLR6/TLR10, vendar so ugotovili, da TLR15 ni podoben nobenemu

članu skupine, največja podobnost (30,1%) je bila s ptičjim TLR2. Evolucija receptorjev TLR je zelo dinamična, saj so patogeni vretenčarjev kompleksni in se hitro spreminjajo (Higgs in sod., 2006).

TLR15 so z bioinformatičnimi orodji uvrstili na kromosom 3 v ptičjem genomu. Ugotovili so, da je okolica mesta, kjer se nahaja TLR15, zelo podobna človeškemu kromosomu 2 in mišjemu kromosomu 11 (Higgs in sod., 2006).

Ker je TLR15 filogenetsko izoliran, se pojavlja vprašanje ali lahko TLR15 prepozna ligand brez heterodimernega partnerja. Boyd in sod. (2012) v svoji raziskavi nakazujejo tudi to možnost.

### 2.3.2 Zgradba TLR15

TLR15 je glikoprotein. Ko so analizirali sekvenco TLR15, so odkrili, da ima signalno sekvenco, domeno LRR na N-koncu, transmembransko vijačnico (helix) in domeno TIR. Ima tipično zgradbo TLR receptorjev, in sicer v obliki konjskega kopita (Zoete in sod., 2011).



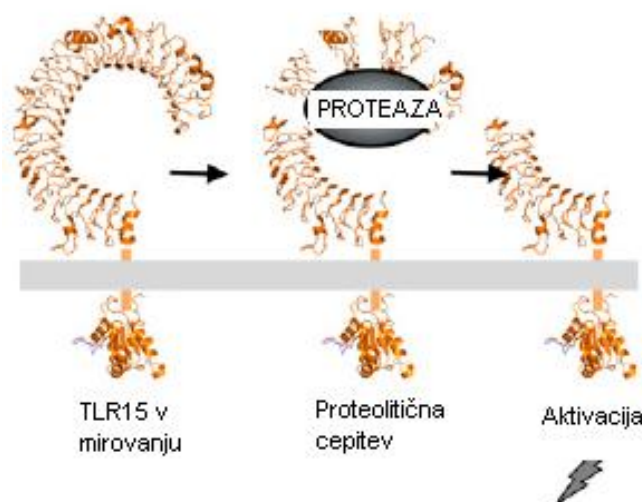
Slika 2: Zgradba receptorja TLR15. Črn kvadrata predstavljata transmembransko domeno (Higgs in sod., 2005: 1695).

### 2.3.3 Ligandi TLR15

Na različne receptorje TLR se lahko vežejo različni ligandi, ki so sestavni deli mikrobnih celic in tako se lahko gostitelj selektivno odzove na različne bakterije, viruse in glive (Zoete in sod., 2011). Ligandi so ohranjeni strukturni motivi na mikroorganizmih (angl. PAMP). Med molekule PAMP spadajo lipolisaharidi, flagelin, lipoproteini, glikolipidi in nukleinske kisline, kateri so virusnega, bakterijskega, parazitskega ali glivnega izvora (Paul in sod., 2013).

TLR15 naj bi po izsledkih Zoete in sod. (2011) prepoznaval proteaze, ki jih izločajo mikrobi, saj je LRR domena receptorja TLR15 občutljiva na proteaze. Proteaze sprožijo proteolitično cepitev TLR15, kar vodi v aktivacijo NF- $\kappa$ B (Zoete in sod., 2011).





Slika 3: Model aktivacije TLR15 (Zoete in sod., 2011: 4972).

Oven in sod. (2013) so odkrili nov ligand za TLR15, in sicer diacetiliran lipopeptid *Mycoplasma synoviae*, ki je pogost kokošji patogen. S sintetičnim diacetiliranim lipopeptidom so uspeli povečati izražanje gena za TLR15, kar je vodilo v aktivacijo NF- $\kappa$ B in izločanje dušikovega oksida (Oven in sod., 2013).

Povečano izražanje genov za protein TLR15 so ugotovili pri piščancih okuženih z živimi in s toploto ali s formalinom inaktiviranimi bakterijami *Salmonella enterica* (Higgs in sod., 2006; Paul in sod., 2013), *Escherichia coli* in *Enterococcus gallinarum* (Nerren in sod., 2010).

Močno povečano izražanje genov za protein TLR15 so odkrili tudi pri piščancih okuženih s parazitom *Eimeria tenella*. Toplotno inaktivirani sporozoiti *E. tenella* so povzročili večji imunski odziv kot živi (Zhou in sod., 2013).

Ciraci in Lemont (2011) sta odkrila povečano izražanje mRNA TLR15 po stimulaciji z CpG-oligonukleotidi (CpG-ODN), triacil lipopeptidi (PAM3CSK4) in lipopolisaharidi (LPS).

Boyd in sod. (2012) so ugotovili, da se TLR15 odziva tudi na kvasovke, natančneje na sestavine celične stene pri kvasovkah. Transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B se je močneje aktiviral, ko so TLR15 izpostavili lizatoma, ki so jih pridobili iz *Candida albicans* ali *Saccharomyces cerevisiae* (Boyd in sod., 2012).

## 2.4 NAPOVEDOVANJE EPITOPOV

Antigenska determinanta ali epitop je del molekule antigena, ki se specifično veže z veziščem za antigen na protitelesu. Antigenska determinanta in vezišče na protitelesu se prostorsko tesno prilegata. Epitop in vezišče povezujejo nekovalentne vezi, npr. vodikove vezi, Van der Waalsove vezi, ipd. Posamezna molekula antigena ima navadno več antigenskih determinant. V proteinih so lahko epitopi kovalentno vezana zaporedja približno 6 aminokislin. Te

determinante so v nativnih proteinih navadno nedostopne in se odkrijejo, če se proteini denaturirajo. Epitopi so odvisni od prostorske strukture. S fosforilacijo ali specifično hidrolizo beljakovin lahko nastanejo novi epitopi, ki jih imenujemo neantigeneske determinante. Epitopi, ki so na molekuli zelo izpostavljeni, so največkrat imunodominantni in so bolj imunogeni kot drugi. Manj izpostavljeni so imunorecesivni, neizpostavljeni epitopi pa so imunsko mirujoči in so neimunogeni (Vozelj, 2000).

Celice B in celice T spoznavajo antigene na bistveno različne načine. Celice B spoznajo topne antigene, ki se vežejo na B celični receptor na membrani limfocita B. To so torej epitopi, ki so dostopna mesta na izpostavljeni površini imunogena. Celice T pa spoznajo peptide iz antigena, predelanega v antigen predstavljajoči celici (Vozelj, 2000). Tako ločimo B celične in T celične epitope. V nadaljevanju se bom osredotočila na B celične epitope, saj smo le-te uporabili pri tej magistrski nalogi.

#### **2.4.1 Napovedovanje B celičnih epitopov**

Glavni cilj napovedovanja celičnih epitopov je ugotoviti, kateri del proteina predstavlja epitop, ki s svojo vezavo na receptorje na celicah B in T, sproži imunski odziv, ki je specifičen za ta epitop. Ta strukturni del molekule lahko nadomesti antigen pri pripravi protiteles. Takšen del proteinske molekule lahko sintetiziramo kemijsko ali z rekombinantno tehnologijo. Sintetizirane molekule so cenejše in ne povzročajo okužb, za razliko od molekul, ki jih proizvedemo v virusih ali bakterijah (Ponomarenko in Regenmortel, 2009).

Epitopi so lahko kontinuirani ali nekontinuirani. Kontinuirani epitopi so sestavljeni iz aminokislin, ki si v primarni proteinski strukturi sledijo ena za drugo in se tako pojavijo tudi v tridimenzionalni zgradbi. S kristalografskimi študijami kompleksov protitelo – protein so ugotovili, da je večina epitopov nekontinuiranih. Te gradijo aminokisliline, ki so v primarni sekvenci oddaljene med seboj, v tridimenzionalni zgradbi pa združene na površini proteina. Sintetični peptid lahko posnema zgradbo obeh tipov epitopov. Poleg kontinuiranih in nekontinuiranih epitopov lahko s sintetičnimi peptidi posnemamo tudi ne-proteinske epitope (polisaharide, DNA, glikoproteine, in druge molekule) za pripravo cepiv in diagnostičnih komponent (Ponomarenko in Regenmortel, 2009).

Za eksperimentalno napovedovanje B celičnih epitopov uporabljamo dva pristopa: napovedovanje strukture epitopa in napovedovanje funkcije epitopa. Z obema lahko ugotovimo, kako je sestavljen epitop. Napovedovanje strukture epitopa vključuje metode kot so: kristalografija z X-žarki, jedrska magnetna resonanca (NMR) in elektronska mikroskopija (EM). Napovedovanje funkcije epitopa in karakterizacija vezave protitelo – antigen pa poteka preko metod: površinska plazmatska resonanca, masna spektrometrija, NMR spektroskopija in imunoanalitske metode kot so ELISA in prenos po Westernu (Ponomarenko in Regenmortel, 2009).

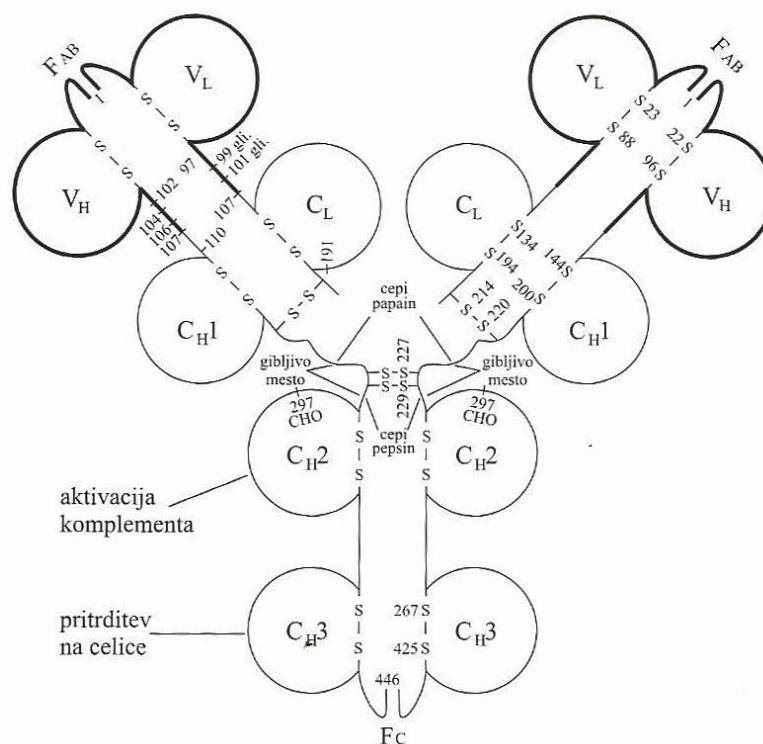
Poleg eksperimentalnega napovedovanja, pa poteka napovedovanje B celičnih epitopov predvsem z uporabo bioinformatičnih orodij, torej z uporabo različnih podatkovnih baz in programov (Ponomarenko in Regenmortel, 2009).

