

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vida FORSTNERIČ

**UČINEK MUTACIJ FLAGELINA NA NJEGOVO
FUNKCIONALNOST IN VLOGO PRI STIMULACIJI
IMUNSKEGA SISTEMA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vida FORSTNERIČ

**UČINEK MUTACIJ FLAGELINA NA NJEGOVO
FUNKCIONALNOST IN VLOGO PRI STIMULACIJI IMUNSKEGA
SISTEMA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF FLAGELLIN MUTATIONS ON FUNCTIONAL
PROPERTIES AND IT'S ROLE IN STIMULATION OF THE
IMMUNE SYSTEM**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Študijska komisija meddodelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 8.6.2011 na osnovi Pravilnika o diplomskem delu za mentorja imenovala prof. dr. Simona Horvata, za somentorico je bila imenovana dr. Mojca Benčina in za recenzentko prof. dr. Mojca Narat.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Simon HORVAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: dr. Mojca BENČINA
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biotehnologijo

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Vida Forstnerič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579:577.27(043.2)=163.6
KG	mikrobiologija/bakterije/flagelin/imunologija/TLR
AV	FORSTNERIČ, Vida
SA	HORVAT, Simon (mentor)/BENČINA, Mojca (somentor)/NARAT, Mojca (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2011
IN	UČINEK MUTACIJ FLAGELINA NA NJEGOVO FUNKCIONALNOST IN VLOGO PRI STIMULACIJI IMUNSKEGA SISTEMA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 77 str., 23 pregl., 26 sl., 3 pril., 45 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Toll-u podobni receptorji (TLR) so receptorji prirojene imunosti, pomembni za prepoznavo ohranjenih bakterijskih motivov. TLR5 prepozna bakterijski flagelin, glavni strukturni protein bakterijskega bička, strukture, ki bakterijam omogoča gibljivost. Nekaj ključnih aminokislin flagelina, z dokazano vlogi pri aktivaciji TLR5, je prav tako ključnih za gibljivost bakterijskega bička in posledično za gibljivost bakterij. Nahajajo se namreč na površini, ki predstavlja stik med monomeri flagelina, ko se le-ti sestavijo v funkcionalen protofilament. Mutacije v tej regiji in v njeni bližini dokazano vplivajo na sestavo funkcionalnega protofilamenta in tako na gibljivost bička. V diplomskem delu smo pripravili mutacije v N-terminalni (R90A, R90D, R90N, E83R, E93R) in C-terminalni (N438D in R431D) ohranjeni regiji flagelina in preučili njihov vpliv na gibljivost. Pokazali smo, da vse mutacije zmanjšajo gibljivost, najverjetneje na račun nepravilne sestave bakterijskega protofilamenta. TLR5 je transmembranski protein tipa I, sestavljen iz citoplazemske domene TIR, potrebne za signalizacijo, transmembranske domene in ektodomene, odgovorne za vezavo liganda. Dimerizacija domen TIR je nujen pogoj za aktivacijo signalne poti. To se zgodi ob vezavi liganda, vendar za TLR5 še ni poznan natančen mehanizem interakcije z ligandom in dimerizacije receptorja. V diplomskem delu smo s pomočjo metode FRET in metode cepljenih proteinov preverjali orientacijo TLR5 v homodimeru. Na N-terminalni konec ektodomene receptorja smo vezali po enega iz para fluorescentnih proteinov, potrebnih za FRET ali po en del (N-terminalni in C-terminalni) rumenega fluorescentnega proteina mCitrin. Predpostavljali smo, da če receptor dimerizira na način, da sta ob stimulaciji s flagelinom N-terminalna konca receptorja v zadostni bližini, pride do FRETa oz. v primeru metode cepljenih proteinov sestave funkcionalnega rumenega fluorescenčnega proteina. Pripravljeni fuzijski proteini so bili ob stimulaciji s flagelinom neaktivni, niti niso značilno lokalizirali na plazemski membrani, kot bi pričakovali za receptor TLR5. Fuzija na N-terminalnem koncu očitno vpliva na funkcionalnost receptorja in vezavo liganda.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579:577.27(043.2)=163.6
CX microbiology/bacteria/flagellin/immunology/TLR
AU FORSTNERIČ, Vida
AA HORVAT, Simon (supervisor)/BENČINA, Mojca (co-supervisor)/NARAT, Mojca (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2011
TI THE EFFECT OF FLAGELLIN MUTATIONS ON FUNCTIONAL PROPERTIES AND IT'S ROLE IN STIMULATION OF THE IMMUNE SYSTEM
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 77 p., 23 tab., 26 fig., 3 ann., 45 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Toll-like receptors (TLR) are an important family of receptors of the innate immune system that recognise conserved pathogen-associated molecular patterns. TLR5 recognises a conserved site on bacterial flagellin, the main structural protein of the flagella, an organel which promotes bacterial motility. The site of recognition by TLR5 has been mapped to a region in the N- and C-terminal sequence of flagellin, the same region proven necessary for filament formation and motility. These aminoacid residues lie on the convex surface of contact between adjacent flagellin monomers, stacked together to form functional protofilaments. Mutations in and around this area have been shown to abrogate bacterial motility . We have prepared mutations in the N-terminal conserved region (R90A, R90D, R90N, E93R, E83R) and the C-terminal conserved region (N438D and R431D) of flagellin and examined their effect on bacterial motility. Our work demonstrates that all of the mutations decrease bacterial motility, most likely due to incorrect protofilament assembly. TLR5 is a type I transmembrane protein, consisting of a large ligand-binding ectodomain, a transmembrane domain and a cytoplasmic TIR domain. Ligand recognition induces dimerisation of TLR5, which is essential for signaling, although the exact nature of the interaction remains unknown. In our work we have used fluorescent resonance energy (FRET) studies and a split fluorescent protein reconstitution assay to examine the orientation of the TLR5 homodimer. We prepared TLR5 fused at the N terminus to mCitrine (FRET acceptor) and mCerulean (FRET donor) and TLR5, fused at the N terminus to 'halves' of the yellow fluorescent protein, mCitrine. If the position of two TLR5 monomers in a homodimer is such that the monomers are parallel to each other, the N terminal region of each monomer would be in sufficient proximity for fluorescence energy transfer to occur between donor and acceptor molecules, or for reconstitution of the fluorescent protein 'halves'. Our studies show that these fusion proteins are localised in the endoplasmic reticulum and endosomes, rather than on the plasma membrane and are unable to activate TLR5 signaling. N-terminal fusions seem to have an impact on TLR5 conformation and ligand binding.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
Slovarček	XIV
 1 UVOD	 1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
 2 PREGLED OBJAV	 3
2.1 IMUNSKI SISTEM.....	3
2.1.1 Prirojena imunost	3
2.1.2 Pridobljena imunost	4
2.1.3 Receptorji Toll in TLR.....	5
2.1.4 Receptor TLR5	8
2.2 FLAGELIN.....	11
2.2.1 Zgradba flagelina.....	12
2.3 INTERAKCIJA MED FLAGELINOM IN TLR5	13
2.4 FRET	15
2.4.1 Bledenje akceptorja	16
2.5 METODA CEPLJENIH PROTEINOV	17
2.6 LEPLJENJE PO GIBSONU	17
 3 MATERIALI IN METODE	 20
3.1 MATERIALI	20
3.1.1 Kemikalije	20
3.1.2 Raztopine, pufri in standardi.....	21
3.1.3 Laboratorijska oprema	23
3.1.4 Uporabljeni protitelesa.....	24
3.1.5 Uporabljeni plazmidi.....	24
3.1.6 Oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo	26

3.1.7 Organizmi.....	27
3.1.8 Gojišča	27
3.1.8.1 Gojišča za bakterije	27
3.1.8.2 Gojišča za celične kulture.....	28
3.2 METODE	28
3.2.1 Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin	28
3.2.2 Priprava genskih konstruktov	29
3.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	29
3.2.2.2 Elektroforeza DNA na agaroznem gelu.....	31
3.2.2.3 Čiščenje DNA fragmentov iz gela.....	31
3.2.2.4 Merjenje koncentracije DNA.....	31
3.2.2.5 Lepljenje po Gibsonu	32
3.2.2.6 Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i>	33
3.2.2.7 Transformacija bakterije <i>S. typhimurium</i>	34
3.2.2.8 3.2.2.6 Izolacija plazmidne DNA	35
3.2.2.9 Rezanje DNA z restrikcijskimi encimi.....	35
3.2.2.10 Določevanje nukleotidnega zaporedja.....	35
3.2.2.11 Točkovna mutageneza	35
3.2.3 Test giblivosti.....	36
3.2.4 Izolacija proteinov	37
3.2.4.1 Transformacija in precepljanje v tekoče gojišče LB	37
3.2.4.2 Fermentacija in indukcija izražanja proteina.....	37
3.2.4.3 Liza celic.....	38
3.2.4.4 Soniciranje	38
3.2.5 Delo s celičnimi kulturami HEK293	39
3.2.5.1 Gojenje človeških celičnih kultur HEK293.....	39
3.2.5.2 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293	39
3.2.5.3 Dvojni luciferazni test	40
3.2.5.4 Fiksacija celic za delo z mikroskopom.....	41
3.2.5.5 Določanje izražanja proteinov	41
3.2.6 Konfokalna mikroskopija	43
4 REZULTATI.....	45
4.1 VPLIV MUTACIJ FLAGELINA NA GIBLJIVOST BAKTERIJ	45
4.2 PRIPRAVA S FLUOROFORI OZNAČENEGA FLAGELINA	48
4.3 DIMERIZACIJA RECEPTORJA TLR5 PO STIMULACIJI S FLAGELINOM... 50	
4.3.1 Metoda FRET	50
4.3.1.1 Priprava genskih konstruktov za metodo FRET.....	50
4.3.1.2 Celična lokalizacija receptorja TLR5, označenega s fluorescentnim reporterski proteinom na N ali C-terminalnem koncu	52

4.3.1.3	Sposobnost aktivacije himernih proteinov mCIT-TLR5 in mCER-TLR5 s flagelinom	54
4.3.1.4	Izvedba metode FRET	55
4.4	CEPLJENI PROTEINI	60
4.4.1	Priprava genskih konstruktov s cepljenimi proteini	60
4.4.2	Aktivnost himernih receptorjev TLR5 s cepljenimi proteini N-citrin in C-citrin vezanimi na N-terminalni del	61
4.4.3	Dokaz izražanja konstruktov cepljenih proteinov	62
4.4.4	Opazovanje sestavljanja cepljenih proteinov	63
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	65
5.1	RAZPRAVA	65
5.1.1	Vpliv mutacij flagelina na gibljivost	65
5.1.2	Dimerizacija flagelina	67
5.1.3	Dimerizacija receptorja TLR5	67
5.1.4	Priprava konstruktov z metodo lepljenja po Gibsonu	69
5.2	SKLEPI	70
6	POVZETEK	71
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Kemikalije in encimi, uporabljeni v diplomskem delu	20
Preglednica 2: Uporabljeni komercialno dostopni kompleti	21
Preglednica 3: Raztopine, pufri in standardi, uporabljeni pri detekciji in izolaciji proteinov	21
Preglednica 5: Raztopine in pufri uporabljeni za delo s človeškimi celičnimi kulturami ...	22
Preglednica 6: Uporabljena laboratorijska oprema	23
Preglednica 7: Uporabljena protitelesa.....	24
preglednica 8: Uporabljeni vektorji in plazmidi.....	24
Preglednica 9: Oligonukleotidi, uporabljeni v diplomskem delu	26
Preglednica 10: bakterijski sevi, uporabljeni v diplomskem delu	27
Preglednica 11: Celične kulture, uporabljene v diplomski nalogi.....	27
Preglednica 12: Tekoče LB gojišče	27
Preglednica 13: Trdno LB gojišče	27
Preglednica 14: Poltrdno LB gojišče za testiranje gibljivosti.....	28
Preglednica 15: Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR s polimerazo PfuUltra HF za eno reakcijo	29
Preglednica 16: Temperaturni profil reakcije PCR, uporabljene za postopek točkovne mutageneze s polimerazo PfuUltra HF	30
Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR s polimerazo AccuPrime Pfx za eno reakcijo	30
Preglednica 18: Temperaturni profil reakcije PCR s polimerazo AccuPrime Pfx	30
Preglednica 19: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo lepljenja po Gibsonu	32
Preglednica 20: sestava 10% ločitvenega SDS gela (volumen za 2 gela)	41
Preglednica 21: sestava 4% vstopnega SDS gela (volumen za 2 gela)	42
Preglednica 22: Mutacije flagelina in njihov vpliv na gibljivost bakterij	47
Preglednica 23: Učinkovitost FRETa	59

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Struktura TLR (Guy in sod., 2006)	6
Slika 2: Signalne poti membranskih TLR (Akira in sod., 2010).....	8
Slika 3: Od MyD88 odvisna pot aktivacije (Akira in Takeda, 2004).....	10
Slika 4: Struktura bakterijskega bička (Steiner, 2007)	12
Slika 5: Struktura filamenta bička bakterije <i>S. typhimurium</i> (A) in bakterije <i>C. jejuni</i> (B) (Galkin in sod., 2008).....	12
Slika 6: Struktura in polimerizacija flagelina bakterije <i>S. typhimurium</i> (Yonekura in sod., 2003).....	13
Slika 7: Regije flagelina, pomembne pri aktivaciji TLR5 (Zoete in sod., 2010)	14
Slika 8: Ekscitacijski in emisijski spektri YFP in CFP (Zaccolo, 2004).....	16
Slika 9: Shematski prikaz metode SPLIT YFP za dokaz medmolekulskih interakcij (Hu in sod., 2002)	17
Slika 11: Shematski prikaz priprave fragmentov za združevanje z uporabo metode lepljenja po Gibsonu.....	33
Slika 12: Test gibljivosti.....	46
Slika 13: Shematski prikaz pripravljenih plazmidov pFlic-mCer in pFliC-mCit.....	49
Slika 15: Shematski prikaz konstruktov za metodo FRET.....	51
Slika 16: Izražanje in celična porazdelitev himernih proteinov mCIT-TLR5, mCER-TLR5 in TLR5-CFP v celicah HEK293.	52
Slika 17: Izražanje in prostorska porazdelitev mCIT-TLR5 in mCER-TLR5 v celicah HEK293 pred in po stimulaciji s flagelinom.....	53
Slika 18: Grafični prikaz aktivnosti himernih proteinov, izražene v relativnih luciferaznih enotah.	54
Slika 19: pozitivna kontrola metode FRET.	56
Slika 20: negativna kontrola metode FRET	57
Slika 21: FRET nestimuliranih celic, ki izražajo himerne proteine mCER-TLR5 in mCIT- TLR5	58
Slika 22: FRET s flagelinom stimuliranih celic, ki izražajo himerne proteine mCER-TLR5 in mCIT-TLR5.	59

Slika 23: Shematski prikaz genetskih konstruktov cepljenih proteinov, preko linkerja vezanih na TLR5.	61
Slika 24: Aktivnost himernih proteinov SPLIT1 in SPLIT2, izražena v relativnih luciferaznih enotah.	62
Slika 25: Določevanje proteinov SPLIT1 in SPLIT2 v celičnem lizatu.....	63
Slika 26: Celice HEK293, transficirane s plazmidi pSplit1 in pSplit2 in z pEEA1-mCherry, za kontrolo transfekcije.	64

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina, aminokislinski ostanek
Amp	ampicilin
ang.	Angleško
APC	antigen predstavljajoče 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
DC	dendritične celice
DD	domena smrti (ang. <u>d</u> eath <u>d</u> omain)
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)
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	etidijev bromid
FBS	fetalni telečji serum (ang. fetal bovine serum)
FliC	flagelin bakterije <i>Salmonella typhimurium</i>
Fluc	kresničkina luciferaza
FRET	Fluorescenčni prenos resonančne energije (ang. Fluorescence resonance energy transfer)
HEK293	trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (ang. human embryonic kidney cell line)
His	histidinski rep sestavljen iz 6 histidinov
INF	interferon
IKK	inhibitorna kapa B kinaza (ang. IκB kinase)

IL	interlevkin
IL-1R	receptor za interlevkin-1 (ang. interleukin-1 receptor)
IPTG	izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (ang. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)
IRAK	kinaza, povezana z receptorjem IL-1 (ang. IL-1 receptor-associated kinase)
LB	gojišče Luria-Bertani
LPS	lipopolisaharid, imenovan tudi endotoksin
LRR	z levcinom bogate ponovitve (ang. leucine-rich repeat)
MAPK	od mitogena aktivirana proteinska kinaza (ang. Mitogen activated protein kinase)
MD-2	mieloidni diferenciacijski protein 2 (ang. myeloid differentiation protein 2)
MQ	mili Q voda, dodatno očiščena deionizirana voda
MyD88	diferenciacijski mieloidni protein 88 (ang. myeloid differentiation primary-response protein 88)
NF- κ B	jedrni faktor κ B
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)
RLE	relativne luciferazne enote
Rluc	<i>Renilla</i> luciferaza
RNK	ribonukleinska kislina
SDS	natrijev dodecil sulfat
TAK1	s transformirajočim rastnim faktorjem β aktivirana kinaza 1 (ang. transforming growth factor- β -activated kinase 1)

TBK1	vezavna kinaza (ang. TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1)
TCR	T celični receptor
TEMED	N,N,N,N -tetrametil-etilendiamin
TICAM-1	adapterski protein, znan tudi kot TRIF (ang. TIR-domain-containing molecule 1)
TICAM-2	adapterski protein, znan tudi kot TRAM (ang. TIR-domain-containing molecule 2)
TIR	domena Toll-interlevkinskega receptorja (ang. Toll-interleukin receptor domain)
TLR	Tollu-podoben receptor (ang. Toll-like receptor)
TNF	dejavnik tumorske nekroze (ang. tumor necrosis factor)
TRAF 6	faktor povezan z receptorjem za TNF (ang. TNF receptor-associated factor 6)
TRAM	adapterski protein soroden TRIF (ang. TRIF-related adaptor molecule)
TRIF	adapterski protein, ki vsebuje domeno TIR (ang. TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF- β)
Tween 20	polioksietilensorbitan monolavrat
vrt./min	vrtljaji na minuto
% (m/v)	Odstotni delež mase snovi v volumnu (1% pomeni 1g v 100 ml)

SLOVARČEK

<i>Salmonella typhimurium</i>	Po Gramu negativna, običkana, fakultativno anaerobna enterobakterija. <i>S. typhimurium</i> povzroča pri človeku bolezenske simptome, kot so diareja, povišana telesna temperatura in bolečine v abdominalnem predelu. Prenaša se večinoma preko fecesa.
Flagelin	Flagelin je glavni strukturni protein bakterijskega bička, strukture, ki omogoča gibljivost. Sestavljen je iz štirih domen, N- in C-terminalni regiji sekvence sta med vrstami dobro ohranjeni, medtem ko osrednji del kaže visoko stopnjo variabilnosti.
TLR5	Tollu-podoben receptor 5 je zgrajen iz zunajcelične ektodomene, ki vsebuje z levcini bogate ponovitve in veže ligand, transmembranskega dela in citoplazemske domene TIR, odgovorne za signalizacijo. Na svoji površini ga izražajo monociti, dendritične celice, epiteljske celice in mastociti.
FRET	FRET ali fluorescenčni resonančni prenos energije (ang. fluorescence resonance energy transfer) je biofizikalni pojav, pri katerem se iz ene fluorescentne molekule (donor) energija prenese na drugo (akceptor), kar lahko zaznamo preko povišane emisije fluorescentne energije pri valovni dolžini akceptorja. Pojav izkoriščamo pri metodi FRET.
Cepljeni proteini	Pri metodi cepljenih proteinov razdelimo fluorescentni protein na dve podenoti, ki se ob zadostni bližini sestavita v funkcionalni fluorofor, kar zaznamo z merjenjem fluorescence fluorofora.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Flagelin je glavni strukturni protein bakterijskega bička, strukture, ki ima pomembno vlogo pri gibljivosti bakterij. Hkrati pa flagelin večine bakterijskih vrst aktivira imunski sistem sesalcev, saj deluje kot agonist Toll-u podobnega receptorja 5 (TLR5) (Hayashi in sod., 2001). Flagelin se veže na TLR5 in aktivira signalno pot s končnim učinkom aktivacije prirojenega imunskega odziva. N- in C- konca flagelina sta evolucijsko dobro ohranjena med posameznimi bakterijskimi vrstami (Samatey in sod., 2001). S pomočjo študij mutageneze so Smith in sod. (2003) dokazali, da imajo prav nekateri ohranjeni deli molekule ključno vlogo tako pri mobilnosti bakterij, kot tudi pri aktivaciji TLR5.

TLR5 je membranski receptor, sestavljen iz treh domen, ektodomene, transmembranskega dela in citoplazmatske domene TIR, katere dimerizacija je predpogoj za aktivacijo signalne poti (Akira in Takeda, 2004). Za dimerizacijo je potrebna vezava liganda. V literaturi je nekaj predlaganih modelov vezave flagelina in dimerizacije TLR5, vendar natančen mehanizem še ni poznan (Andersen-Nissen in sod., 2007). Natančnejši vpogled v mehanizem interakcije bi pomenil pomembno odkritje na področju raziskav delovanja receptorjev TLR.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V nalogi smo pripravili nekatere nove točkovne mutacije v ohranjenem delu flagelina in preučili njihov vpliv na gibljivost bička.

Pripravili smo fuzijske proteine TLR5 s fluorofori, vezanimi na N-terminalnem koncu ektodomene. Z metodo FRET ali fluorescenčni prenos resonančne energije (ang. "fluorescence resonance energy transfer") in metodo cepljenih proteinov smo skušali pokazati mehanizem dimerizacije in signalizacije ob stimulaciji receptorja TLR5 s flagelinom.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Točkovne mutacije v ohranjenih delih flagelina zmanjšajo gibljivost bička.
- Ob aktivaciji s flagelinom receptor TLR5 tvori dimere in aktivira signalno pot.
- Pri konformaciji dimera, v kateri bi bila N-terminalna konca himerne TLR5 v zadostni bližini, bo možno zaznati fluorescentni resonančni prenos energije (oz. pri uporabi metode cepljenih proteinov sestavo funkcionalnega rumenega fluorescenčnega proteina).

2 PREGLED OBJAV

2.1 IMUNSKI SISTEM

S pojmom imunski sistem opišemo nabor tkiv, celic in molekul, ki služijo obrambi pred tujki, njihovo koordinirano delovanje in končni učinek imenujemo imunski odziv. Tekom evolucije so se razvili številni nivoji zaščite gostiteljskega organizma pred vdorom patogenih mikroorganizmov. Enostavnejše in manj specifične mehanizme obrambe, ki jih najdemo pri prav vseh mnogoceličnih organizmih, uvrščamo med tako imenovano prirojeno imunost. Za vretenčarje so poleg te, osnovne oblike obrambe, značilni tudi visoko specifični efektorski mehanizmi, ki omogočajo prepoznavanje in nevtralizacijo okužb, uvrščamo jih med t.i. pridobljeno imunost. Pri višjih organizmih je za učinkovito obrambo ključna interakcija med prirojenim in pridobljenim imunskim sistemom (Abbas in Lichtman, 2007).

2.1.1 Prirojena imunost

Prirojeni imunski sistem predstavlja filogenetsko najstarejšo obliko zaščite in pri človeku predstavlja prvo linijo obrambe pred okužbo. V nasprotju s pridobljeno imunostjo so elementi obrambe prisotni še pred vdorom patogena, ob interakciji pa je značilen izredno hiter odziv. Druga pomembna vloga prirojene imunosti je aktivacija nekaterih efektorskih funkcij pridobljene imunosti in tako usmerjanje celovitega imunskega odgovora organizma. kot posledica koevolucije patogena in gostitelja je za prirojeno imunost predvsem značilno prepoznavanje nekaterih ohranjenih komponent bakterij in virusov, ki so pogosto esencialne za njihovo preživetje in razmnoževanje, imenujemo jih molekularni motivi patogenih mikroorganizmov oziroma PAMP (ang. »Pathogen Associated Molecular Patterns«). Najbolj značilni so npr. lipopolisaharid (LPS), ki je sestavni del bakterijske celične stene ali dvoverižna RNA, ki je esencialna za razmnoževanje nekaterih virusov, nekateri drugi primeri so flagelin, manani, lipoproteini, nemetilirani CpG oligonukleotidi in peptidoglikani (Medzhitov in Janeway, 2002). V gostitelju jih prepoznavajo receptorji PRR (ang. »Pathogen Recognition Receptor«). Koncept PRR-jev je prvi postavil C. Janeway leta 1989. V nasprotju z receptorji pridobljene imunosti so PRR konstitutivno izraženi v različnih celičnih tipih, ne samo imunskih celicah, izraženi produkti pa odsevajo

zapis v genomu. Ocenjujejo, da lahko prirojeni imunski sistem prepozna okoli 10^3 različnih mikrobnih motivov, medtem ko je pridobljeni imunski sistem sposoben razlikovati med vsaj 10^7 različnimi motivi (Abbas in Lichtman, 2007). Celice, v katerih so izraženi receptorji PRR, vključujejo nevtrofilce, makrofage, dendritične celice in endotelialne celice ter številni drugi celični tipi (npr. adipocite, celice placente, celice raznih žlez ipd.). Receptorji PRR so lokalizirani na površju celic, v endosomalnih veziklih in v citoplazmi. Specifični PRR prepoznavajo specifične PAMP, ob vezavi liganda se sproži specifična signalna pot in ustrezni celični oz. sistemski odgovor (Abbas in Lichtman, 2007). Eni od najpomembnejših in najbolj raziskanih PRR-jev so t.i. Tollu podobni receptorji ali TLR (ang. »Toll Like Receptors«).