V magistrski nalogi smo uporabili za napovedovanje tako kontinuiranih kot nekontinuiranih B celičnih epitopov programa AbcPred in IgPred.

## 2.5 PROTITELESA

Protitelesa oziroma imunoglobulini (Ig) so glikolizirani globularni proteini iz naddružine imunoglobulinov z molekularno maso večjo od 150 kDa. Najdemo jih v krvi, tkivnih tekočinah in telesnih izločkih. Med sabo se razlikujejo po zgradbi, lastnostih in zaščitni vlogi pri obrambi organizma. Njihova struktura je simetrična. Zgrajena so iz dveh enakih težkih polipeptidnih verig, ki so označene z grškimi črkami  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  in dveh enakih lahkih polipeptidnih verig  $\kappa$  in  $\lambda$ , ki so povezane z disulfidnimi vezmi (Obermajer, 2007).

Težko in lahko polipeptidno verigo sestavljata konstantna in variabilna regija. Konstantna področja težkih verig so pomembna za interakcije z drugimi elementi imunskega sistema (aktivacija komplementnega sistema, od protiteles posredovano citotoksično delovanje obrambnih celic). Večja raznolikost v aminokislinskem zaporedju je pri variabilnih regijah na N-koncu lahke in težke polipeptidne verige. Ta določa specifičnost protitelesa za antigen. Na variabilnem področju je šest krajših segmentov (tri na težki in trije na lahki verigi), ki se strukturno skladajo z epitopi na antigenu (Obermajer, 2007).



Slika 4: Zgradba imunoglobulina: L = lahka veriga; H = težka veriga; V<sub>L</sub> in V<sub>H</sub> = vezišče za antigen (Vozelj, 2000).

Primarna funkcija protiteles je vezanje z antigenom. Ko vdre antigen v telo, sproži nastanek številnih protiteles, ki imajo različne afinitete do antigena in različne biološke lastnosti (efektorske funkcije) (Vozelj, 2000), končni izid vseh pa je odstranitev antigena.

### 2.5.1 Poliklonska protitelesa

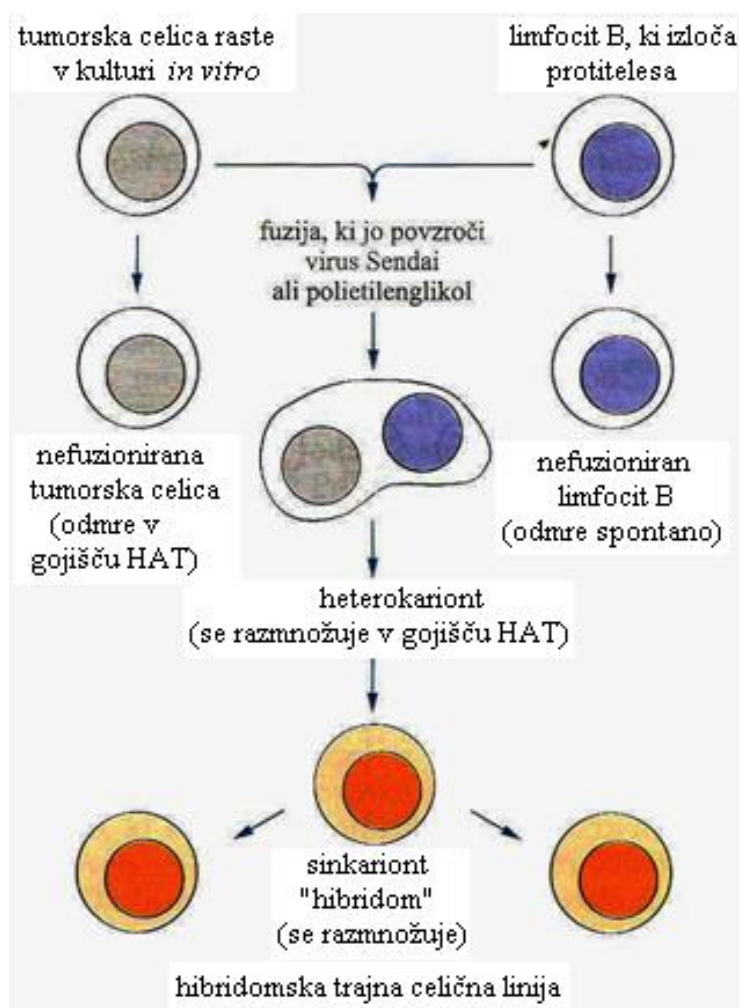
Pri imunskem odzivu nastajajo protitelesa proti različnim epitopom na antigenu. Takšna protitelesa, ki jih proizvajajo različni kloni limfocitov B imenujemo poliklonska protitelesa (Obermajer, 2007).

### 2.5.2 Monoklonska protitelesa

V okviru imunskega odziva so poliklonska protitelesa zelo uspešen mehanizem za odstranitev mikrobov iz organizma. Ko pa želimo uporabiti protitelesa v diagnostične namene, so bolj primerna protitelesa pridobljena iz enega samega klona limfocita B, ki jih imenujemo monoklonska protitelesa (mAb). Njihova največja prednost je predeterminirana specifičnost in možnost pridobivanja v neomejenih količinah *in vitro*. V diagnostiki uporabljajo mAb predvsem za različne imunske teste. Z njimi diagnosticirajo infekcijske bolezni, raka, avtoimunske bolezni, uporabljajo jih pri endokrinoloških raziskavah, tipizaciji tkiv in krvi, nosečniških testih, pri pripravi cepiv, v sintezni kemiji in še kje (Obermajer, 2007).

Pomembno področje, kjer so mAb nepogrešljivo orodje, je raziskovalno delo. Z mAb označujemo določene molekule, katerih lokacijo, funkcijo in pretvorbo lahko spremljamo. Pogosto jih uporabljamo tudi za izolacijo določenih proteinov (imunoafinitetne kromatografije). Pomembna pa je tudi uporaba protiteles v terapevtske namene, govorimo o t.i. terapevtskih mAb, ki predstavljajo pomemben delež med biološkimi zdravili. Njihovo specifično prepoznavanje tarčne molekule omogoča ciljano zdravljenje. Po predvidevanjih naj bi se tržna vrednost terapevtskih mAb povečevala za 30% na leto. Uporabljajo jih predvsem pri zdravljenju okužb, pri rakavih, srčno-žilnih in avtoimunskih obolenjih ter presaditvah (Obermajer, 2007).

Za pridobivanje specifičnih mAb sta Kohler in Milstein leta 1975 izdelala metodo s hibridizacijo celic. S to metodo lahko pridobivamo specifična protitelesa v neomejenih količinah. Metoda temelji na zlitju (fuziji) med normalno protitelesa izdelujočo celico B in mielomsko celico ter selekcijo zlitih celic, ki izločajo protitelesa želene specifičnosti. Take, z zlitjem dosežene nesmrtno linije protitelesa izdelujočih celic imenujemo hibridomi, protitelesa, ki jih izdelujejo pa monoklonska protitelesa. Uspeh te metode je temeljil na pripravi mielomskih celičnih linij, ki se razmnožujejo v pogojih *in vitro* normalnem mediju, vendar se ne razmnožujejo v selekcijskem mediju HAT, ker nimajo potrebnih genov za sintezo DNA, ki jo prekinejo komponente selekcijskega medija. Po zlitju mielomske celice prispevajo gene za nesmrtnost, limfociti pa gene za sintezo protiteles in gene za encime, ki omogočijo sintezo DNA po alternativni poti, tako da se v selekcijskem mediju lahko razmnožujejo samo somatični celični hibridi (Vozelj, 2000).



Slika 5: Hibridizacija celic (Vozelj, 2000).

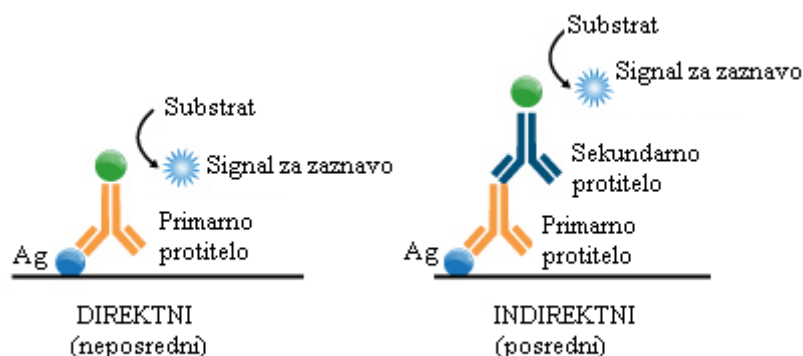
Po zlitju dveh somatičnih celic nastane celica, imenovana heterokariont. Zlitje lahko dosežemo z inkubiranjem suspenzije dveh celic z inaktiviranim virusom Sendai ali s polietilenglikolom ali z elektrofuzijo. Vse omogoča zlitje plazmatske membrane, pri čemer nastane hibridna celica z dvema ločenima jedroma – heterokariont. Po več delitvah se jedri združita v eno veliko jedro, ki ima kromosome obeh starševskih celic. V tem stadiju je celica nestabilna, se razmnožuje in izgublja različno število kromosomov od enega ali obeh partnerjev, dokler se končno ne stabilizira. Naključna izguba kromosomov pa lahko povzroči, da se izgubijo kromosomi, ki so potrebni za sintezo imunoglobulinov. Pri tem postopku se dejansko zlije le majhen odstotek celic in nekatere zlite celice so homogene starševske celice A-A ali B-B in samo nekatere so želeni hibridi A-B. Hibridne celice je zato potrebno ločiti od homogenih zlitih celic in od nezlitih celic. Pri najbolj uporabljeni metodi za osamitev hibridov A-B vzamemo starševske celice, ki zaradi mutacije ne zmorejo sinteze nukleotidov po eni od dveh poti. Zlite celice gojimo nato v mediju HAT, v katerem preživijo samo hibridne celice A-B. Po 7-10 dneh so v večini jamic celice mrtve, toda v nekaterih jamicah so majhne gručice živih celic, ki jih lahko odkrijemo z obrnjenim (invertnim) mikroskopom. Vsaka gruča predstavlja klonsko ekspanzijo hibridoma. S presejalnimi testi ugotovimo, kateri hibridomi izločajo protitelesa želene specifičnosti. Izbrane hibridome nato kloniramo tako, da

posamezne celice prenesemo in jih gojimo v ločenih jamicah, da si zagotovimo monoklonalnost (Vozelj, 2000).