2.1.2 Pridobljena imunost

Pridobljeni imunski odgovor se razvije počasneje kot prirojeni, vendar je zanj značilna večja diverziteta, specifika in imunski spomin, ki omogoča hiter in ojačan odziv ob morebitni ponovni okužbi. Glavne celice pridobljene imunosti so limfociti B in T, nastajajo v primarnih limfatičnih organih in nosijo antigensko specifične receptorje, nastale v procesu somatske rekombinacije genov, ki kodirajo variabilne regije receptorjev. Dodatno variabilnost omogočajo še drugi mehanizmi mehanizmi kot somatske hipermutacije, ne-homologno zlepljanje koncev pri menjavi izotipov idr. Nato v fazi zorenja in selekcije pride do izbora limfocitov s funkcionalnimi antigenskimi receptorji z ustrezno specifikom. Celicam do srečanja z antigenom pravimo naivne celice, po srečanju pa se te naivne celice diferencirajo v efektorske in spominske celice. Pridobljeni imunski sistem delimo na humoralno imunost, kjer imajo bistveno vlogo limfociti B in celično posredovano imunost, ki temelji na antigen predstavljajočih celicah (APC) in limfocitih T (Abbas in Lichtman, 2007).

Vloga **humoralne imunosti** je odstranjevanje zunajceličnih patogenov ter nevtralizacija mikrobnih toksinov. Limfociti B, nastali iz hematopoetskih matičnih celic v kostnem mozgu, proizvajajo protitelesa ali imunoglobuline, glavne akterje humoralne imunosti. Transmembranske oblike imunoglobulinov prepoznavajo epitope na antigenih, kar sproži signal za namnoževanje in diferenciacijo v efektorske celice B, te začnejo izločati topne

imunoglobuline, ki imajo isto specifiko kot membransko vezani. Topni imunoglobulini krožijo po krvi in limfi in sodelujejo pri nevtralizaciji okužbe. Imunoglobulini so sestavljeni iz dveh enakih, kovalentno povezanih težkih in dveh prav tako enakih lahkih verig. N-terminalni konci težkih in lahkih verig sestavljajo variabilne regije protiteles, odgovorne za prepoznavanje antigena. Aktivirane celice B se v germinalnih centrih hitro delijo in so tu podvržene mehanizmu somatskih hipermutacij, ki je programiran proces za povišanje frekvence mutacij variabilnih delov imunoglobulinskih genov. Posledica je visoka frekvenca mutacij v genih za variabilno regijo; mutacije, ki povzročajo višjo afiniteto protiteles do antigena so podvržene pozitivni selekciji. Temu pojavu pravimo zorenje afinitete protiteles. Repertoar posameznikovih imunoglobulinov je glede na specifiko izredno širok, za kar so odgovorne somatske rekombinacije variabilnih delov tekom zorenja limfocitnih celic (Abbas in Lichtman, 2007).

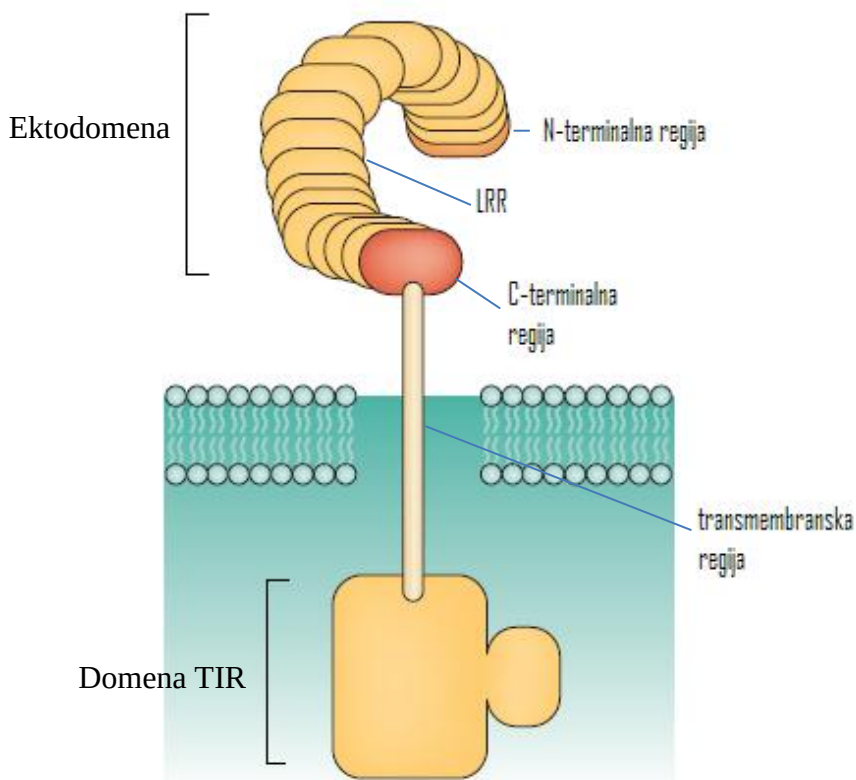
Vloga **celično posredovane imunosti** je odstranjevanje znotrajceličnih patogenov, glavno vlogo imajo tu celice T in antigen predstavljajoče celice. Celice T imajo na svoji površini receptorje za T-celične antigenske determinante, imenovane T celični receptor ali TCR. Posredniki med antigenom in limfociti so v primeru celično posredovane imunosti APC, te antigen internalizirajo, razgradijo in ga na svoji površini predstavijo v obliki peptidov, vezanih v kompleksu z membranskimi proteini, imenovanimi molekule poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (PHK, ang. »major histocompatibility complex« ali MHC). Med glavne APC spadajo makrofagi, celice B in dendritične celice. Imunski odziv na znotrajcelične patogene poteče v več fazah; sprva naivne T celice prepoznajo antigenske peptide, predstavljene na APC, nato sledi klonalna ekspanzija celic T z enako specifiko. Zadnja faza je diferenciacija celic T v efektorske in spominske celice, prve omogočajo nevtralizacijo okužbe, slednje poskrbijo za hiter odgovor na morebitno ponovno okužbo z enakim patogenom (Abbas in Lichtman, 2007; Vozelj, 2000)

2.1.3 RECEPTORJI TOLL IN TLR

Gen *Toll* so odkrili Anderson in sod. v začetku osemdesetih let prejšnjega stoletja pri modelnem organizmu vinski mušici (*Drosophila melanogaster*). Ugotovili so, da je produkt gena *Toll* nujno potreben za dorzoventralni razvoj zarodka (Anderson in sod.,

1985). Prvotno so genu pripisali zgolj razvojno vlogo, kasneje pa se je izkazalo da ima tudi ključno vlogo pri obrambi pred patogenimi glivami (Lemaitre in sod., 1996). Kmalu zatem je sledilo odkritje ortologega gena pri človeku, katerega produkt so poimenovali Toll-u podobni receptor ali TLR (ang. »Toll Like Receptor«). TLR imajo pomembno vlogo v prepoznavanju molekulskih motivov na patogenih in kot mediatorji v povezavi med prirojeno in pridobljeno imunostjo. Hkrati pa je bila opažena tudi vloga TLR signalizacije pri vnetnih in avtoimunih obolenjih (Kawai in Akira, 2010).

Vsem predstavnikom TLR je skupno, da so transmembranski glikoproteini tipa I (N-terminalni del proteina je usmerjen navzven), sestavljeni iz ektodomene, ki vsebuje različno število z levcinom bogatih ponovitev LRR (ang. »leucin rich repeats«). Ta je preko transmembranske alfa vijačnice povezana s citoplazemsko domeno TIR (angl. »Toll–interleukin 1 (IL-1) receptor«), potrebno za celično signalizacijo. Domena TIR je homologna citoplazemski signalizacijski domeni interlevkinskega receptorja 1 (IL-1R), od tod tudi ime (Akira in sod. 2006; Guy in sod. 2006) (slika 1).

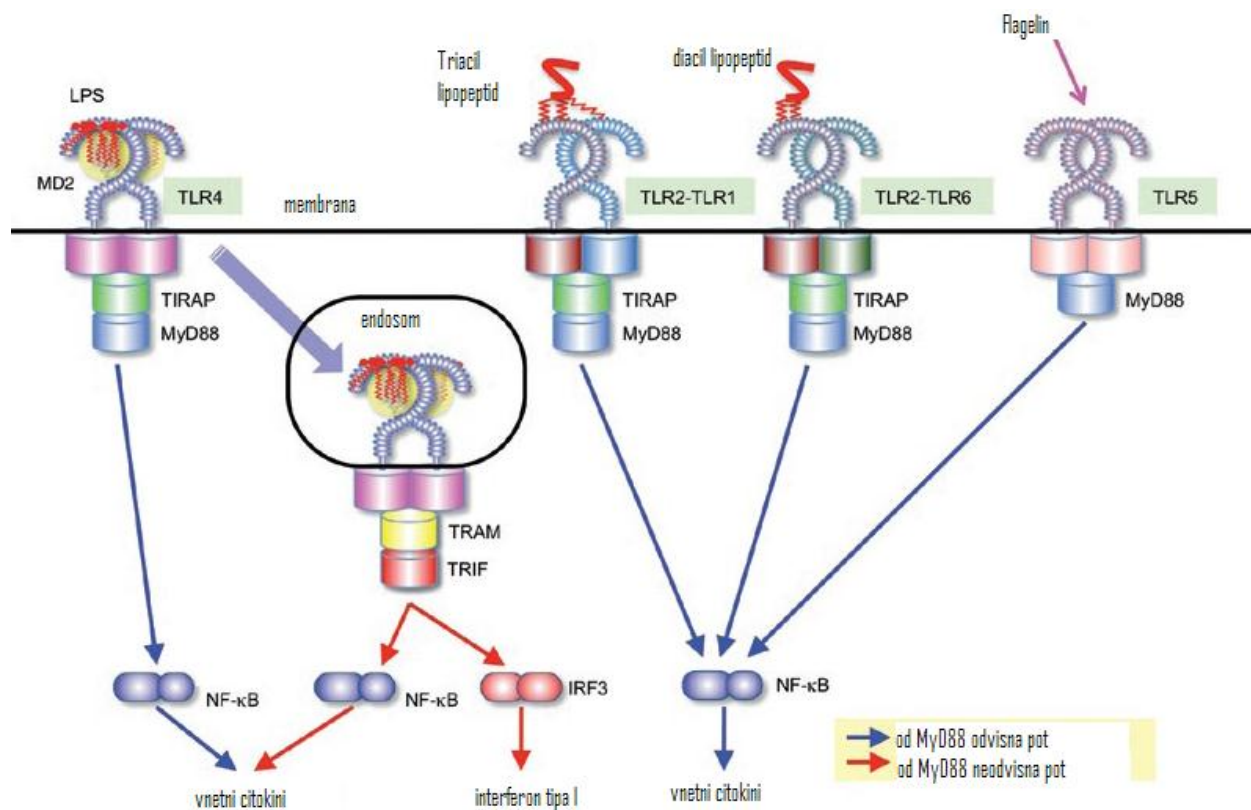


Slika 1: Struktura TLR (Guy in sod., 2006)

Glede na primarno sekvenco in tip liganda lahko razdelimo TLR v različne podskupine. Do danes je bilo odkritih skupaj 13 TLR pri sesalcih; deset funkcionalnih človeških TLR in dvanajst mišjih (Kawai in Akira, 2010). Mišji TLR 10 je nefunkcionalen zaradi retrovirusne insercije, iz človeškega genetskega repertoarja so bili tekom evolucije podvrženi delecijam TLR11, TLR12 in TLR13 (Akira in sod., 2006). Glavni celični tipi, v katerih se izražajo TLR, so makrofagi, dendritične celice, neutrofilci, endotelialne celice in celice mukoznega epitelija (Abbas in Lichtman, 2007). Glede na subcelično lokalizacijo jih uvrščamo v dve skupini; TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 in TLR11 se nahajajo na površini celic in prepoznavajo v glavnem komponente mikrobnih membran, kot so lipidi, lipoproteini in protein, medtem ko TLR3, TLR7, TLR8 in TLR9, ki se nahajajo v znotrajceličnih veziklih, kot so endoplazemski retikulum (ER), endosomi, lizosomi in endolizosomi, prepoznavajo mikrobne nukleinske kisline. Poleg tujih lahko TLR aktivirajo tudi nekatere endogene molekule, ki se sproščajo ob apoptozi ali poškodbah celic ali tkiv, kot so oksidirani lipoproteini, komponente ekstracelularnega matriksa in proteini toplotnega stresa (Kawai in Akira, 2010).

Aktivacija različnih TLR sproži različne signalne poti z določenim končnim učinkom; aktivacija TLR3 in TLR4 sproži sintezo interferonov tipa I in vnetnih citokinov, medtem ko aktivacija površinsko izraženih TLR, kot so TLR5 in heterodimeri TLR1-TLR2 in TLR2-TLR6 povzroči predvsem sintezo vnetnih citokinov. Razlog je v različnih signalnih poteh, v katerih sodelujejo adapterske molekule z domeno TIR, homologno citoplazemski regiji TLR. Mednje štejemo proteine MyD88 (ang. "myeloid differentiation primary response protein 88"), TIRAP (Mal) (ang. "TIR associated protein / MyD88 adaptor-like"), TRIF (ang. "TIR-domain-containing adaptor protein") in TRAM (ang. "TRIF related adaptor molecule"). Prvo-odkriti izmed naštetih, MyD88, nastopa v vseh signalnih poteh TLR, razen pri TLR3 in povzroči aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B (ang. "nuclear factor κ B") in protein kinaze MAPK (ang. mitogen-activated protein kinase), kar sproži sintezo vnetnih citokinov. Pri TLR3 in TLR4 so odkrili alternativne signalne poti, ki delujejo preko adapterske molekule TRIF in aktivirajo poleg transkripcijskega faktorja NF- κ B tudi IRF3 (ang. "interferon regulatory factor"), končni učinek je povečana stopnja vnetnih citokinov in interferona tipa I (IFN I). Ločimo torej od MyD88 odvisno in od

MyD88 neodvisno pot aktivacije. TLR4 lahko sproži eno ali drugo pot (Akira in sod., 2010) (slika 2). Signalne poti se aktivirajo, kadar so TLR v obliki dimerov; lahko so konstitutivni dimeri, kot npr. TLR9, pri katerih vezava liganda povzroči konformacijske spremembe, potrebne za aktivacijo, lahko pa šele vezava liganda sproži dimerizacijo, kot v primeru TLR4. Nekateri TLR tvorijo heterodimerne, kot so TLR1-TLR2 in TLR2-TLR6 (Kim in sod., 2007).



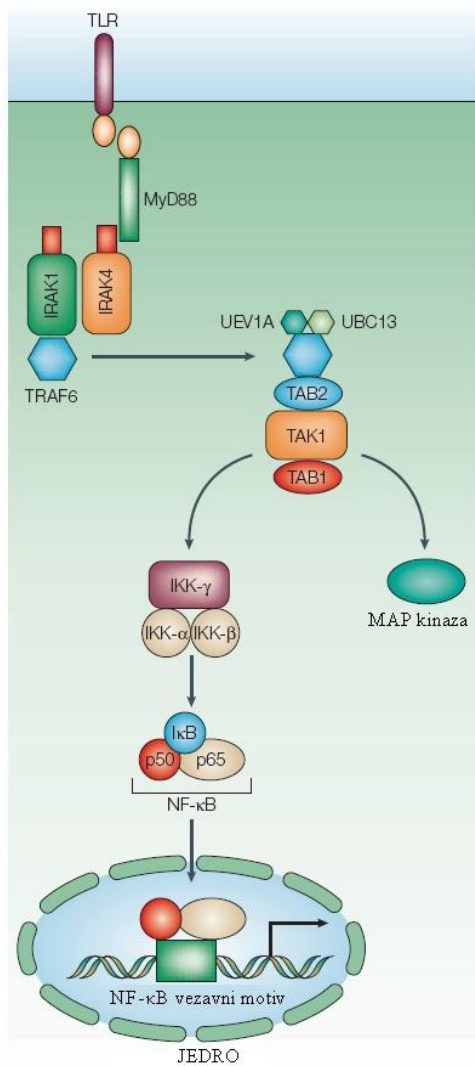
Slika 2: Signalne poti membranskih TLR (Akira in sod., 2010)

2.1.4 Receptor TLR5

Receptor TLR5 so odkrili Chaudhary in sod. l. 1998 in ga na podlagi aminokislinske sekvence in strukture uvrstili v družino receptorjev TLR. Hayashi in sod. (2001) so opazili aktivacijo TLR5 ob prisotnosti številnih po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij. Identificirali so flagelin, glavni protein v bakterijskem bičku, kot glavni agonist TLR5. Stimulacija receptorja TLR5 s flagelinom aktivira od MyD88 odvisno signalno pot, kar vodi do zorenja antigen predstavljajočih celic in izločanje kemokinov ter vnetnih citokinov, vključno z IL-6, IL-12 in TNF- α (dejavnik tumorske nekroze, ang. »tumor-

necrosis factor») (Abbas in Lichtman, 2007; Feuillet in sod., 2006). Receptorje TLR5 na površini izražajo dendritične celice, monociti, epiteljske celice in mastociti (Feuillet in sod., 2006). Crellin N. in sod. (2005) omenjajo tudi izražanje TLR5 na regulatornih celicah T v primerljivem nivoju kot pri monocitih in dendritičnih celicah in dokazujejo, da flagelin, poleg posrednega vpliva na pridobljeno imunost, deluje tudi direktno na celice pridobljene imunosti.

Po vezavi flagelina na TLR5 pride do homodimerizacije receptorja (Hayashi in sod., 2001). Sproži se od MyD88 odvisna signalna pot (slika 3). MyD88 vsebuje poleg domene TIR, ki se veže na TLR, tudi domeno smrti DD (ang. »death domain«), ki omogoča vezavo z domeno DD kinaze IRAK4 (ang. IL-1R-associated kinase 4). IRAK4 sproži fosforilacijo IRAK1, kar omogoča vezavo TRAF6 (ang. »TNF receptor-associated factor 6«). Kompleks IRAK1-TRAF6 se sprostí z receptorja in tvori kompleks s TAK1 (ang. »transforming growth factor- β -activated kinase 1«), TAB1 (ang. TAK1-binding protein), TAB2 in TAB3, kar sproži njihovo fosforilacijo. Aktivirana kinaza TAK1 aktivira kompleks IKK (ang. »inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex«), ki je sestavljen iz IKK- α in IKK- β ter regulatorne podenote IKK- γ . Kompleks IKK nato fosforilira I κ B, kar povzroči njegovo poliubikvitinacijo in s tem razgradnjo I κ B. Transkripcijski faktor NF- κ B se nahaja v citoplazmi v neaktivni, dimerni obliki, aktivacijo omogoča razgradnja I κ B. Aktivirani NF- κ B nato potuje v jedro, kjer sproži prepisovanje od NF- κ B odvisnih genov (Abbas in Lichtman, 2007; Kawai in Akira, 2006; Akira in Takeda, 2004). Poleg opisane poti lahko stimulacija TLR5 aktivira transkripcijski faktor AP1 (ang. »transcription factor activator protein 1«) preko kinaze MAP (od mitogena aktivirana proteinska kinaza, ang. »mitogen activated protein kinase«), izbor signalne poti bi lahko bil odvisen od celičnega tipa (Abbas in Lichtman, 2007; Steiner T., 2007).



Slika 3: Od MyD88 odvisna pot aktivacije (Akira in Takeda, 2004)

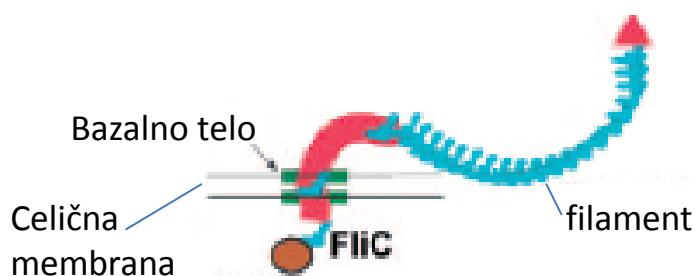
Andersen-Nissen in sod. (2007) so predlagali model molekule TLR5, osnovan na znani strukturi drugih proteinov z domenami LRR, predvsem TLR3, za katerega je poznana kristalna struktura (Choe in sod., 2005). Odkrili so dva ohranjena dela v strukturi, za enega izmed njih predvidevajo vlogo v dimerizaciji receptorja, za drugo ohranjeno regijo, ki se nahaja na vbočenem delu ektodomene pa vlogo v prepoznavanju flagelina (Andersen-Nissen in sod., 2007). Znano je, da je za aktivacijo signalne poti receptorjev TLR potrebna dimerizacija citoplazemskih domen TIR (Abbas in Lichtman, 2007), za nekatere receptorje je poznan mehanizem. TLR4 tvori oligomere po vezavi lipopolisaharidov preko interakcije s koreceptorjem MD2 (Kobayashi in sod, 2006). TLR2 tvori konstitutivne dimere s TLR1

ali TLR6, na ta način prepozna bakterijske lipopeptide (Ozinsky in sod., 2000). Ektodomena TLR3 dimerizira ob vezavi liganda (dvojno verižne RNK) (Bell in sod., 2006). Za TLR9 predpostavljajo, da tvori v membrani konstitutivni dimer, ob vezavi liganda pa se inducirajo konformacijske spremembe, ki omogočajo zadostno zbližanje domen TIR za aktivacijo signalne poti (Latz in sod., 2007). Mehanizem dimerizacije TLR5 ni poznan, Andersen-Nissen in sod. (2007) pa predlagajo tri možne načine. Prvi je preko vezave liganda inducirana dimerizacija, drugi da TLR5 deluje preko konstitutivnega dimera, pri čemer vezava liganda sproži potrebne konformacijske spremembe, ali da dva monomera TLR5 prepoznata eno molekulo flagelina, kar vodi v dimerizacijo in sprožitev signalne poti.

2.2 FLAGELIN

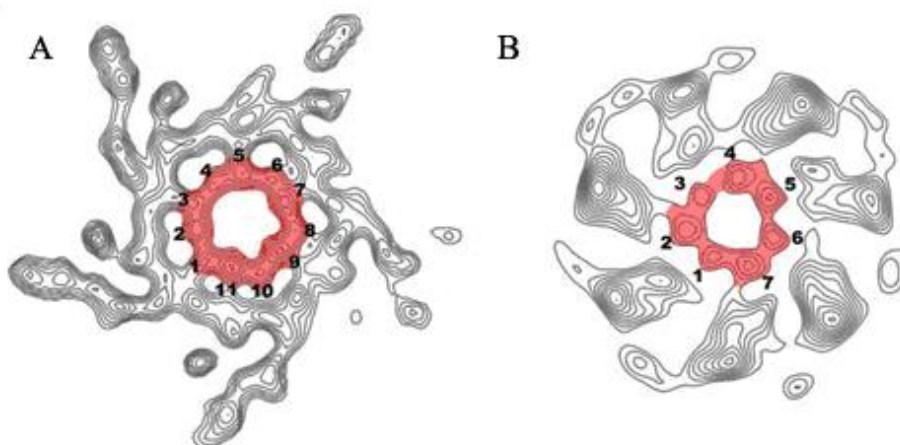
Flagelin je glavni strukturni protein bakterijskega bička, strukture, ki omogoča gibljivost nekaterih bakterij. Gen, ki kodira flagelin, je različno poimenovan v različnih organizmih (*FliC*, *FljA*, *FlaA*,...) (Steiner T., 2007). Gen za flagelin v bakteriji *Salmonella typhimurium* se imenuje *FliC*, ta nosi zapis za modelni flagelin, na katerem temelji večina študij strukture, funkcije, imunogenosti in aktivacije TLR5 (Nempont in sod., 2008). Flagelin v gostiteljskem organizmu povzroči aktivacijo prirojene imunosti, kot tudi nastanek protiteles (Crellin N. in sod., 2005).

Biček je zasidran v celično membrano z bazalnim telescem, kompleksno strukturo, ki pritrjuje biček na celico, a mu hkrati omogoča vrtenje. Skozi bazalno telesce se izločajo monomerne enote flagelina, ki spontano polimerizirajo, kar vodi v nastanek zavitega filamenta na zunanji strani celične membrane (Drev S., 2009, Steiner T., 2007) (slika 4). Filament *S. typhimurium* je sestavljen iz enajstih protofilamentov (slika 6) (Steiner T., 2007, Yonekura in sod., 2003).



Slika 4: Struktura bakterijskega bička (Steiner, 2007)

Dolgo časa je prevladovalo prepričanje, da je zgradba bička enaka pri vseh bakterijah. Vendar je Galkin s sodelavci ugotovil, da je filament bička bakterije *Campylobacter jejuni* sestavljen iz 7 protofilamentov in ne 11, kakor so pokazali pri bakteriji *S. typhimurium* (slika 5) (Galkin in sod., 2008).