## 2.6 MONOKLONSKA PROTITELESA V RAZISKOVALNEM DELU

Monoklonska protitelesa uporabljamo v diagnostiki in so nepogrešljivo orodje pri bazičnih raziskavah. V porastu je uporaba mAb v industrijskih vejah, od plastičnih protiteles do mikromrež in čipov. Za posamezen namen moramo mAb ustrezno pripraviti: lahko jih označimo (z barvili ali encimi), razgradimo, vežemo na ustrezne podlage ali na druge molekule (imunotoksini, imunoencimi), lahko jim modificiramo strukturo (odstranimo del molekule).

Monoklonska protitelesa lahko uporabljamo za direktno določanje antigenov v vzorcih, takšna mAb smo pripravili v okviru te magistrske naloge. Uporabimo lahko označena ali neoznačena protitelesa. Na označena protitelesa je pritrjen encim (imuno-encimski testi), fluorescirajoča ali luminiscirajoča snov (imunofluorescenca) ali pa radioaktivni izotop (radio-imunski testi). Lahko uporabimo t.i. primarna protitelesa, ki specifično reagirajo z vzorcem, le-te pa nato detektiramo z označenimi sekundarnimi protitelesi (posredne metode) (Kočevar, 2007).



Slika 6: Izvedbene različice imuno-encimskih testov za določanje antigenov (substrat je lahko npr. hrenova peroksidaza) (Abnova, 2015).

Na spletu lahko najdemo kar nekaj podjetij, ki izdelujejo protitelesa tudi proti TLR, tako monoklonska kot tudi poliklonska (invivigen.com, Ab-mart.com, mybiosource.com, generon.co.uk, idr.). Proti receptorju TLR15 so do sedaj na voljo le poliklonska protitelesa, ki so namenjena za uporabo v diagnostiki in za raziskovalno delo.

Tako kot mnoga druga poliklonska protitelesa, imajo tudi komercialna protitelesa proti TLR15 slabo lastnost, da nespecifično reagirajo z drugimi proteini v vzorcu, kar moti analize. Za mAb take navzkrižne reakcije niso značilne, zato bi bila za raziskave bolj primerna.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 PRIPRAVA ANTIGENA ZA IMUNIZACIJO IN TESTIRANJA

Za imunizacijo miške smo potrebovali velike količine antigena (proteina TLR15), uporabili smo rekombinanten protein TLR15 (darilo Nike Debeljak).

Rekombinanten TLR15 so proizvedli v bakterijskih celicah. Nukleotidno zaporedje kokošjega gena za TLR15 so vstavili v ekspresijski plazmid pQE-30 (Qiagen) za bakterijsko ekspresijo. Gen za TLR15 so pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Po končani reakciji so komponente reakcijske mešanice ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Očiščene PCR produkte in plazmide so rezali z restrikcijskimi encimi, sledila je ligacija vključka z vektorjem, transformacija vektorja s kitom za transformacijo (TransformAid Bacterial Transformation Kit, Thermo Scientific) v celice *E. Coli* DH5 $\alpha$ , da so pridobili zadostno količino plazmidne DNK. Nato so preverili prisotnost inserta v vektorju. Celice so razmazali po LB agar plošči z ampicilinom. Plazmida pQE-30 in pcDNA3.1 vsebujeta gen za odpornost na ampicilin zato so tvorile kolonije samo tiste celice, ki so sprejele plazmid. Iz kulture so nato izolirali plazmidno DNK s komercialnim kompletom za izolacijo (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche ali FastGene Plasmid Mini Kit, Nippon Genetics).

Za izražanje rekombinantnega TLR15 v bakterijskih celicah so uporabili sev M15[pREP4], ki je izpeljan iz *E. Coli* K12. S temperaturnim šokom so v pripravljene kompetentne celice M15 vstavili pQE-30 plazmid z vključenim zaporedjem TLR15. Celice M15 vsebujejo represorski plazmid pREP4, zaradi katerega se konstitutivno izražajo velike količine trans lac represorja. Plazmid pQE-30, kamor so vključili zaporedje za TLR15, vsebuje lac operatorje in promotor na katerega se veže represor in tako zavira izražanje rekombinantnega proteina. Ko so celice M15 z vključenim genom za TLR15 dosegle želeno optično gostoto (OD) so dodali IPTG, ki se veže na represor ter ga tako inaktivira in povzroči izražanje rekombinantnega proteina. Celice so nato lizirali. Plazmida, ki so ju uporabili vsebujeta molekularno značko (polihistidinski rep). Posledica tega je, da ima izraženi rekombinantni protein dodano zaporedje šestih histidinov na N-koncu (pQE-30) ali C-koncu (pcDNA3.1myc/His). Za izolacijo so uporabili afinitetno kromatografijo. TLR15 se je s polihistidinskim repom vezal na agarozne delce, ki so bili vezani na kromatografsko kolono in so imeli preko kelata (nitrilotriocetne kisline – NTA) vezane Ni $^{2+}$  ione (Ni-NTA agarozna, Qiagene). TLR15 so spirali s spremembo pH, z imidazolom in z renaturacijo.

##### 3.1.1 Sintetični peptidi TLR15

Ko smo testirali specifično vezavo Ab v supernatantih hibridomov in klonov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo in prenosom po Westernu, smo zelo težko natančno določili kateri pas na membrani predstavlja TLR15, zato smo v nadaljevanju testirali iste supernatante še s sintetičnimi peptidi proteina TLR15. Za napovedovanje epitopov smo uporabili programa AbcPred Prediction Server in IgPred. Peptide smo naročili pri podjetju CASLO Aps (Danska).

Naročili smo 4 peptide z naslednjimi sekvencami:

Peptid 1: LLFLDLSSNRISMLPD (Caslo, P280813-03-04)

Peptid 2: SLEELDISDNAITTIV (Caslo, P280813 -03-03)

Peptid 3: RPENPSATPRPPPGTV (Caslo, P280813-03-01)

Peptid 4: DPPNPGNVNPRFRQRR (Caslo, P280813-03-02)

Sklepali smo, da peptidi predstavljajo imunogeni del na TLR15 in jih bodo zato protitelesa prepoznavala.

Peptide smo prejeli v obliki prahu (liofilizirane). Rastopili smo ga v sterilnem PBS do končne koncentracije 5 mg/ml. Rastopino peptidov smo razdelili na alikvote in zamrznili na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ko smo rastopino s peptidi odmrznili in jo uporabili, smo ostanek nerabljene raztopine zavrgli, saj večkratno zamrzovanje in odtajanje povzroča razpadanje peptidov.

### 3.1.2 Metoda ABCpred

Metodo ABCpred uporabljamo za napovedovanje predvsem kontinuiranih B celičnih epitopov z uporabo sekvence proteina. Metoda temelji na podatkih iz podatkovnih baz Bcipep in Swiss-Prot. V primerjavi z drugimi metodami, ki temeljijo na Karplus in Schulz-evi fleksibilni skali ter Parkerjevi hidrofobni skali, je metoda ABCpred veliko zanesljivejša (Ponomarenko in Regenmortel, 2009).

## 3.2 PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI TLR15

Priprava monoklonskih protiteles je potekala po standardni metodi (Goding, 1986). Da smo lahko uporabili miško za poskus, smo pridobili dovoljenje Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano ter Veterinarske uprave Republike Slovenije s številko 34401-36/2009/2.

### 3.2.1 Imunizacija

Miško Balb/c, staro 15 tednov so štirikrat imunizirali z rekombinantnim TLR15, ki je bil delno očiščen.

Za prvo imunizacijo so pripravili mešanico antigena ( $50\mu\text{l}$  raztopine s koncentracijo proteinov  $1\text{mg/ml}$ ) in adjuvansa (Magic TM Mouse Adjuvant - Creative Diagnostics, ki sproži hiter imunski odziv in visok titer protiteles) in jo aplicirali v miško intramuskularno. Drugo imunizacijo so izvedli 21 dni kasneje, tretjo pa po 47 dneh od prve imunizacije, prav tako intramuskularno. Četrto imunizacijo so izvedli 129 dni po zadnji imunizaciji (intraperitonealno). Po vsaki imunizaciji so preverili uspešnost imunizacije s testiranjem prisotnosti specifičnih protiteles v serumu imunizirane miške. Za testiranje so uporabili redčino krvi, ki je bila vzeta miši dva tedna po vsaki imunizaciji (1:100 do 1:1000). Naredili so test DIBA, prenos po Westernu in test ELISA. Pokazali so, da je rekombinantni TLR15 sprožil imunski odziv in nastanek specifičnih protiteles, zato je bilo smiselno pričakovati, da bomo z uporabo vraničnih celic iz te miške pridobili tudi monoklonska protitelesa, specifična za TLR15.



### 3.2.2 Izolacija vranice, priprava vraničnih in mielomskih celic za fuzijo

Tri dni po zadnji imunizaciji smo miško žrtvovali s cervikalno dislokacijo. Ob žrtvovanju smo miški odvzeli kri, da smo pridobili imunski serum, ki smo ga uporabili kot pozitivno kontrolo v kasnejših testih.

Sterilno smo odvzeli vranico in jo prenesli v petrijevko z medijem DMEM. Vranico smo očistili maščobe in ovojnic in jo prenesli na mrežico za sejanje. Nato smo jo razrezali in zmacerirali z gumjastim batom. Zraven smo neprestano dodajali DMEM. Tako pridobljeno celično suspenzijo smo centrifugirali (1000 rpm, 10 min).

Teden pred načrtovano fuzijo smo ampulo z mielomskimi celicami NS1 vzeli iz tekočega dušika in celice počasi odtalili z dodajanjem DMEM-a (9 ml). Celice smo nato centrifugirali (900 rpm, 10 min). Odstranili smo supernatant, sedimentu dodali 2 ml kompletnega gojišča in celice resuspendirali v 10 ml popolnega gojišča: DMEM, 20% FBS in 0,01% gentamicin ter prenesli v gojitveno posodico. Pod mikroskopom smo preverili viabilnost celic. Celice smo nato inkubirali na 37°C dokler niso bile v eksponencialni fazi rasti (približno 1 teden).

### 3.2.3 Fuzija

Za fuzijo smo pod mikroskopom prešteli vranične celice in mielome. Glede na število vraničnih celic ( $11 \times 10^7$  celic) smo izračunali, koliko ml mielomskih celic ( $1,6 \times 10^7$ ) bomo potrebovali za fuzijo, da smo dobili razmerje vranične celice : mielomske celice = 7 : 1.

Vranične celice smo zmešali z izračunanim volumnom mielomskih celic in centrifugirali (10 min, 900 rpm). Izvedli smo fuzijo po standardnem postopku (Liddell in Cryer, 1991) s postopnim dodajanjem 50% DMSO in postopnim razredčevanjem ter spiranjem celic. Po fuziji smo celice centrifugirali (1000 rpm, 10 min), odstranili supernatant, usedlino, celice, pa resuspendirali v selekcijskem gojišču (DMEM, 20% FBS, 2 ml/100ml HAT in 0,01% gentamicin). Kulturo smo razdelili v 4 plošče z 96 vdolbinicami (PL1, PL2, PL3, PL4) in v 2 plošči z 24 vdolbinicami (PL5 in PL6) in inkubirali na 37°C. Za testiranje smo supernatante hibridomov oziroma klonov iz vdolbinic na ploščah poimenovali s številko plošče in oznako vdolbinice, npr. 1A1, pomeni PL1, vdolbinica A1.

### 3.2.4 Kloniranje

S kloniranjem želimo osamiti klone hibridomov, ki izločajo samo protitelesa specifična za naš antigen. Obstaja več načinov kloniranja: kloniranje v agarju (»limiting dilution«) in »single cell« manipulacija. Mi smo izvedli kloniranje z »limiting dilution« pri katerem smo redčili suspenzijo celic tako, da smo teoretično dosegli eno celico v eni vdolbinici. Tako smo prešteli celice v vzorcu in uravnali ustrezno končno koncentracijo.

$$\text{Faktor razredčitve} = \frac{\text{št. celic/ml}}{\text{željeno št. celic na luknjico/ml}}$$

Celice smo nasadili v plošče z 96-timi vdolbinicami, jih ustrezno označili in inkubirali na 37°C dokler niso izločile dovolj protiteles za testiranje.

Kloniranje smo izvedli približno 10 dni po fuziji in nato po vsakem testiranju, ko smo izbrali pozitivne klonove.

### 3.3 ODBIRA SPECIFIČNIH PROTITELES

Po fuziji in po vsakem kloniranju v gojitvenih medijih iz posameznih vdolbinic ugotavljamo, kateri kloni izločajo za nas zanimiva specifična protitelesa. Da preverimo uspešnost imunizacije ugotavljamo prisotnost specifičnih protiteles v imunskem serumu. Testirati moramo veliko vzorcev v kratkem času, zato moramo izbrati test, ki je priročen, ponovljiv, hiter in dovolj natančen. Izbira testa pa je odvisna tudi od antigena (čist antigen, lizat, celice, tkiva), ki ga mora biti dovolj.

Pri tej magistrski nalogi smo prisotnost protiteles določali s t.i. »western-blot imunobarvanjem«. Ločitvi proteinov iz lizata *E.coli* s SDS-PAGE elektroforezo je sledil prenos proteinov po Westernu in nato inkubacija trakov v supernatantih klonov in detekcija s sekundarnimi označenimi protitelesi. Ker nismo uspeli zagotovo ugotoviti katera lisa na membrani predstavlja TLR15, smo se odločili da bomo odbiranje klonov nadaljevali s sintetičnimi peptidi (imunogeni deli TLR15). Predvidevali smo, da bodo protitelesa prepoznala epitope na peptidu. Testiranje smo izvedli z indirektnim imuno-encimskim testom (iDIBA) in testom ELISA (»Enzyme-Linked Immunosorbant Assay«).

#### 3.3.1 SDS-PAGE elektroforeza

S poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecilsulfatom (SDS-PAGE elektroforeza) ločimo proteine glede na različne molekulske mase. Izvajali smo jo po standardnem postopu (Harlow in Lane, 1988).

Za testiranje supernatantov klonov smo pripravili 10% (w/v) ločevalni gel in 4% (w/v) nalagalni gel. Uporabili smo nastavek z dvema stezama. Na prvo stezo na gelu smo nanесли 10 – 15 µl molekularnega označevalca (BlueStar Prestained Protein Ladder, Nippon Genetics), na drugo pa 600 – 800 µl vzorca. Vzorec smo pripravili tako, da smo supernatantu lizata *E. coli* dodali nalagalni pufer da je bila končna koncentracija 1-kratna in β-merkaptetanol do končne koncentracije 5% (v/v) (750 µl lizata, 200 µl nalagalnega pufera in 50 µl β-merkaptetanola). Vzorce smo pred nanosom na gel segrevali 5 min na 96 °C, da so proteini denaturirali. Elektroforezo smo izvajali na vertikalnem sistemu za elektroforezo (Mighty Small II, GE Healthcare Ltd.) po navodilih proizvajalca. Elektroforeza je tekla približno 4 ure na 80 V oziroma dokler modra fronta (barvilo bromfenolmodro) ni izstopila iz gela. Za takšne

elektroforetske pogoje smo se odločili ker rokujemo s proteinom velike molekulske mase in pričakujemo boljšo ločitev pri nižji napetosti.

### 3.3.2 Prenos po Westernu

Pri tej metodi s pomočjo električnega toka prenesemo antigene iz gela na membrano, na kateri nato s protitelesi zaznavamo liso antigena (Kočevar, 2007).

Po končani SDS-PAGE elektroforezi smo ločene proteine iz gela prenesli na membrano Immobilon PVDF (Milipore, ZDA) po standardnem postopku (Benčina in sod., 1994).

V pufer za prenos (10 mM CAPS pH11, 10% metanol) smo namočili 8 filter papirjev v velikosti gela, membrano, prav tako v velikosti gela, pa smo aktivirali v 100% metanolu. Gel smo po elektroforezi uravnotežili v pufru za prenos (5 min). Za prenos smo uporabili aparaturo, katere glavni sestavni del sta anodna in katodna plošča (ALT, Pharmacia LKB Multiphor II). Na katodnem delu naprave smo sestavili komponente »sendviča« (štirje filter papirji, membrana, gel, štirje filter papirji), katere so se morale popolnoma prilegati in iztisnili zračne mehurčke. »Sendvič« smo pokrili z anodnim delom. Napravo smo priključili na električni tok, da so proteini začeli potovati iz gela na membrano. Električni tok smo izračunali po enačbi:

Površina sendviča ( $\text{cm}^2$ ) x 0,8 = tok, ki ga fiksiramo (mA)

Po končanem prenosu (4 ure) smo membrano shranili v PBS s 0,05% (v/v) Tween-20 na 4°C do uporabe.

### 3.3.3 Imunodetekcija

Prisotnost za nas zanimivih protiteles smo ugotavljali v imunskem serumu (preverimo uspešnost imunizacije) in v supernatantih hibridomov po fuziji in v supernatantih klonov po vsakem kloniranju.

Za zaznavanje prisotnosti specifičnih protiteles smo lizat *E.coli* z TLR15 nanesli na SDS-PAGE elektroforezo (opisano v 3.2.1), po kateri smo naredili prenos na membrano po Westernu (opisano v 3.3.2). Od tako pridobljene membrane smo odrezali del membrane (trakec), katerega smo obarvali barvilom Coomassie modrim, da smo preverili prenos proteinov na membrano in dejanski profil proteinov ter določili, kje pričakujemo TLR15. Preostanek membrane smo 1 uro blokirali v 5% (w/v) BSA na stresalniku. Po blokadi smo membrano razrezali na trakce (4 mm). Po predhodnih raziskavah smo sklepali, da se na membrani pojavita dve lisi, ki predstavljata TLR15, in sicer prva na mestu okoli 100 kDa in druga na mestu okoli 48 kDa, zato smo membrano odrezali na mestu okoli 40 kDa. Odvzeli smo supernatante hibridomov oziroma klonov in jih prenesli v inzulinke (1 ml), katere smo ustrezno označili. Oštevilčene trakce smo razporedili v označene inzulinke s supernatanti. V eno izmed izulink smo pripravili imunski serum (redčitev 1:500) za pozitivno kontrolo.

Trakce smo v supernatantih inkubirali čez noč na 4°C. Po inkubaciji smo nadaljevali s spiranjem in inkubaciji v sekundarnih označenih protitelesih, ponovnem spiranju in barvanjem s kromogenim substratom kot je opisano v točki 3.3.4.

Poleg barvanja s kromogenim substratom za hrenovo peroksidazo (TMB Stabilised Substrate for Horseradish Peroxidase, Promega) smo poskusili tudi z ECL substratom (ECL Western Blotting Substrate, Promega) s katerim zaznavamo vezana protitelesa. Membrano smo v substratu inkubirali 1 minuto, nato smo trakce namestili med dve plasti prozorne folije in iztisnili morebitne mehurčke zraka. V temnici smo nato trakce za 30 sekund do 10 minut izpostavili filmu (CL-X Posure Film, Pierce), da smo dobili jasno sliko. Film smo nato obdelali v razvijalni tekočini (PQ universal paper developer, Ilford) in fiksirali (Rapid fixer, Ilford). Po fiksaciji smo film sprali z vodo in posušili. Ta postopek ni vedno uspel, najbrž zaradi starosti razvijalne tekočine, zato smo ga opustili.

### 3.3.4 Indirektni encimskoimunski test - iDIBA

Za iskanje protiteles proti sintetičnim peptidom smo uporabili »indirect dot immunobinding assay« (test iDIBA). Test temelji na lastnosti proteinov, da se vežejo na membrano. Na tako vezanem antigenu izvedemo reakcijo z vzorcem, ki vsebuje protitelesa in nato preverjamo prisotnost specifičnih protiteles s sekundarnimi protitelesi, označenimi z encimom.

Na membrano Immobilon PVDF (Milipore, ZDA) smo narisali kvadratke ( $25 \text{ mm}^2$ ) in jo aktivirali v metanolu (nekaj sekund), nato pa 5 minut spirali v destilirani vodi. Na vsakem traku smo upoštevali en kvadrataček za oštevilčenje, na tem mestu smo tudi prijemale s pinceto. Pripravili smo ustrezne redčitve antigena in jih nanesli na rahlo osušeno membrano ( $3 \mu\text{l}$  na kvadrataček).