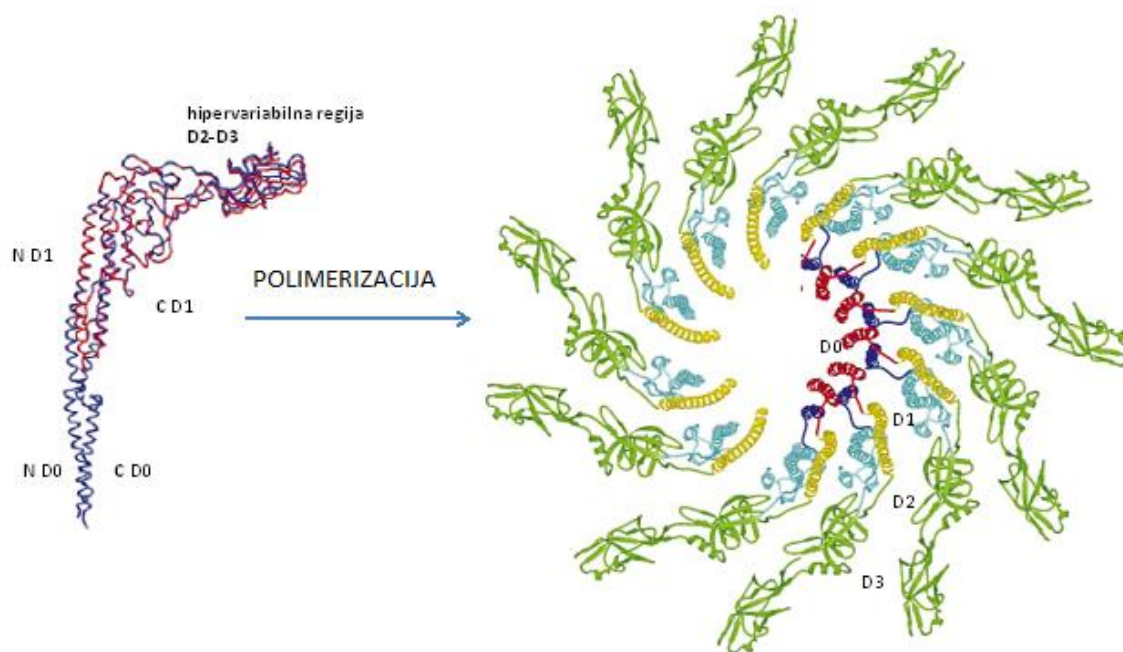


Slika 5: Struktura filameta bička bakterije *S. typhimurium* (A) in bakterije *C. jejuni* (B) (Galkin in sod., 2008)

2.2.1 Zgradba flagelina

Flagelin je sestavljen iz štirih domen, D0, D1, D2 in D3 (Yonekura in sod., 2003). N-terminalni konec verige sestavljajo D0, D1, D2 do D3, v tem zaporedju, nato zavije nazaj preko D2 in D1, tako da se C-terminalni konec primarne sekvence konča v domeni D0. Domeni D0 in D1, sestavljeni pretežno iz α -vijačnic, sta med posameznimi vrstami zelo dobro ohranjeni in imata ključno vlogo v polimerizaciji flagelinov, torej v sestavi funkcionalnega filameta, kar omogoča bakterijam gibljivost. Kot vidimo na sliki 6, sta

domeni usmerjeni v notranjost filameta, navzven sta usmerjeni hipervariabilni regiji D2 in D3, ki sta v obliki β -plošč (Yonekura in sod., 2003). Molekulska masa flagelina se giblje med 28 in 80 kDa in je odvisna od vrste bakterije (Ramos in sod., 2004).

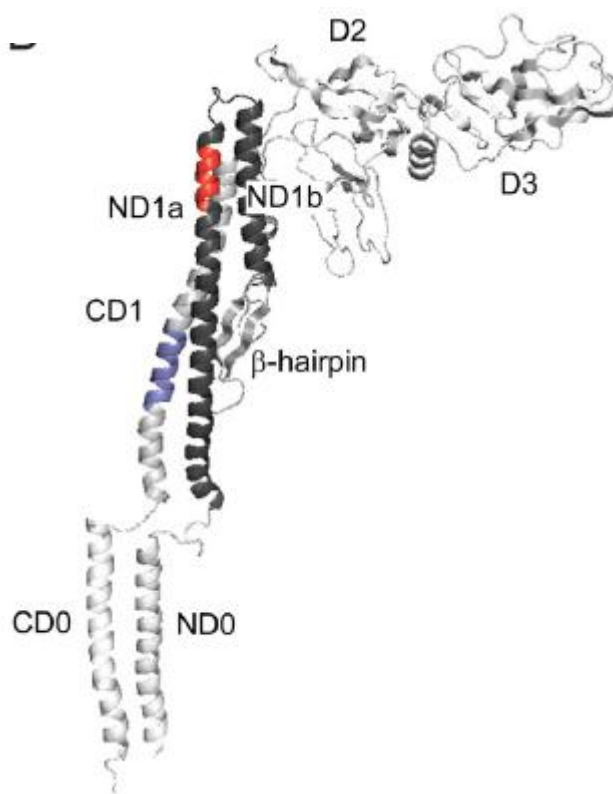


Slika 6: Struktura in polimerizacija flagelina bakterije *S. typhimurium* (Yonekura in sod., 2003)

2.3 INTERAKCIJA MED FLAGELINOM IN TLR5

Predeli flagelina, ki jih prepozna TLR5, so evolucijsko dobro ohranjeni, saj gre za regije, ki omogočajo funkcionalno sestavo protofilamentov in s tem gibljivost bakterij. V določenih bakterijah je flagelin podvržen nekaterim posttranslacijskim modifikacijam, vendar te ne igrajo vloge v aktivaciji signalne poti TLR5. Dokazano je tudi, da signalno pot aktivira samo monomerni flagelin (Smith in sod., 2003). Andersen-Nissen in sod. so v svojih študijah pokazali, da leži glavni predel, odgovoren za aktivacijo TLR5, v N-terminalni domeni D1 okoli aminokislin 89-96, vendar pa k aktivaciji prispeva tudi C-terminalna domena D1, ki najverjetneje vpliva na konformacijo in izpostavljenost omenjenih AK. Izkaže se, da so AK 89, 90, in 94 ključne tako za aktivacijo kot tudi za gibljivost (Andersen-Nissen in sod., 2005; Smith in sod., 2003). Poleg omenjenih regij so

Zoete in sod. (2010) pokazali, da je pri aktivaciji pomembna tudi β -struktura variabilnega dela, ki v primarni sekvenci sledi N-terminalni regiji D1 (slika 7).



Slika 7: Regije flagelina, pomembne pri aktivaciji TLR5 (Zoete in sod., 2010)

TLR5 aktivira flagelin β in γ proteobakterij, kamor spada tudi *Salmonella typhimurium*, medtem ko so α in ϵ proteobakterije (predstavniki so *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* in *Helicobacter mustelae*) zmožne obiti ta del imunske zaznave.. Zanimivo je, da so slednje uspele obiti aktivacijo TLR5 in hkrati ohraniti gibljivost, na račun mutacij, ki so kompenzirale spremembe v omenjeni regiji D1 (Andersen-Nissen in sod., 2005).

Tudi nekatere proteobakterije β in γ so uspele med evolucijo razviti mehanizme, s katerimi so sposobne do neke mere zaobiti gostiteljeve obrambne mehanizme; *S. typhimurium* ob okužbi gastrointestinalnega trakta preneha producirati flagelin po vstopu v fagocitne celice. Nekateri sevi bakterije *Listeria monocytogenes* izražajo flagelin odvisno od temperature, pri 37 °C se opazno zmanjša izražanje (Andersen-Nissen in sod., 2005).

2.4 METODA FRET

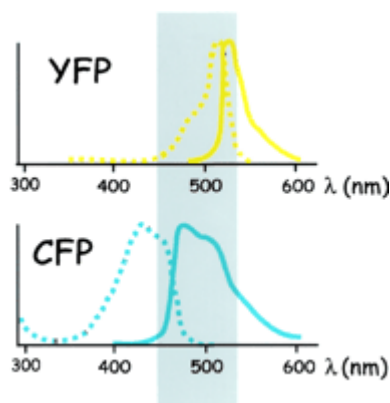
Celice so dinamični sistemi, v katerih se neprestano vršijo številne, prostorsko in časovno natančno uravnavane interakcije. Vedno širše razumevanje le teh nam daje vedno boljši vpogled v celovito delovanje celičnih procesov. Metoda FRET nam omogoča preučevanje medsebojnih interakcij molekul, predvsem uporabna je za preučevanje proteinskih interakcij na celičnem nivoju. Na voljo so številne metode za preučevanje medsebojnih interakcij proteinov, kot so cirkularni dikroizem, površinska plazmonska resonanca, imunoprecipitacija in druge, ki pa ne omogočajo vpogleda v celično prostorsko porazdelitev analiziranih molekul.

FRET ali fluorescenčni prenos resonančne energije (ang. “fluorescence resonance energy transfer”) je biofizikalni pojav, ki temelji na prenosu energije iz donorskega fluorofora na receptorski fluorofor. Za učinkovit FRET morata biti izpolnjena dva pogoja, prvi je ustrezno prekrivanje emisijskega spektra donorja in ekscitacijskega spektra akceptorja (slika 5, modri pas), drugi pogoj je ustrezna bližina donorja in akceptorja, ki je nekje med 1 in 10 nm (Horvath G. in sod., 2009, Maxfeild F., 2002). Pri prenosu se zmanjša intenziteta fluorescence donorja in poveča intenziteta fluorescence akceptorja. Kvantitativno lahko pojav ovrednotimo z vrednostjo uspešnosti FRETa ali E (ang. “FRET efficiency”), ki opiše delež prenešene energije fotona iz donorja na akceptor. E je funkcija razdalje med molekulami in jo lahko zapišemo kot:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

kjer je R razdalja med donorsko in akceptorsko molekulo in R_0 försterjeva razdalja, t.j. medsebojna razdalja molekul, pri kateri je uspešnost FRETa petdeset odstotna. Vsakemu donor-akceptor paru pripada določena vrednost R_0 , za najbolj običajno uporabljen par proteinov, CFP-YFP, znaša ta 4,9 nm (Horvath in sod., 2009). Zelo majhne spremembe v razdalji med molekulami imajo za posledico velike spremembe E.

Zeleni fluorescentni protein GFP (ang. “green fluorescent protein”) je prvi izoliral Shimomura s sodelavci leta 1962 in je dobil svoje ime zaradi značilnih lastnosti fluoroforma. V zadnjem času je poleg prvotnega zelenega na voljo še vrsta drugih fluorescentnih proteinov, primernih za različne aplikacije (Shaner N. in sod., 2005). Za metodo FRET se najpogosteje uporablja par mCerulean ali CFP (ang. “cyan fluorescent protein”) in mCitrine ali YFP (ang. “yellow fluorescent protein”) (Zaccolo, 2004). YFP ima ekscitacijski vrh pri 516 nm in emisijski vrh pri 529 nm, CFP ima ekscitacijski vrh pri 433 nm in emisijski vrh pri 475 nm (Shaner in sod., 2005; Zaccolo, 2004) (slika 8).



Slika 8: Ekscitacijski in emisijski spektri YFP in CFP (Zaccolo, 2004)

2.4.1 Bledenje akceptorja

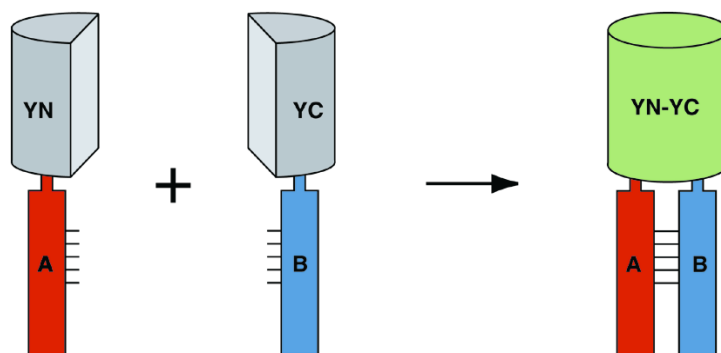
Obstaja več načinov merjenja uspešnosti FRETa, najpogosteje se uporablja metoda, imenovana angleško “acceptor photobleaching” ali bledenje akceptorja, pri kateri akceptorsko molekulo intenzivno obsevamo s svetlobo njene maksimalne ekscitacije, tako da fluoroform pravzaprav uničimo. Prenos energije iz akceptorja na donor torej ni mogoč in v primeru FRETa opazimo povečano emisijo donorja. Učinkovitost FRETa določimo preko merjenja intenzitete donorske molekule pred in po obsevanjem akceptorja po formuli (Horvath in sod., 2009):

$$E = \frac{D_{post} - D_{pre}}{D_{post}}$$

V principu lahko za detekcijo FRETa uporabimo vsako napravo, ki meri fluorescenco z zadostno občutljivostjo. Za analizo bioloških sistemov je zaradi visoke ločljivosti zelo primeren konfokalni mikroskop, kjer lahko opazujemo subcelično lokalizacijo označenih molekul (Gastard, 2006).

2.5 METODA CEPLJENIH PROTEINOV

Metoda temelji na sposobnosti nekaterih proteinskih podenot, da ob ustrezni medsebojni bližini v prostoru spontano asociirajo in tvorijo funkcionalen protein. Johnsson in Varshavsky (1994) sta objavila študijo proteinskih interakcij v kvasovkah, kjer so se ubikvitinske podenote, vezane na preučevane proteine, sestavile v funkcionalen kompleks ob interakciji le-teh (preučevanih) proteinov. Hu in sod. so l. 2002 predstavili podoben poročevalski sistem zaznavanja interakcij preko fuzije med N-terminalnimi in C-terminalnimi deli rumenega fluorescentnega proteina YFP (Hu in sod., 2002) (slika 9). Uporaba takšnih poročevalskih sistemov je prikladen način preučevanja interakcij med molekulami.