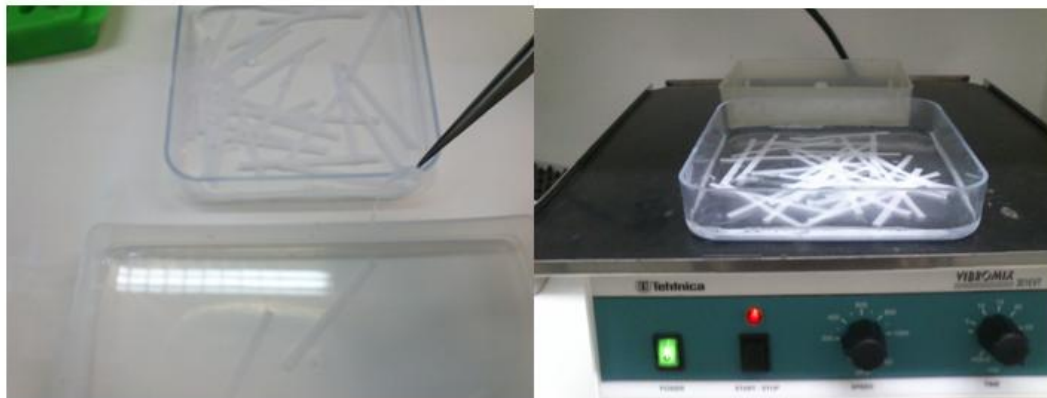


Slika 7: Nanos antigena ( $3 \mu\text{l}$  na kvadrataček) na membrano.

Ko so se kapljice antigena posušile, smo membrano 45 minut inkubirali v 0,5% Tween-PBS, da smo blokirali preostala vezna mesta. Po blokadi smo membrano razrezali na trakce in le-te 2-3 ure ali čez noč na  $4^\circ\text{C}$  inkubirali v supernatantih klonov, v katerih smo iskali specifična protitelesa proti peptidu. Eden trakec smo vzporedno inkubirali še v imunskem serumu (pozitivna kontrola), enega pa v popolnem gojišču (negativna kontrola).

Po inkubaciji smo trakce spirali 5-krat po pet minut v PBS s 0,05% (v/v) Tween-20. Sledila je inkubacija (1 uro) v označenih sekundarnih protitelesih (Sigma A9044, Rabbit anti-Mouse IgG ali Sigma A9917, Goat anti-Mouse IgG), katere smo redčili 1:3000. Po inkubaciji smo

trakce spirali 4-krat po 5 minut v PBS s 0,05% (v/v) Tween-20 in pet minut v 1xPBS. Kot kontrolo smo uporabili tudi poliklonska kunčja protitelesa proti TLR15, da bi vedeli, kje se nahaja TLR15.



Slika 8: Spiranje trakcev membrane v PBS s 0,05% (v/v) Tween-20.

Po spiranju smo trakce prenesli na ravno površino in jih obarvali s kromogenim substratom za hrenovo peroksidazo (TMB Stabilised Substrate for Horseradish Peroxidase, Promega). Ko se je razvila barvna reakcija, smo reakcijo prekinili z destilirano vodo. Membrane smo nato posušili in fotografirali. Intenziteto obarvanja smo subjektivno ovrednotili s +++ (močno obarvanje), ++ (dobro vidno, vendar manj intenzivno obarvanje), + (rahlo modro obarvanje, še vedno ločljivo glede na negativno kontrolo) in (+) (zelo rahlo obarvanje, še ločljivo od negativne kontrole).

### 3.3.5 Encimskoimunska metoda – ELISA

ELISA je imunska tehnika, ki se uporablja za dokazovanje prisotnosti antigena ali protitelesa v vzorcu. Eno od protiteles mora biti specifično za antigen, drugo reagira s kompleksom antigen-primarno protitelo in ima vezan encim, ki povzroči nastanek kromogenega, luminiscenčnega ali fluorogenega produkta (Kočevar, 2007).

Pri tej metodi smo pripravili redčitve antigena (sintetični peptidi proteina TLR15) in ga nanesli na ploščo za ELISO (50  $\mu$  v vsako jamico). Vezava antigena na plastiko je potekala čez noč na 4°C. Sledilo je spiranje na avtomatskem spiralniku (Biotek, ELx-50), 5-krat s 300  $\mu$ l 0,05% Tween-20 PBS pufra. Po spiranju smo v jamice nanesli 300  $\mu$ l blokade (0.5% (w/v) BSA v 0.05% Tween-20 PBS). Blokada je potekala 1 uro. Po blokadi smo ponovili postopek spiranja in nato nanesli 100  $\mu$ l supernatanta klonov v vsako jamico. Vzoredno smo nanesli v

eno jamico še imunski serum v redčitvi 1:500 in popolno gojišče kot negativno kontrolo. Inkubirali smo na 4°C čez noč. Naslednji dan smo ponovno spirali, nato pa nanesli v jamice sekundarna označena protitelesa (75  $\mu$ l na luknjico) v redčitvi 1:3000. Inkubacija je potekala 45 minut. Po inkubaciji smo zopet spirali in nanesli substrat za ELISO (100  $\mu$ l na jamico).

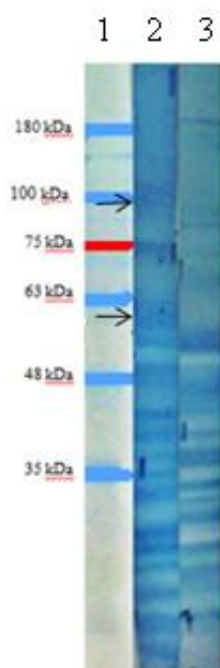
Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca Thermo Scientific (2,75 ml 0,2M natrijevega fosfata, 2,43 ml 0,1M citronske kisline, 5 ml 1xPBS, tableta ABTS in 10  $\mu$ l peroksida). Ploščo s substratom smo inkubirali v temi 1 uro, da se je razvila reakcija. Nato smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 405 nm na avtomatskem spektrofotometru (Biotek, EL808).

## 4 REZULTATI

### 4.1 SPECIFIČNA PROTITELESA V SUPERNATANTIH HIBRIDOMOV

#### 4.1.1 Detekcija TLR15 v lizatu *E.coli* z uporabo SDS-PAGE in prenosom po Westernu

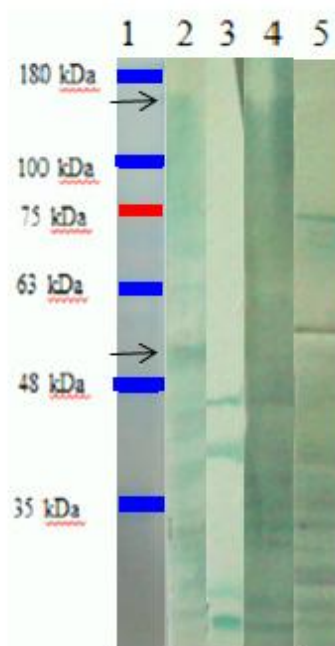
Po SDS-PAGE in prenosu po Westernu smo odrezali del membrane, da smo preverili profil prenesenih proteinov iz supernatanta lizata *E.coli*, ki je vseboval TLR15 in da bi ugotovili, na katerem položaju je TLR15. Trakec membrane po končanem prenosu po Westernu, kjer smo na gel dodali lizat bakterije *E.coli* z TLR15 in trakec membrane kjer smo nanесли lizat bakterije *E.coli* brez TLR15 smo zato obarvali z barvilom Coomassie modrim in ju primerjali. Reakcija oz. razlika je zelo slabo vidna, zato nismo uspeli zagotovo ugotoviti katera lisa predstavlja iskani antigen. Puščici predstavljata mesti, na katerih smo predvidevali, da se nahaja TLR15 glede na njegovo molekularno maso, to je med 100 kDa in 130 kDa in med 48 kDa in 63 kDa. Ocenjena velikost rekombinantnega TLR15 je 100 kDa. V raziskavi Debeljak in sod. (neobjavljeni podatki) so pri primerjanju proteinskega profila lizata *E.coli* z TLR15 in lizata *E.coli* brez TLR15 prav tako odkrili dve lisi, ki sta bila dobro vidni samo pri lizatu *E.coli* z TLR15, zato so domnevali, da obe predstavljata TLR15. Zgornja lisa sovpada z ocenjeno velikostjo TLR15 (100 kDa), medtem ko spodnja lisa predstavlja približno polovično velikost zgornje in bi lahko predstavljala krajši produkt TLR15, ki bi lahko nastal zaradi neustreznih postranslacijskih modifikacij ali nepravilnega zvitja.



Slika 9: Proteinski profil lizata *E.coli* z TLR15 po barvanju s Coomassie modrim; 1 → velikostni standard; 2 → lizat z TLR15; 3 → lizat brez TLR15. S puščicami sta označeni predvideni mesti, kjer se nahaja TLR15.

Da bi ugotovili, ali se v imunskem serumu miške nahajajo protitelesa proti TLR15, smo membrane s TLR15 in brez TLR15 inkubirali v imunskem serumu miške. Po primerjavi

pasov na trakih (slika 10) smo lahko sklepali, da se v imunskem serumu miške nahajajo protitelesa proti TLR15, saj smo zaznali pasova na predvidenima položajema za TLR15. Pri testiranju s poliklonskimi kunčjimi protitelesi smo glede na rezultate sklepali, da poliklonska protitelesa prepoznavajo samo cel protein TLR15 (100 - 130 kDa) in ne krajšega dela (48 – 63 kDa), vendar je bila reakcija zelo slabo vidna. Reakcija z imunskim serumom je v nadaljnjih testih predstavljala pozitivno kontrolo.



Slika 10: Inkubacija v mišjem serumu in komercialnih poliklonskih kunčjih protitelesih: 1 → velikostni standard; 2 → lizat z TLR15 v serumu; 3 → lizat brez TLR15 v serumu; 4 → lizat z TLR15 v poliklonskih protitelesih; 5 → lizat brez TLR15 v poliklonskih protitelesih;.

Po fuziji smo odvzeli supernatante iz plošč 1, 2, 3, 4, 5, in 6 (označene PL1, PL2 itd.). Vdolbinice na mikrotiterski plošči s hibridomi smo izbrali glede na vizualni pregled z mikroskopom. Iskali smo vdolbinice kjer je bila jasno vidna ena ali več gruč celic. Gruča celic predstavlja klonsko ekspanzijo hibridoma. Zraven smo vedno testirali še imunski serum, kot pozitivno kontrolo.

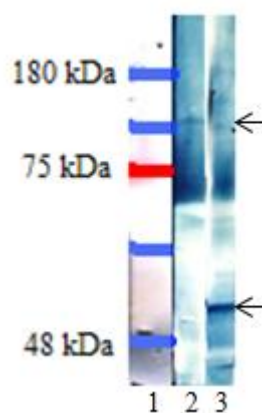


Preglednica 2: Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih hibridomov.

<b>PL 1</b>	1B9	<b>1C4</b>	<b>1C9</b>	1C11	1E8	1F9	1G6
Obarvanje*	-	+	+	-	-	-	-
<b>PL 2</b>	2B10	<b>2C11</b>	2D3	2D6	<b>2F12</b>	2G11	
Obarvanje	-	+	-	-	+	-	
<b>PL 3</b>	3B5	<b>3C3</b>	3D1	3D3	3D6	3F10	<b>3H8</b>
Obarvanje	-	+	-	-	-	-	+
<b>PL 4</b>	4A1	4B12	4C4	4D5	4E9		
Obarvanje	-	-	-	-	-		
<b>PL 5</b>	5A1	5A2	5A3	5A5	5A6	<b>5B1</b>	5B2
Obarvanje	-	-	-	-	-	+	-
	5B3	5B4	<b>5B5</b>	5B6	5C1	5C2	5C3
Obarvanje	-	-	+	-	-	-	-
	<b>5C4</b>	5C6	<b>5D1</b>	5D2	<b>5D3</b>	5D6	
Obarvanje	+	-	+	-	+	-	
<b>PL 6</b>	<b>6B2</b>	6B3	6C2	6C3			
Obarvanje	+	-	-	-			

\* + Pomeni, da smo na traku membrane po prenosu po Westernu opazili lisi na mestoma, za katera smo sklepali, da se nahaja TLR15. V supernatantu so se tako nahajala protitelesa proti TLR15, nanje pa so se vezala sekundarna označena protitelesa, ki se po izpostavitvi kromogenem substatu obarvala.

- Pomeni, da se na položajema, za katera smo sklepali, da se nahaja TLR15 (lisa na mestu med 100 – 135 kDa in lisa na mestu med 48 – 63 kDa) lisi nista obarvali, torej v supernatantu nismo zaznali protiteles proti TLR15.



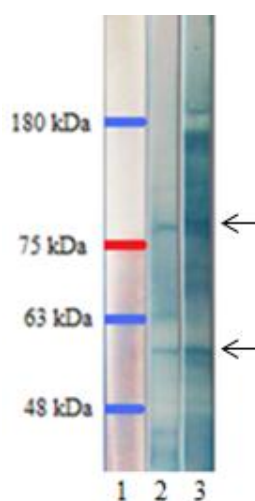
Slika 11: Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih hibridomov iz PL5; 1 → velikostni standard, 2 → 5B5; 3 → 5B1. S puščicama sta označeni predvideni mesti TLR15 pri molških masah 48-63 kDa in 100-135 kDa.

Glede na rezultate smo sklonirali 2C11, 5B1 in 5B5. Pri preverjanju prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih klonov 2C11 smo dobili negativne rezultate oziroma nismo zaznali prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15, medtem ko smo pri ostalih dveh (5B1 in 5B5) zaznali prisotnost specifičnih protiteles proti TLR15. Trakce vsake testirane membrane smo vedno vzporedno inkubirali tudi v imunskem serumu (pozitivna kontrola), kjer smo vedno opazili pozitivno reakcijo na TLR15. Za detekcijo reakcije TLR15 s protitelesi v imunskem serumu ali supernatantih smo uporabljali sekundarna, s peroksidazo

označena protitelesa. Reakcija je bila vedno zelo slabo vidna, prišlo je do nespecifičnih reakcij. Sklepamo, da imajo kunčja poliklonska protitelesa nizko afiniteto za TLR15 in da prepoznavajo tudi ostanke lizata *E.coli*, saj so bili kunci imunizirani z lizatoma bakterije.

Preglednica 3: Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih klonov 2C11, 5B1 in 5D3.

<b>2C11</b>	2C11/A1	2C11/A2	2C11/A3	2C11/A4	2C11/A5	2C11/A6	2C11/B1	2C11/B2
Obarvanje	-	-	-	-	-	-	-	-
	2C11/B3	2C11/B4	2C11/B5	2C11/B6	2C11/C1	2C11/C2	2C11/C3	2C11/C4
Obarvanje	-	-	-	-	-	-	-	-
	2C11/C5	2C11/C6	2C11/D1	2C11/D2	2C11/D3	2C11/D4	2C11/D5	2C11/D6
Obarvanje	-	-	-	-	-	-	-	-
	2C11/E1	2C11/E2	2C11/E3	2C11/E4	2C11/E5	2C11/E6	2C11/F1	2C11/F2
Obarvanje	-	-	-	-	-	-	-	-
	2C11/F3	2C11/F4	2C11/F5	2C11/F6	2C11/G1	2C11/G2	2C11/G3	2C11/G4
Obarvanje	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5B1</b>	5B1/A1	<b>5B1/A4</b>	5B1/B2	5B1/B3	<b>5B1/B6</b>	5B1/C2	5B1/C3	
Obarvanje	-	+	-	-	+	-	-	
<b>5D3</b>	5D3/A1	5D3/A4	5D3/A5	5D3/C2	5D3/C3	<b>5D3/C4</b>	5D3/D2	5D3/D4
Obarvanje	-	-	-	-	-	+	-	-



Slika 12: Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih klonov PL5; 1 → velikostni standard, 2 → 5B1/A4, 3 → 5B1/B6. S puščicama sta označeni predvideni mesti TLR15.

Ker iz zgornjih rezultatov nismo uspeli zagotovo potrditi, katera lisa na obarvani membrani predstavlja iskani antigen (TLR15), smo se odločili, da testiranje nadaljujemo s komercialnimi sintetičnimi peptidi TLR15. Klone PL5 smo posamično zamrznili, hibridome posamezne plošče pa smo združili in jih zamrznili ter označili s PL1-5.

#### 4.1.2 iDIBA

Test temelji na lastnosti proteinskih antigenov, da se vežejo na membrano, zato smo najprej preverili vezavo peptidov na membrano. Na voljo smo imeli 4 sintetične peptide proteina TLR15. Poimenovali smo jih Peptid 1, Peptid 2, itd. Vezavo antigena na membrano smo preverili s Peptidom 1. Membrano smo aktivirali, nanesli antigen in nato obarvali s Coomassie modrim.

Redčitev 1:10 1:20



Slika 13: Barvanje Ag (peptida 1) z barvilom Coomassie modrim.

Iz slike 13 lahko vidimo, da se Peptid 1 veže na membrano, saj se je mesto kjer smo nanesli antigen obarvalo modro (modri piki).

Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 smo nadaljevali s sintetičnimi peptidi, da bi preverili kateri od izbranih peptidov so imunogeni in vežejo protitelesa proti TLR15. Iz rezultatov testa iDIBA smo ugotovili, da se protitelesa proti TLR15 vežejo samo na Peptid 1. Reakcija je bila najmočnejša pri najvišji koncentraciji antigena in imunskem serumu ter združenih klonih iz plošče 5 (PL 5), izmed klonov pa je najbolje reagiral klon 5B5.

+++	++	+	+++	++	++	(+)
1:200	1:400	1:800	1:200	1:400	1:400	1:800
$\Sigma$ PL5			Imunski serum		5B5	

Opomba:  $\Sigma$  = združeni supernatanti iz vseh vdolbinic na PL5.

Slika 14: Ovrednotenje različno močnega obarvanja pri vezavi protiteles proti TLR15 na Peptid 1.

Vzorec /Redčitev	PEPTID 1					PEPTID 2				
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
<b>5D3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2C11</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5B5</b>	++	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-
<b>*<math>\Sigma</math>PL 5</b>	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>gojišče</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>im. serum (1:500)</b>	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
	PEPTID 3					PEPTID 4				
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
<b>5D3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2C11</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5B5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b><math>\Sigma</math>PL 5</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>gojišče</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>im. serum (1:500)</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Opomba: Obarvanje smo ovrednotili: +++ močno obarvanje

++ dobro vidno, vendar manj intenzivno obarvanje

+ rahlo modro obarvanje, še vedno ločljivo glede na negativno kontrolo

(+) zelo rahlo obarvanje, še ločljivo od negativne kontrole

\*združeni supernatanti iz vseh vdolbinic na PL 5.

Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 smo nadaljevali s komercialno pripravljenim Peptidom 1, saj smo samo pri tem peptidu dobili pozitivne rezultate. Sklepamo, da je Peptid 1 nosilec imunogenega dela TLR15, ki je v miši induciral protitelesa proti temu epitopu proteina TLR15.

Nadalje smo s Peptidom 1 testirali še supernatante hibridomov, ki smo jih združili iz plošče 1, 2, 3, 4 in 6, da bi ugotovili, ali so protitelesa, specifična za Peptid 1 še med kakšnimi hibridomi, ki smo jih shranili. Ker je bila večina reakcij v prejšnjih testih šibka in ker smo domnevali, da je količina protiteles v supernatantih združenih hibridomov nizka, smo Peptid 1 tokrat pripravili v večjih koncentracijah (nižjih redčitvah) (dvojne redčitve od 1:25 do 1:400). Izkazalo se je, da smo vse pozitivne reakcije dobili pri redčitvah Peptida 1 1:25 in 1:50.

Preglednica 5: Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti Peptidu 1 v supernatantih hibridomov iz plošč PL 1, 2, 3, 4 in 6.







Vzorec /Redčitev	PEPTID 1				
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400
ΣPL 1	+	+	(+)	-	-
ΣPL 2	+	(+)	(+)	-	-
ΣPL 3	++	+	(+)	-	-
ΣPL 4	+++	+++	(+)	-	-
ΣPL 6	-	-	-	-	-
gojišče	-	-	-	-	-
im. serum (1:500)	+++	++	(+)	-	-

Najboljše rezultate smo dobili pri plošči 3 in 4, kar pomeni, da so v mešanici združenih hibridomov prisotni taki, ki sintetizirajo za Peptid 1 specifična protitelesa. Zato smo celice teh dveh plošč sklonirali in jih nasadili v nove plošče z 96-timi vdolbinicami.

Monoklonska protitelesa so po definiciji šele protitelesa, ki so vsaj enkrat sklonirana in so vse celice klona res potomke ene same celice. Na podlagi rezultatov presejalnih testov (Preglednica 3), smo klonirali dva hibridoma, 5B1 in 5D3. Supernatante klonov 5B1 in 5D3 smo testirali na prisotnost specifičnih protiteles proti Peptidu 1. Hkrati smo testirali tudi različna sekundarna protitelesa: kozja in kunčja protitelesa proti mišjim IgG, konjugirana s peroksidazo. Sekundarna protitelesa namreč lahko vplivajo na intenziteto barvne reakcije.

Kot je razvidno iz preglednice 6, smo pri klonu 5B1/B6 potrdili prisotnost mAb proti Peptidu 1. Celice klona 5B1/B6 proizvajajo monoklonska protitelesa proti Peptidu 1. Vidimo lahko tudi, da bi bila za test DIBA bolj uporabna kunčja sekundarna protitelesa, ker dajejo bolj značilno modro barvo ob razgradnji substrata, kar je pomembno pri metodah, kjer je ocena subjektivna.