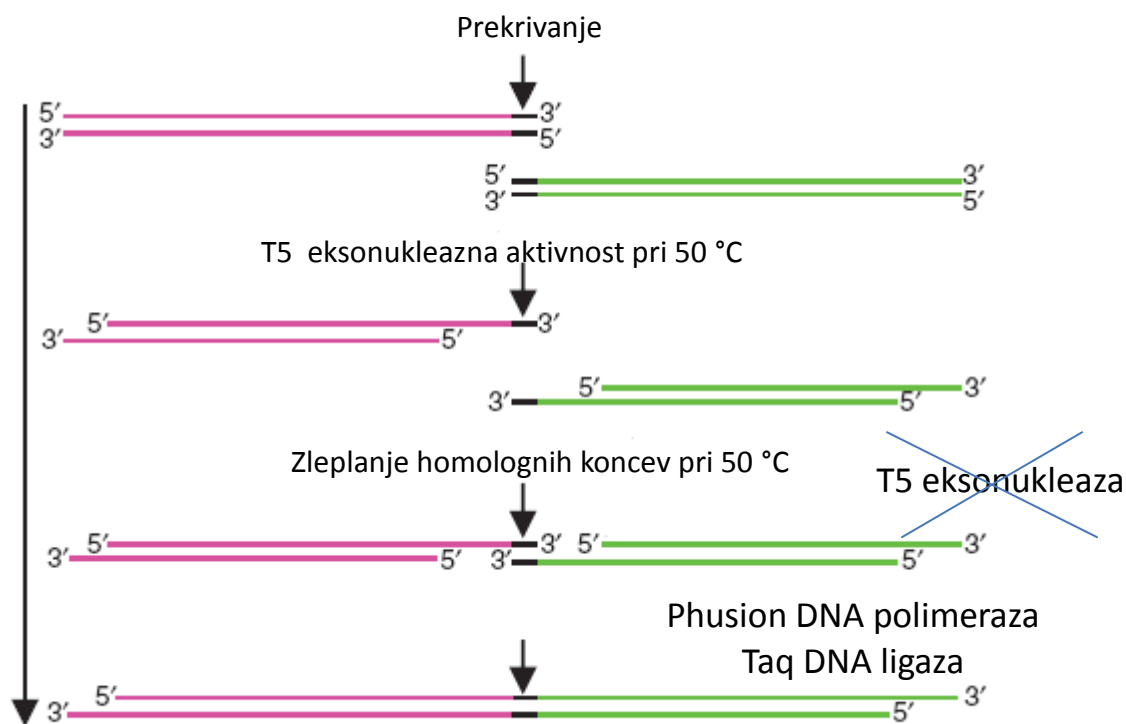


Slika 9: Shematski prikaz metode SPLIT YFP za dokaz medmolekulskih interakcij (Hu in sod., 2002)

2.6 LEPLJENJE PO GIBSONU

Lepljenje po Gibsonu je novejša metoda molekularnega kloniranja, ki so jo razvili Gibson in sod. (2009) in jo uporabili pri odmevnem projektu sestave sintetičnega genoma bakterije *Mycoplasma genitalium*. Omogoča združitev dveh ali več fragmentov s prekrivajočimi konci v eni sami reakciji, z uporabo treh encimov, eksonukleaze (T5 exonuclease),

polimeraze (Phusion DNA polymerase) in ligaze (Taq DNA ligase). Eksonukleaza ima 5' – 3' aktivnost in razgrajuje dvoverižno molekulo v tej smeri, rezultat so enoverižni konci obeh molekul, ki se na podlagi homologije združijo. Polimeraza omogoča podaljševanje verige, ligaza omogoča zapolnitev vrzeli. Reakcija poteka pri 50 °C, pri tej temperaturi se eksonukleaza sčasoma deaktivira, kar prepreči prekomerno razgradnjo fragmentov (slika 10) (Gibson in sod. 2009).



Slika 10: Princip delovanja reakcije lepljenja po Gibsonu (Gibson in sod., 2009)

Avtorji so reakcijo uporabili za lepljenje zelo velikih fragmentov DNA, poročajo o produktih velikosti 900 kb, vendar zgornja meja ni določena. Dolžini fragmentov je v protokolih prilagojena količina eksonukleaze in dolžina potrebne homologije koncev. Za manjše fragmente ($\approx$ do 5 kb) je optimalna dolžina homologije okrog 40 bp.

Prednost metode je v sestavi več fragmentov DNA v eni sami reakciji (zgornja meja ni bila empirično določena, v originalni publikaciji omenjajo največ pet vključkov v eni reakciji), brez običajne uporabe restrikcijskih encimov, s čimer se izognemo vpeljavi dodatnih prepoznavnih mest restrikcijskih endonukleaz. Metodi pripisujejo približno 90 odstotno

uspešnost (9 od desetih testiranih kolonij vsebuje pravi vključek) in relativno nizko stopnjo mutacij (1 mutacija na 50 reakcij) (Gibson in sod., 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 1: Kemikalije in encimi, uporabljeni v diplomskem delu

Proizvajalec	Kemikalije
BioWhittaker	FBS (Fetal Bovine Serum)
Carlo Erba	Glicerol
Epicentre	T5 exonuclease
Fermentas	DNA-standardi: 1 kb DNA Ladder, Gene Ruller DNA Ladder mix, nanašalni pufer za DNA elektroforezo, PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, restrikcijski 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	Etanol, metanol, izopropanol, NaCl, očetna kislina, bakteriološki agar
New England Biolabs	DNA ligaza TAq , DNA polimeraza Phusion
Operon	Začetni oligonukleotidi
Polyplus-transfection	transfekcijski reagent JetPEI in JetPRIME
Promega	5-kratni lizni pufer, luciferin
Serva	TEMED
Sigma	Akrlamid, N,N'-metilen-bis-akrlamid, agaroz, 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-merkaptioetanol
Tropix	
Stratagene	I-BLOCK
	Kit QuikChange™ Site-directed Mutagenesis za točkovno mutagenezo

Preglednica 2: Uporabljeni komercialno dostopni kompleti

Proizvajalec	Komplet
Fermentas	Kit za izolacijo fragmentov DNA iz agaroznega gela: GeneJet™ Gel Extraction Kit, kit za izolacijo plazmidne DNA: GeneJet™ Plazmid Miniprep Kit
Stratagene	Kit za točkovno mutagenezo: QuikChange™ Site-directed Mutagenesis Kit

3.1.2 Raztopine, pufri in standardi

Preglednica 3: 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
Lizni pufer (RIPA)	50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 0,5 % DOC, 1X CPI
4-kratni reducirajoči vzorčni pufer z SDS	320 mg SDS, 2 mL 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 3,2 mL glicerol, 0,8 mL β-merkaptotanol, 0,8 mL 1-odstotnega bromfenolmodrega, 1,2 mL MQ
10-odstotni ločitveni gel	2,5 mL 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 4,1 mL MQ, 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)
4-odstotni vstopni gel	1,25 mL 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 3,05 mL MQ, 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 1L z dH2O. Pred elektroforezo pufer 10-krat redčimo z dH2O.
Pufer za mokri prenos proteinov na membrano	6,057 g Tris, 28,8 g glicina, 400 mL metanola, dopolnimo z dH2O 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

Preglednica 4: Raztopine in pufri uporabljeni za pripravo DNA konstruktov

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, dH ₂ O do 1 L. pH uravnemo na 8.
6x nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	0,25% bromofenolmodro, 0,25% ksilencianol, 40% (w/v) glukoze v dH ₂ O
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, 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT, 1 mM vsakega dNTP in 5 mM NAD

Preglednica 5: Raztopine in pufri uporabljeni za delo s človeškimi celičnimi kulturami

Raztopine/pufer	Sestavine
LUC-pufer (za merjenje kresničkine luciferaze)	LUC-pufer: 2,38 g HEPES, 0,38 g MgCl ₂ , 0,06 g EGTA·Na raztopimo v 100 mL dH ₂ O, uravnemo pH na 7,8 in dodamo še 0,08 g NaF. Poleg 2,6 mL LUC pufra dodamo še DTT, ATP, coA in MQ do 13 mL. Luciferin raztopimo v DMSO in ga dodamo pufu.
RENILLA-pufer (za merjenje luciferaze <i>Renilla neoformis</i>)	2,6 mL 5-kratnega Renilla-pufra (3,346 g Na pirofosfat, 6,9 g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, 14,5 g NaCl, 1,822 g CDTA, 5 mL metanol, pH uravnemo na 5,0), MQ do 13 mL. Coelenterazin raztopimo v metanolu in ga dodamo pufu.
10-kratni PBS (za celični laboratorij)	100 g NaCl, 2,5 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,5 g KH ₂ PO ₄ , MQ do 1 L, pH uravnemo na 7,4.

3.1.3 Laboratorijska oprema

Preglednica 6: 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, eletroporator Gene Pulser Xcell™
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture
Berthold detection systems	Orion II Microplate Luminometer
Euromax	svetlobni mikroskop
TPP	Posodice za gojenje celičnih linij, 96 well, 24 well in 6 well plošče za gojenje celičnih kultur
Ibidi	Kom orice za mikroskopiranje z 8 luknjicami: µSlide 8 well
Tehnica Železnik	Tehnica ET-1111
Moulinex	mikrovalovna pečica SYBIO
Eppendorf	Avtomatske pipete različnih volumnov, namizna centrifuga MiniSpin, centrifuga 5415R, termoblok Thermomixer comfort
Gilson	5 mL, 1 mL, 200 µl, 100 µl, 20 µl 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
Syngene	G:BOX in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
Thermo Scientific	centrifuga Sorvall RC5C Plus, 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 7: Uporabljena protitelesa

Protitelo	Opis
Primarna protitelesa proti histidinskemu repu (Qiagen)	Mišja monoklonska protitelesa, ki prepoznajo štiri histidinske ostanke
Sekundarna protitelesa proti mišjim protitelesom (Santa Cruz)	Kozja poliklonska protitelesa proti mišjim protitelesom IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo
Primarna protitelesa proti označevalcu AU1(Abcam)	Zajčja poliklonska protitelesa, ki prepoznajo označevalec AU1
Sekundarna protitelesa proti zajčjim protitelesom (Abcam)	Kozja poliklonska protitelesa proti zajčjim protitelesom IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo

3.1.5 Uporabljeni plazmidi

preglednica 8: Uporabljeni vektorji in plazmidi

Vir	Plazmid
Novagen	pET19b
Invivogen	pUNO-hTLR5
Promega	pGL2 (luciferazni reporterski vektor), phRL-TK (<i>Renilla</i> luciferazni reporterski vektor)
Darilo (dr. Edward Miao, dr. Alan Aderem, Institute for Systems Biology, Seattle)	FliC v pRP4
Karolina Ivičak, Kemijski Inštitut	pN-Cit-TLR5 in pN-Cer-TLR5
Blaž Nemec, Kemijski Inštitut	TLR5-CFP v pFLAG-CMV3
Rok Gaber, Kemijski Inštitut	mCitrine-link-mCerulean v pSB1-AK3
Jelka Pohar, Kemijski Inštitut	mCerulean v pSB1-AK8
Jernej Turnšek, Kemijski Inštitut	mCitrin v pSB1-AK8
Sigma-Aldrich	pFLAG-CMV3

pET19b

Vektor za izražanje proteinov v bakterijah s promotorjem T7, terminatorjem T7 in histidinskim repom. V vektorju smo pripravili mutante flagelina in fuzijo flagelina s fluorescentnim proteinom.

pUNO-hTLR5

Vektor nosi zapis za humani TLR5, ki nam je služil za pozitivno kontrolo pri testiranju aktivnosti konstruktov za FRET in split. Seleksijski marker je odpornost proti blasticidinu. Izražanje je pod kontrolo močnega ubikvitarnega EF1a/HTLV promotorja.

pGL2 in phRL-TK

Vektorja uporabljamo pri luciferaznem testu, pGL2 nosi zapis za kresničkino luciferazo pod kontrolo promotorja NF- κ B, phRL-TK nosi zapis za *Renilla* luciferazo, ki je pod kontrolo konstitutivnega promotorja TK.

pFLAG-CMV3

Vektor ima konstitutivni CMV promotor in gen za ampicilinsko rezistenco. V tem vektorju smo pripravili konstrukte za FRET in split.

FliC v pRP4

Plazmid so nam velikodušno darovali iz laboratorija A. Aderema (Institute for Systems Biology, Seattle), vsebuje zapis za divji tip flagelina *S. typhimurium* (*FliC*) pod kontrolo promotorja trc (direktno inducibilen z IPTG) in nam je služil za pozitivno kontrolo pri testu gibljivosti. V ta vektor smo preklonirani pripravljene mutante flagelina.

pSB1-AK3, pSB1-AK8

Vektorja sta bila uporabljena v tekmovanjih iGEM v prejšnjih letih, konstrukte smo uporabili kot pozitivno (mCitrine-link-mCerulean v pSB1-AK3 oz YFP-link-CFP) in negativno (YFP v pSB1-AK8 in CFP v pSB1-AK8) kontrolo za FRET.