Preglednica 6: Preverjanje prisotnosti monoklonskih protiteles proti Peptidu 1 v supernatantu klona 5B1/B6 pri različnih redčitvah in z različnimi sekundarnimi protitelesi.

Konjugat	0	1:10	1:20
Kozja Ab <sup>1</sup>			
Kunčja Ab <sup>1</sup>			
<b>Intenzivnost obarvanja</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>

1 Goat anti-Mouse IgG (Sigma A9917)

2 Rabbit anti-Mouse IgG (Sigma A9044)

#### 4.1.3 ELISA

Vzporedno s testom iDIBA smo opravili tudi test ELISA, ki bi bila za nadaljnja testiranja bolj objektivna metoda. Peptid 1, za katerega smo že prej ugotovili, da daje boljše reakcije s protitelesi, smo testirali v treh redčitvah, druge peptide pa v eni.

Preglednica 7: Rezultati testa ELISA supernatantov plošč 1, 2, 3, 4 in 6 s Peptidi 1, 2, 3 in 4.

Redčitev	Peptid 1			Peptid 2	Peptid 3	Peptid 4
	1:25	1:50	1:100	1:100	1:100	1:100
<b>PL 1</b>	0,05	0,044	0,048	0,05	0,046	0,048
<b>PL 2</b>	0,046	0,056	0,077	0,067	0,076	0,057
<b>PL 3</b>	0,055	0,055	0,071	0,067	0,064	0,064
<b>PL 4</b>	0,048	0,049	0,083	0,063	0,057	0,055
<b>PL6</b>	0,047	0,045	0,051	0,05	0,05	0,049
<b>Negativna kontrola (gojišče)</b>	0,066	0,071	0,048	0,049	0,057	0,047
<b>Pozitivna kontrola (imunski serum)</b>	0,046	0,042	0,098	0,081	0,08	0,076

Pri testu ELISA velja pravilo, da se kot pozitivna reakcija šteje rezultat, ki je večji od 4-kratnika ozadja oz negativne kontrole. V preglednici 7 noben rezultat ne ustreza temu kriteriju. Rezultati testa ELISA torej niso relevantni. Sklepamo, da se peptid ne veže dobro na plastiko oz. razpade. Testiranje s testom ELISA smo opustili.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V Evropi in mnogih zahodnih državah se letno povečuje uživanje perutninskega mesa vse od piščancev do puranov, rac, gosk in drugih. V intenzivni perutninski reji so med preventivnimi ukrepi tudi zaščita cepljenja proti nekaterim nalezljivim boleznim. Kljub temu občasno pride do izbruha bolezni. V nekaterih delih sveta perutnina živi v neposredni bližini človeka in čeprav prenos mikrobov iz enega gostitelja na drugega ni običajen, se je prav to zgodilo v primeru okužbe z virusom aviarnе influence H5N1, s katerim so se okužili tudi ljudje. Razumevanje imunskega sistema ptic je zato pomemben predpogoj za razvoj novih strategij za njihovo zaščito pred boleznimi, kot tudi za obvladovanje takšnih situacij, kot je bil primer ptičje gripe (Schultz in Magor, 2008).

Če gostitelja imuniziramo z antigenom, ki je strukturno različen od komponent, ki so gostitelju lastne, bomo izzvali močan imunski odziv. Sklepali smo, da je TLR15 strukturno dovolj različna od mišjih TLR, da bo imunogena molekula in bo pri imunizaciji miške sprožila imunski odziv. Ker smo potrebovali velike količine antigena, smo se odločili, da v bakterijskih celicah skonstruiramo rekombinanten TLR15. Z rekombinantnim TLR15 smo štirikrat imunizirali miško Balb/c. Domneva o antigenski naravi TLR15 je bila pravilna, saj smo v imunskem serumu dokazali protitelesa, ki so prepoznavala epitop na Peptidu 1, ki je del TLR15.

Ker molekule TLR15 nismo mogli osamiti v čisti obliki, ne iz membran kokošjih celic, ne iz *E.coli*, kamor smo vnesli gen za TLR15, smo morali za testiranje hibridomov najprej izvesti ločitev proteinov s SDS elektroforezo ter te prenesti po Westernu na membrano in izvesti imunodetekcijo. Po predhodnih raziskavah smo sklepali, da se TLR15 nahaja na membrani na mestu med 100 in 135 kDa in druga podenota na mestu med 48 in 63 kDa. Lisa, ki predstavlja položaj TLR15 se nahaja na različnih mestih (npr. med 100 in 135 kDa), ker smo gele pri ločitvi proteinov s SDS-page elektroforezo ulivali sami in zato nismo mogli zagotoviti popolnoma standardiziranih pogojev, kljub temu, da je imel naš gel vedno isto gostoto (1% agaroze) in smo delali pri istih pogojih. Z uporabo že pripravljenih (kupljenih) gelov bi lahko zagotovili popolnoma standardizirane pogoje. Debeljak in sod. (neobjavljeni rezultati) so ocenili velikost rekombinantnega proteina na 100 kDa, kar sovпада z našimi rezultati. Pri primerjavi proteinskih profilov lizata *E.coli* s TLR15 in lizata *E.coli* brez TLR15, so Debeljak in sod. (neobjavljeni rezultati) opazili 2 razliki: liso na položaju med 100-135 kDa in liso na položaju med 48-63 kDa. Sklepamo, da lisa na položaju med 48-63 kDa predstavlja krajši produkt TLR15. Protein TLR15 je relativno velik evkariontski protein, ki so ga proizvedli v prokariontskem sistemu. Pri takšni proizvodnji rekombinantnega proteina lahko nastanejo krajši produkti zaradi nepravilnega zvitja, druge rabe stop kodonov, ali neustreznih postranslacijskih modifikacij. Pri preverjanju prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih hibridomov in klonov smo zato upoštevali, da se antigen TLR15 nahaja na dveh položajih: na mestu med 100-135 kDa in na mestu med 48-63 kDa.

Ker je supernatantov iz posameznih vdolbinic volumensko omejeno, 100-150  $\mu$ l, smo membrano po prenosu po Westernu ustrezno blokiral in razrezali na trakce, ki smo jih

inkubirali v supernatantih hibridomov. Po inkubaciji smo nadaljevali s spiranjem in inkubaciji v sekundarnih označenih protitelesih, ponovnem spiranju in barvanjem s kromogenim substratom. Pri vsakem preverjanju prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 smo uporabili še imunski serum kot pozitivno kontrolo in komercialna poliklonska protitelesa, ki so se tekom testiranja dokazala kot nezanesljiva, saj je prišlo do veliko nespecifičnih reakcij, ki smo jih pripisali prepoznavanju predvsem ostankov *E.coli*.

Iz rezultatov, ki smo jih pridobili, nismo mogli zagotovo potrditi točnega mesta na membrani kjer bi se naj nahajal naš antigen (TLR15), zato smo se odločili, da bomo iskanje monoklonskih protiteles proti TLR15 nadaljevali s podenotami TLR15, s komercialnimi sintetičnimi peptidi, za katere smo z napovedovanjem epitopov, s programom AbcPred predvideli, da bi lahko bili nosilci imunogenih epitopov.

Sintetične peptide lahko uporabimo:

- za natančno analizo imunogenih regij,
- da osamimo imunogene regije in jih uporabljamo kot antigene,
- da iz določenih proteinov imunogene regije odstranimo, zato, da ti proteini niso več imunogeni (Goding, 1986).

V našem primeru smo sintetične peptide uporabili za analizo imunogenih regij, saj smo želeli najti regije TLR15, kjer so epitopi, na katere bi se vezala mAb. Preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih klonov smo nadaljevali s štirimi sintetičnimi peptidi TLR15, z metodama iDIBA in ELISA. Testiranje s testom ELISA smo opustili, ker nismo dobili pozitivnih rezultatov. Sklepali smo, da se sintetični peptidi ne vežejo na plastiko ali pa se zelo slabo vežejo in se pri spiranjih sperejo.

Naša napoved, kateri deli molekule TLR15 naj bi bili nosilci epitopov, je bila pravilna samo za enega od štirih peptidov. V imunskem serumu, kjer so prisotna vsa protitelesa, ki jih je miška ustvarila proti rekombinantnemu proteinu, smo zasledili pozitivno reakcijo samo s Peptidom 1, torej so bila prisotna samo protitelesa proti epitopu na tem peptidu. Napoved epitopov smo naredili glede na strukturo native molekule TLR15, miško pa smo imunizirali z rekombinantnim proteinom TLR15, za katerega pa ne moremo trditi, da je v celoti enak nativnemu proteinu, zato smo verjetno izgubili kakšen epitop.

Ob preverjanju supernatantov klonov, smo z uporabo antigena - Peptida 1, pridobili monoklonsko protitelo proti Peptidu 1. Celice klona, ki proizvajajo monoklonska protitelesa proti Peptidu 1 smo poimenovali 5B1/B6. Sklepamo, da se Peptid 1 nahaja na površini proteina TLR15 in je zato miška izdelala protitelesa, ki so prepoznala ta peptid oz. epitop na peptidu.

Sekundarna protitelesa lahko vplivajo na intenziteto barvne reakcije, zato smo pri preverjanju prisotnosti specifičnih protiteles v supernatantih klonov z metodo iDIBA, preverili obarvanje zaradi reakcije sekundarnih protiteles: kozjih in kunčjih protiteles proti IgG, konjugiranih s peroksidazo. Dokazali smo, da so za preverjanje prisotnosti specifičnih protiteles v



supernatantih klonov z metodo iDIBA, bolj uporabna kunčja sekundarna protitelesa proti IgG, konjugirana s peroksidazo, ker dajejo bolj značilno modro barvo ob razgradnji substrata, kar je pomembno pri metodah, kjer je ocena subjektivna.

Če primerjamo poliklonska in monoklonska protitelesa, je pridobivanje večjih količin poliklonskih protiteles veliko cenejše in poteka hitreje, kot pridobivanje monoklonskih protiteles. Monoklonska protitelesa so specifična za določen epitop in so popolnoma enaka in zato primerna za uporabo pri kliničnih testih in v terapevtske namene, kjer morajo biti postopki standardizirani, medtem ko so poliklonska protitelesa nespecifična in lahko prepoznavajo več epitopov. Poliklonska protitelesa so lahko zelo uporabno orodje ko ne poznamo antigena. Ker se poliklonska protitelesa vežejo na več epitopov, lahko z njimi povečamo signal proteina, ki ga raziskujemo. Velika prednost mAb je, da imajo hibridomi neomejeno življenjsko dobo v pogojih *in vitro*, zato lahko izločajo neomejene količine visoko specifičnih protiteles, medtem ko moramo poliklonska protitelesa proti določenemu antigenu pridobivati vedno znova, pri čemer pa nikoli ne moremo pridobiti identičnih poliklonskih protiteles dvakrat (Lipman in sod., 2005).