3.1.6 Oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo

Preglednica 9: Oligonukleotidi, uporabljeni v diplomskem delu

Oznaka oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje
SaTy-R90A-F	5' CAACAACCTGCAGGCCGTGCGTGAACCTGG 3'
SaTy-R90A-R	5' CCAGTTCACGCACGGCCTGCAGGTTGTTG 3'
SaTy-E83R-F	5' GAAGGCGCGCTGAACCGGATCAACAACAACCTG 3'
SaTy-E83R-R	5' CAGGTTGTTGTTGATCCGGTTCAGCGCGCCTTC 3'
SaTy-R90D-F	5' CAACAACCTGCAGGATGTGCGTGAACCTGG 3'
SaTy-R90D-R	5' CCAGTTCACGCACATCCTGCAGGTTGTTG 3'
SaTy-R90N-F	5' CAACAACCTGCAGAACGTGCGTGAACCTGG 3'
SaTy-R90N-R	5' CCAGTTCACGCACGTTCTGCAGGTTGTTG 3'
SaTy-E93R-F	5' CAGCGTGTGCGTCGCCTGGCGGTTCAATC 3'
SaTy-E93R-R	5' GACTGAACCGCCAGGCGACGCACACGCTG 3'
SaTy-R431D-F	5' GTGCGGTACAGAACGATTTCAACTCCGCTATTACC 3'
SaTy-R431D-R	5' GGTAATAGCGGAGTTGAAATCGTTCTGTACCGCAC 3'
SaTy-N438D-F	5' CTCCGCTATTACCGACCTGGGCAACACCG 3'
SaTy-N438D-R	5' CGGTGTTGCCAGGTCGGTAATAGCGGAG 3'
Gib_FliC_pRP_F	5' GTAATTGATAAGGAAAAGATCATGCGCACAAAGTCATTAATACAAAAC 3'
Gib_FliC_pRP_R	5' GGTGAATCAATCGCCGATTAACGCAGTAAAGAGAGG ACG 3'
Gib_pRP_FliC_R	5' GTATTAATGACTTGTGCCATGATCTTTTCCTTATCAATTACAAC-3'
Gib_pRP_FliC_F	5' GTCCTCTCTTTACTGCGTTAATCCGGCGGATTGATTACCG 3'
Gib_mCer-TLR5_R	5' CAAAGGAGCAGGAAGGAATGCTTCCCCACTCCCACCG 3'
Gib_TLR5-pFLAG-CMV3_R	5' GAGTCGACTGGTACCGATAGATCTTTAGATGTAGCGGTATG 3'
Gib_pFLAG-CMV3-F	5' CCGCTACATCTAAAGATCTATCCGTACCAGTCGACTCTAG 3'
Gib_mCer-pFLAG_F	5' GAATTCATCGATAGATCTGATAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA G 3'
Gib_pFLAG-mCer_R	5' CGCCCTTGCTCACCATTATCAGATCTATCGATGAATTCGCG 3'
Gib_FliC_pET_F	5' CGACAAGCATATGCTCGAGATGGCACAAAGTCATT AATACAAAAC 3'
Gib_FliC_link_mCer_R	5'CTTGCTCACACCAGATCCAGAACCACGCAGTAAAGAGAGGACGTTTTG 3
Gib_mCer_link_FliC_F	5' CTTTACTGCGTGGTTCTGGATCTGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGC 3'
Gib_mCer_pET_R	5' CTTTGTTAGCAGCCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCC 3'
Gib_pET_mCer_F	5' GGACGAGCTGTACAAGTAAGGATCCGGCTGCTAACAAAG – 3'

Podčrtani deli oligonukleotidov predstavljajo dele zaporedja, ki se prilegajo na matrično DNA. Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri metodi lepljenja po Gibsonu, so označeni po principu: Gib_fragment na katerega oligonukleotid nalega_fragment, s katerim želimo lepiti_F/R (forward ali reverse).

3.1.7 Organizmi

Preglednica 10: bakterijski sevi, uporabljeni v diplomskem delu

Sev	Genotip	Vir
DH5 α	F ⁻ / <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96, thi-1, relA1</i>	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana
BL21[DE3]pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> DE3) pLysS (Cam ^R)	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana
<i>Salmonella typhimurium</i> FliC-/FljB- ATCC 14028s	Δ FliC, Δ FljB, rezistenca na tetraciklin in kloramfenikol	darilo (dr. Edward Miao, dr. Alan Aderem, Institute for Systems Biology, Seattle)

Trajne kulture bakterij smo pripravili tako, da smo 750 μ l prekonočne kulture dodali 750 μ l sterilnega 50% glicerola in mikrocentrifugirke takoj zamrznili in jih shranili na -80 °C.

Preglednica 11: Celične kulture, uporabljene v diplomski nalogi

Celična kultura	Vir
HEK293	Carsten Kirschning (Tehnična Univerza München)

3.1.8 Gojišča

3.1.8.1 Gojišča za bakterije

Bakterije *E. coli* in *S. typhimurium* smo gojili v gojišču Luria-Bertani (LB). Za selekcijo uspešno transformiranih kolonij smo uporabili antibiotik, za katerega zapis za rezistenco nosi transformirani plazmid (ampicilin ali blastidicin).

Preglednica 12: Tekoče LB gojišče

Kemikalija	Količina
Gojišče LB po Millerju	25 g/l

Preglednica 13: Trdno LB gojišče

Kemikalija	Količina
Gojišče LB po Millerju	25 g/l
Agar	15 g/l
ampicilin	50 μ g/ml

Preglednica 14: Poltrdno LB gojišče za testiranje gibljivosti

<i>Kemikalija</i>	<i>Količina</i>
Gojišče LB po Millerju	25 g/l
Agar	3 g/l
ampicilin	50 µg/ml
IPTG	1 mM

Tekoče gojišče LB

Tekoče gojišče LB smo pripravljali tako, da smo ustrezno količino gojišča LB po Millerju raztopili v destilirani vodi in ga sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto. Gojišče smo nato hranili pri sobni temperaturi. Pred inokulacijo bakterij smo gojišču dodali antibiotik (ampicilin ali blastidicin v končni koncentraciji 50 µg/ml). Nacepljeno gojišče smo inkubirali 14 do 16 ur na stresalniku pri 37 °C in 160 vrt/min.

Trdno in poltrdno LB gojišče

Trdno in poltrdno gojišče smo pripravili tako, da smo ustrezno količino gojišča LB raztopili v destilirani vodi, dodali pa smo še ustrezno količino agarja (preglednici 13 in 14). Ko se je gojišče nekoliko shladilo, smo dodali še ampicilin in IPTG (koncentracije so navedene v preglednicah 13 in 14), gojišče rahlo premešali in razlili v sterilne petrijevke. Do uporabe smo petrijevke hranili v hladilniku. Nacepljene plošče smo inkubirali 16 ur pri 37 °C.

3.1.8.2 Gojišča za celične kulture

Za gojenje celične linije HEK293 smo uporabljali gojišče DMEM z 10% FBS.

3.2 METODE

3.2.1 Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin

Ves material, potreben za gojenje celičnih kultur in bakterij smo predhodno sterilizirali po standardnih postopkih:

- Sterilizacija v avtoklavu z vlažno toploto (20 minut, 121 °C in $1,2 \cdot 10^5$ Pa).

- Snovi, občutljive na povišano temperaturo, smo sterilizirali s filtracijo preko filtra s premerom por 0,2 μm .

3.2.2 Priprava genskih konstruktov

Za pripravo konstruktov, uporabljenih v diplomski nalogi, smo uporabili točkovno mutagenezo in metodo lepljenja po Gibsonu, katere princip delovanja je opisan v poglavju 2.6. Metode so opisane spodaj.

3.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Reakcije PCR smo izvedli z DNA-polimerazo AccuPrime *Pfx* in z DNA-polimerazo PfuUltra HF. polimerazo PfuUltra HF smo uporabljali pri pripravi mutant flagelina, v sklopu kompleta za mutagenozo "quick change". Količine posameznih komponent za pripravo ene reakcijske mešanice so prikazane v preglednici 15, temperaturni profil je prikazan v preglednici 16. Ostale reakcije PCR smo izvedli s polimerazo AccuPrime *Pfx*, količine so navedene v preglednici 17, temperaturni profil pomnoževanja v preglednici 18.

Preglednica 15: Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR s polimerazo PfuUltra HF za eno reakcijo

komponenta	Volumen v μl za 1 reakcijo
reakcijski pufer Pfu (10x)	2,5
Matrična DNA (10-15 ng)	2
dNTP mix (2,5 mM)	0,5
Quick solution	1,5
Primer 1 (5 pM)	1,2
Primer 2 (5 pM)	1,2
MQ	15,1
DNA polimeraza PfuUltra HF	1
Skupni volumen	25

Preglednica 16: Temperaturni profil reakcije PCR, uporabljene za postopek točkovne mutageneze s polimerazo PfuUltra HF

Stopnja		Temperatura	Čas
1.	začetna denaturacija	95 °C	1 min
2.	21 ciklov	denaturacija	95 °C
		prileganje*	55 °C
		podaljševanje	68 °C
3.	zaključno podaljševanje		68 °C
4.	konec		4 °C

Preglednica 17: Sestava reakcijske mešanice reakcije PCR s polimerazo AccuPrime Pfx za eno reakcijo

komponenta	Volumen v µl za 1 reakcijo
»AccuPrime Rxn Mix« (10x)	5
Matrična DNA (10-15 ng)	1
Primer 1 (5 pM)	1
Primer 2 (5 pM)	1
MQ	41
DNA polimeraza AccuPrime Pfx	1
Skupni volumen	50

Preglednica 18: Temperaturni profil reakcije PCR s polimerazo AccuPrime Pfx

Stopnja		Temperatura	Čas
1.	začetna denaturacija	95 °C	2 min
2.	30 ciklov	denaturacija	95 °C
		prileganje*	55 °C
		podaljševanje	68 °C
3.	zaključno podaljševanje		68 °C
4.	konec		4 °C

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

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

kjer pomenijo oznake G, C, A in T število posameznih nukleotidov v delu začetnega oligonukleotida, ki prilega na matrico. Pri točkovni mutagenezi je bilo potrebno nekaj optimizacije temperature prileganja, da smo dobili prave mutacije.

3.2.2.2 Elektroforeza na agaroznem gelu

Uspešnost reakcij PCR smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Gel smo pripravili v določeni koncentraciji, odvisno od velikosti pričakovanih fragmentov DNA, običajno smo pripravljali 1 ali 1,2-odstotni gel (m/v). Ustrezno količino agaroze smo zatehtali in jo raztopili v 100 ml 1x pufra TAE v mikrovalovni pečici, nato smo mešanico nekoliko ohladili in ji dodali 2 μ l etidijevega bromida (10 g/l), vlili v kadičko za elektroforezo in počakali, da se gel strdi. Vzorcem DNA smo dodali 1/6 končnega volumna 6-kratnega nanašalnega pufra in jih nanesli v žepke strjenega gela, vsakič smo nanesli še velikostni standard. Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti 100 V. Po koncu smo gel pod UV svetlobo fotografirali.

3.2.2.3 Čiščenje fragmentov DNA iz gela

Fragmente DNA pravilne velikosti smo iz gela izrezali in očistili po protokolu proizvajalcev s komercialno dostopnim kompletom (GeneJet™ Gel Extraction Kit), na koncu smo produkt raztopili v MQ in raztopini izmerili koncentracijo.

3.2.2.4 Merjenje koncentracije DNA

Natančno koncentracijo DNA smo določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 260 in 280 nm na napravi NanoDrop. Pri tem se upošteva, da raztopina z absorbanco 1 pri 260 nm vsebuje 50 μ g/mL dvoverižne DNA. Razmerje $A_{260} : A_{280}$ pove, kako čisti so vzorci (brez primesi proteinov, RNA, fenolov), sprejemljivo razmerje naj bi se gibalo med 1,7 in 1,9.

3.2.2.5 Lepljenje po Gibsonu

Priprava reakcijske mešanice

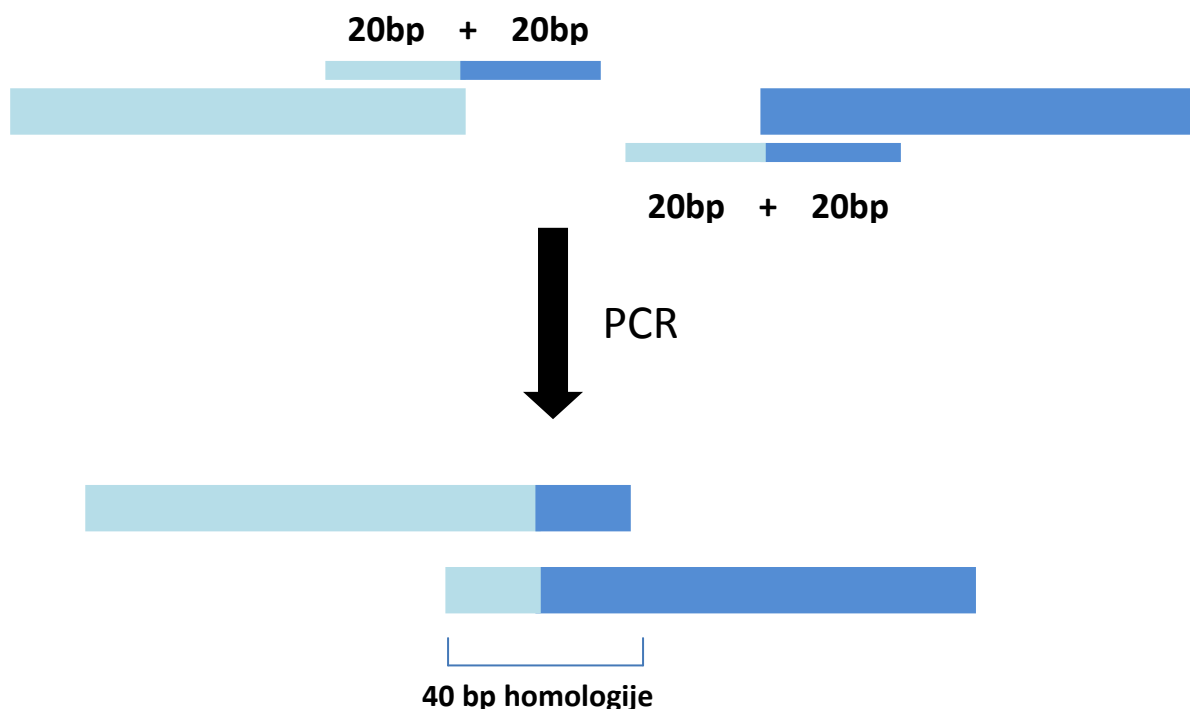
Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 19. Po pripravi smo razdelili mešanico v alikvote po 15 µl in jih shranili na -20 °C.