Po dostopnih podatkih so na voljo samo poliklonska protitelesa proti TLR15. V raziskavi Oven in sod. (2013) so s kunčjimi poliklonskimi protitelesi proti TLR15 določili prisotnost TLR15 po ločitvi proteinov s SDS-page elektrofrezno. V raziskavi so določili nov ligand za TLR15, diacetiliran lipopeptid.

Monoklonska protitelesa proti TLR15 so primerna predvsem za raziskovalno delo (za detekcijo proteina po prenosu po Westernu, za študije interakcije proteina TLR15 z drugimi proteini, za blokado receptorja z mAb in preučevanje, če posledično ne pride do aktivacije signalnih poti).

## 6 POVZETEK

TLR so pomembna komponenta prirojenega imunskega sistema pri sesalcih in ptičih. Njihova vloga je vezana na prepoznavanje motivov PAMP. Pogosta značilnost molekul PAMP je, da imajo pomembno fiziološko vlogo in so esencialni za preživetje patogena, kar pomeni, da bi inaktivacija tega motiva močno neugodno vplivala na preživetje patogena. Prav to pa je namen imunske obrambe preko signalnih poti, ki se sprožijo ob vezavi TLR. Do danes so pri ptičih odkrili 10 TLR (TLR1, tip 1 in 2; TLR2 tip 1 in 2; TLR3; TLR4; TLR5; TLR7; TLR15 in TLR21).

TLR15 je receptor, ki ga najdemo samo pri ptičih. Njegova vloga je slabo raziskana, vedno več je raziskav, s katerimi želijo odkriti ligand, ki aktivira TLR15 oz. transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B.

V magistrski nalogi smo s klasično tehnologijo poskušali pripraviti monoklonska protitelesa proti TLR15. Z rekombinantnim proteinom TLR15, pridobljenim v *E.coli*, smo štirikrat imunizirali miško Balb/c. Po žrtvovanju miške, smo izvedli fuzijo mielomskih in vraničnih celic in pridobili hibridome. Proteine iz vzorca lizata *E.coli* z TLR15 in proteine iz vzorca lizata *E.coli* brez TLR15 smo ločili s SDS-page elektroforezo in proteine prenesli po Westernu na membrano. Rezultate smo primerjali in določili položaj rekombinantnega proteina TLR15 (100-135 kDa), opazili pa smo tudi liso pri velikosti 48 kDa, za katero smo po predhodnih raziskavah (Debeljak in sod., neobjavljeni rezultati) sklepali, da predstavlja krajši produkt TLR15. Membrane smo ustrezno razrezali in z njimi preverjali prisotnost specifičnih protiteles proti TLR15, v supernatantih hibridomov in kasneje klonov. Pozitivna kontrola je bil imunski serum (redčen 1:500). Ker po večkratnih preverjanjih prisotnosti specifičnih protiteles proti TLR15 v supernatantih hibridomov še vedno nismo uspeli zagotovo določiti položaja TLR15 na membrani, smo nadaljevali preverjanje specifičnih protiteles proti TLR15 in odbiro klonov s podenotami TLR15, s komercialnimi sintezniimi peptidi, ki smo jih pridobili z napovedovanjem epitopov s programom AbcPred. V imunskem serumu, kjer so prisotna vsa protitelesa, tudi tista, ki jih je miška ustvarila proti rekombinantnem proteinu, smo zasledili pozitivno reakcijo samo s Peptidom 1, torej so bila prisotna protitelesa proti epitopu na tem peptidu. Preverjanje prisotnosti mAb, specifičnih za TLR15 smo nadaljevali s Peptidom 1 z metodo iDIBA in uspeli pridobiti monoklonsko protitelo, ki je specifično reagiralo s Peptidom 1. Celice, ki so proizvajale monoklonsko protitelo proti Peptidu 1 smo poimenovali 5B1/B6.

Potrdili smo našo domnevo, da je receptor TLR15 imunogena molekula za miško in je zato aktivirala pridobljeni imunski odziv in v okviru tega limfocite B.

Pridobljena monoklonska protitelesa se bodo lahko uporabljala za evolucijske študije, za raziskave delovanja TLR15 in interakcije z ligandom.

## 7 VIRI

Abnova. 2015.

<http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7B70196CA1-59B1-40D0-8394-19F533EB108F%7D> (2. marec 2015)

Alcaide M., Edwards S.V. 2011. Molecular Evolution of the Toll-Like Receptor Multigene Family in Birds. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 5: 1703–1715

Brownlie R., Allan B. 2011. Avian toll-like receptors. *Cell and Tissue Research*, 343: 121–130

Benčina D., Kleven S.H., Elfaki M.G., Snoj A., Dovč P., Dorrer D., Russ I. 1994. Variable expression of epitopes on the surface of *Mycoplasma gallisepticum* demonstrated with monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 23: 19-36

Boyd A.C., Peroval M.Y., Hammond J.A., Prickett M.D., Young J.R., Smith A.L. 2012. TLR15 is unique to avian and reptilian lineages and recognizes a yeast-derived agonist. *The Journal of Immunology*, 189: 4930-4938

Ciraci C., Lamont S.J. 2011. Avian-specific TLRs and downstream effector responses to CpG-induction in chicken macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 35: 392-398

Cormican P., Lloyd A.T., Downing T., Connell S. J., Bradley D., O'Farrelly C. 2009. The avian Toll-like receptor pathway - Subtle differences amidst general conformity. *Developmental and Comparative Immunology*, 33: 967-937

Davison F. 2008. The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features. V: *Avian Immunology*. 1<sup>st</sup>ed. Davison F., Kaspers B., Schat K.A. (eds.). London, Elsevier: 1-11.

Debeljak N. Rekombinantni TLR15. Ljubljana, Biotehniška fakulteta (neobjavljeno)

Goding J. 1986. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology*. 2<sup>nd</sup> ed. London, Academic Press: 315 str.

Harlow E., Lane D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. 1<sup>st</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 726 str.

Higgs R., Cormican P., Cahalene S., Allan B., Lloyd A.T., Meade K., James T., Lynn D.J., Babiuk L.A., O'Farrelly C. 2006. Induction of a novel Toll-Like Receptor following

- Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection. *Infection and Immunity*, 74, 3: 1692-1698
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. 2005. *Immunobiology the immune system in health and disease*. 6<sup>th</sup> ed. Lawrence E. (ed.). New York, Garland Science Publishing: 823 str.
- Kasamatsu J. 2013. Evolution of innate and adaptive immune systems in jawless vertebrates. *Microbiology and Immunology*, 57: 1–12
- Keestra A.M., Zoete M.R, Bouwman L.I., Vaezirad M.M., Putten J.P.M. 2013. Unique features of chicken Toll-like receptors. *Developmental and Comparative Immunology*, 41: 316–323
- Kočevar N., Kreft S., Obermajer N. 2007. Identifikacija in karakterizacija bioloških zdravil ter analiza bioloških vzorcev. V: *Biološka zdravila. Od gena do učinkovine*. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 136-184
- Köhler G. Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497
- Liddel J.E., Cryer A. 1991. *A practical guide to monoclonal antibodies*. New York, John Wiley: 98 str.
- Lipman N.S., Jackson L.R., Trudel L.J, Weis-Garcia F. 2005. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46, 3: 258-268
- Medzhitov R. 2008. *The Innate Immune System*. V: *Fundamental Immunology*. 6<sup>th</sup> ed. Paul W.E. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1603 str.
- Nerren J.R., He H., Genovese K., Kogut M.H. 2010. Expression of the avian-specific toll-like receptor 15 in chicken heterophils is mediated by Gram-negative and Gram-positive bacteria, but not TLR agonists. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 136: 151–156
- Obermajer N., Premzl A., Kos J. 2007. *Terapevtska monoklonska protitelesa V: Biološka zdravila. Od gena do učinkovine*. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 532-578
- Oven I., Rus K.R., Dušanić D., Benčina D., Keeler C.L., Narat M. 2013. Diacylated lipopeptide from *Mycoplasma synoviae* mediates TLR15 induced innate immune responses. *Veterinary Research*, 44: 1-11

- Paul M.S., Brisbin J.T., Abdul-Careem M.F., Sharif S. 2013. Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152: 191–199
- Ponomarenko J.V., Regenmortel M.H.V. 2009. B – cell Epitope prediction. V: *Structural Bioinformatics*. 2<sup>nd</sup> ed. Gu J., Bourne P. E. (eds.). New Jersey, John Wiley&Sons: 849-879
- Ramassamy K.T., Reddy A.R., Verma P.C., Murugesab S. 2012. Expression analysis of turkey (*Meleagris gallopavo*) toll-like receptors and molecular characterization of avian specific TLR15. *Molecular Biology Reports*, 39: 8539–8549
- Roach J., Glusman G., Rowen L., Kaur A., Purcell M.K., Smtih K.D., Hood L.E., Aderem A. 2005. The evolution of vetrebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 27: 9577-9582
- Schultz U., Magor K.E. 2008. *Comparative Immunology of Agricultural Birds*. V: *Avian Immunology*. 1<sup>st</sup>ed. Davison F., Kaspers B., Schat K.A. (eds.). San Diego, Elsevier: 481 str.
- Vozelj M. 2000. *Temelji imunologije*. 1. izd. Ljubljana, Založba DZS: 552 str.
- Zoete M.R., Bouwman L.I., Kestra A. M., Putten J.P.M. 2011. Cleavage and activation of a Toll-like receptor by microbial proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 4968–4973
- Zhou Z., Wang Z., Cao L., Hu S., Zang Z., Qin B., Guo Z., Nie K. 2013. Upregulation of chicken TLR4, TLR15 and MyD88 in heterophils and monocyte-derived macrophages stimulated with *Eimeria tenella* in vitro. *Experimental Parasitology*, 133: 427 - 433

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat za usmeritve in napotke pri delu v celičnem laboratoriju ter vso pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Posebej se zahvaljujem dr. Ivanki Cizelj za vso pomoč pri delu v laboratoriju.

Hvala somentorici asist.dr. Ireni Oven za pomoč pri pisanju magistrske naloge.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Olgi Zorman Rojs za hiter in temeljit pregled magistrske naloge.

Hvala staršem, sestrama, bratu in možu za vso podporo!