Preglednica 19: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo lepljenja po Gibsonu

komponenta	Volumen
Pufer 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

Oblikovanje začetnih oligonukleotidov za reakcijo PCR

Metoda temelji na homologiji koncev fragmentov, ki jih želimo sestaviti. Zato je prvi korak reakcija PCR, s katero s pomočjo začetnih oligonukleotidov fragmentom dodamo ustrezno zaporedje na 5' in 3' koncih. Oligonukleotide smo oblikovali tako, da smo imeli med fragmenti približno 40 bp homologije, torej so sestavljeni iz 20 bp prileganja in 20 bp sekvenc, homolognih fragmentom s katerimi jih želimo združiti (slika 11).



Slika 11: Shematski prikaz priprave fragmentov za združevanje z uporabo metode lepljenja po Gibsonu

Pomnožili smo torej fragmente in plazmid, kamor smo želeli fragmente vstaviti, tako da so si bili konci homologni. Uspešnost reakcij smo preverili z agarozno elektroforezo, fragmente pričakovanih velikosti smo izrezali iz gela, jih očistili in jim izmerili koncentracijo.

Izvedba reakcije lepljenja po Gibsonu

Epice s pripravljeno reakcijsko mešanico smo odtajali na ledu in dodali 5 μ l mešanice PCR produktov, ki smo jih želeli združiti. Dodali smo 10-100 ng vsakega fragmenta v masnem razmerju 1:1 (v originalnem protokolu so DNA združevali v ekvimolarnem razmerju, vendar se je tudi združevanje v enakem razmerju mas izkazalo za uspešno). Epice smo inkubirali 60 min pri 50 °C, nakar smo vseh 20 μ l reakcijske mešanice vnesli v kompetentne celice.

3.2.2.6 Transformacija kompetentnih celic *E. coli*

Vse konstrukte smo pripravljali in namnoževali v kompetentnih bakterijskih celicah *E. coli* DH5 α . Konstrukte smo vnesli v bakterije z metodo kemijske transformacije oz. z metodo s

toplotnim šokom. Kompetentne bakterijske celice (shranjene pri -80 °C) smo odtalili na ledu, jim dodali 20 µL Gibson reakcijske mešanice oziroma izbrano količino plazmidne DNA ter inkubirali na ledu 25 do 30 minut. Sledil je toplotni šok z inkubacijo 3 min pri 42 °C, potem zopet inkubacija na ledu 2-5 min, zatem pa smo dodali 1 mL gojišča LB in inkubirali 1 uro pri 37 °C s stresanjem pri 150 vrt./min. Celice smo zbrali s centrifugiranjem 3 min pri 7.000 vrt./min, usedlino celic smo nato resuspendirali v manjšem volumnu supernatanta in jo razmazali na trdno gojišče LB z ustreznim antibiotikom in inkubirali pri 37 °C čez noč.

3.2.2.7 Transformacija bakterije *S. typhimurium*

Pri bakteriji *S. typhimurium* se metoda kemijske transformacije ni izkazala za uspešno, zato smo uporabili elektroporacijo.

Priprava elektrokompetentnih celic *S. typhimurium*

V 50 ml sterilnega gojišča LB smo dodali 500 µl prekonočne kulture *S. typhimurium* in inkubirali pri 37° C s stresanjem pri 150 vrt./min dokler OD_{600nm} ni narasel do 0,6, nakar smo celice hladili na ledu 20 min. Nato smo celice centrifugirali 20 min pri 7000g v ohlajeni centrifugi in usedlino raztopili v 50 ml destilirane vode. Celice smo zopet inkubirali 20 min na ledu in jih ponovno centrifugirali pri enakih pogojih, tokrat smo usedlino raztopili v 25 ml destilirane vode. Postopek smo ponovili še dvakrat, pri čemer smo prvič raztopili usedlino v 2 ml ohlajenega 10% (m/v) glicerola in v zadnji stopnji v 500 µl ohlajenega 10% glicerola. Nato smo po 45 µl celic zamrznili pri -80 °C do uporabe.

Transformacija *S. typhimurium* z elektroporacijo

45 µl kompetentnih celic smo prenesli v ohlajene kivete, dodali 2 µl plazmida, rahlo premešali s pipeto in vstavili v komorico elektroporatorja, kjer smo celice izpostavili električnemu pulzu. Pogoji elektroporacije so bili 2,5 kV, 200 Ω, 25 µF. Celice smo takoj po elektroporaciji prenesli v 950 µl gojišča LB, ogretega na 37 °C in jih pri tej temperaturi inkubirali 1 h pri 150 vrt./min. Nato smo celice centrifugirali 3 minute pri 7.000 vrt./min, jih resuspendirali v manjšem volumnu in razmazali na trdno gojišče LB z ustreznim

antibiotikom in inkubirali pri 37° C čez noč. Tako transformirane seve smo nato uporabili za test gibljivosti.

3.2.2.8 Izolacija plazmidne DNA

Za izolacijo plazmidne DNA smo uporabili komercialno dostopen komplet (Fermentas: GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) in izolacijo izvedli po navodilih proizvajalca. Izolacija plazmidne DNA temelji na alkalni lizi celic in vezavi plazmidne DNA na kolono. DNA smo v zadnji stopnji eluirali v 100 µl sterilne vode MQ. Nato smo izolirani DNA izmerili koncentracijo s pomočjo naprave NanoDrop. Rastopine plazmidne DNA smo shranjevali pri -20 °C.

3.2.2.9 Rezanje DNA z restrikcijskimi encimi

Z restrikcijskimi encimi smo, glede na velikost restrikcijskih fragmentov, preverili uspešnost sestave DNA konstrukta. Reakcijske zmesi so vsebovale:

- 1–3 µg DNA,
- 3 µl 10-kratnega pufra za restrikcijski encim,
- 0,5 µl restrikcijskega encima (10 U/µl) za 1 µg DNA,
- sterilno MQ do končnega volumna 30 µl.

3.2.2.10 Določevanje nukleotidnega zaporedja

Za končno potrditev pravilnega zaporedja smo konstrukte, za katere smo na podlagi restrikcijske analize domnevali, da so pravilno sestavljeni, poslali podjetju Eurofins MWG Operon v Nemčiji, ki je določilo nukleotidno zaporedje. Dobljene rezultate smo analizirali s programoma Gene Runner v. 3.05 (Hastings Software) in EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (EBI) ter tako preverili ali je zaporedje pravilno oziroma ali je morda prišlo do mutacij med pomnoževanjem s PCR.

3.2.2.11 Točkovna mutageneza

Za točkovno mutagenezo smo uporabili komercialno dostopni komplet QuikChange™ Site-Directed mutagenesis Kit. Z reakcijo PCR smo pomnoževali celoten plazmid z

začetnimi oligonukleotidi, ki so vsebovali željeno točkovno mutacijo. Nato smo DNA v reakciji rezali z endonukleazo *DpnI*, ki reže metilirano DNA, torej razreže matrično DNA, ne pa tudi novonastalih produktov PCR. Reakcijsko mešanico smo nato vnesli v kompetentne celice DH5 α , kjer smo pričakovali samo plazmide z mutacijo, kar smo preverili tako, da smo DNA izolirali in poslali na določevanje nukleotidnega zaporedja. Mutacije smo pripravili v vektorju pET19b kjer je bil zapis za flagelin pod kontolo promotorja T7. S točkovno mutagenezo smo uvedli 7 različnih mutacij v ohranjene regije flagelina. Za pripravo in namnoževanje vseh mutiranih genov in namnoževanje nemutiranega gena smo uporabili bakterijski sev *E. coli* DH5 α .

3.2.3 Test giblivosti

Za test giblivosti smo uporabili bakterijski sev *S. typhimurium* *FliC-/FljB-*, ki ima gen za flagelin deaktiviran. Sev *S. typhimurium* *FliC-/FljB-* ne nosi zapisa za T7 polimerazo, zato smo pripravljene mutante s pomočjo metode lepljenja po Gibsonu vstavili v plazmid pRP4-*FliC*, ki omogoča indukcijo izražanja proteinov z IPTG preko promotorja *trc* (Brosius J. in sod., 1985). Divji tip *FliC* v plazmidu pRP-*FliC* smo zamenjali z mutirano različico. Plazmid pRP4-*FliC* smo pomnožili z reakcijo PCR, tako da linearni produkt PCR ni vseboval gena *FliC*. Pomnožek je vseboval le krajše homologne konce gena *FliC*, ki so nam omogočili lepljenje z mutiranimi različicami gena. V reakciji PCR smo z začetnimi oligonukleotidi Gib_pRP4_*FliC*_F in Gib_pRP4_*FliC*_R pomnožili plazmid pRP4-*FliC*, z začetnimi oligonukleotidi Gib_*FliC*_pRP4_F in Gib_*FliC*_pRP4_R smo pomnožili posamične mutirane gene za flagelin. Produkta reakcije PCR smo združili z metodo lepljenja po Gibsonu. Pravilnost vseh genskih konstruktov smo preverili z določevanjem nukleotidnega zaporedja. Plazmide z zapisom za mutirani flagelina smo nato z elektroporacijo vnesli v elektrokompetentne celice *S. typhimurium* *FliC-/FljB-*, ki smo jih razmazali na trdno gojišče LB z ampicilinom in inkubirali 14-16 ur pri 37 °C. Kot pozitivno kontrolo testa smo uporabili *S. typhimurium* *FliC-/FljB-* s plazmidom, ki nosi zapis za divji tip flagelina, za negativno kontrolo pa sev, transformiran s praznim vektorjem z ampicilinsko rezistenco. Naslednji dan smo na eno ploščo s poltrdim gojiščem z antibiotikom in 1mM IPTG s sterilnim zobotrebcem nacepili po eno mutanto, na vsako ploščo posebej smo nacepili tudi pozitivno in negativno kontrolo in plošče inkubirali

pokonci pri 37 °C čez noč. Po inkubaciji smo plošče fotografirali in izmerili radij kolonij. Izračunali smo odstotek, ki ga predstavlja radij kolonije s plazmidom z zapisom za mutirani flagelin, v primerjavi z radijem kolonije s plazmidom, ki nosi zapis za nemutirani flagelin. Na ta način smo določili, za koliko se je gibljivost bakterij zmanjšala kot posledica določene mutacije flagelina v primerjavi z bakterijam, ki so vsebovale nemutirani flagelin.

3.2.4 Izolacija proteinov

V okviru diplomske naloge smo pripravili dva plazmida z zapisom za himerni flagelin, s fluorescentnima proteinoma mCITRIN in mCERULEN, vezanima na C-koncu, katere smo imeli namen izolirati. Proteinov na prenosu western nismo zaznali, zato nadaljnjih korakov izolacije, ki bi sledili, ne bom opisovala.

3.2.4.1 Transformacija in precepljanje v tekoče gojišče LB

Plazmide smo transformirali v celice *E. coli* sev BL21[DE3]pLysS, ki je prilagojen za izražanje rekombinantnih proteinov, katerih zapisi so vstavljeni v vektorje s T7-promotorjem. Bakterijske celice smo inkubirali čez noč pri 37 °C na trdnem gojišču LB z dodanim antibiotikom ampicilinom. Nato smo posamezne kolonije precepili v 100 ml sterilnega tekočega gojišča LB in dodali ustrezno količino ampicilina (100 µg/ml) in zopet preko noči inkubirali pri 37 °C, 100 vrt./min.

3.2.4.2 Fermentacija in indukcija izražanja proteina

Na spektrofotometru smo izmerili absorbanco vzorca prekonočne kulture pri 600 nm in preračunali volumen, ki ga je bilo potrebno inokulirati v 500 ml tekoče gojišče LB, da je bil končni OD₆₀₀ = 0,05–0,1, po naslednji formuli:

$$\text{Volumen (inokulum)} = \frac{A(\text{željena}) \cdot V(\text{gojišče})}{A(\text{OD}_{600\text{nm}})}$$

V tekoče gojišče smo torej nacepili izračunan volumen prekonočne kulture in dodali še antibiotik v končni koncentraciji 100 µg/ml ter inkubirali pri 37 °C in 160 vrt./min. Ves čas smo spremljali absorbanco pri 600 nm in ko je ta dosegla vrednost od 0,8 do 0,9, smo inducirali izražanje proteinov z dodatkom IPTG v končni koncentraciji 1 mM. Po indukciji je sledila inkubacija pri 25 °C 8 ur. Po končani inkubaciji smo gojišče z bakterijami prelili v centrifugirke in centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 5 000 vrt./min. Supernatant smo previdno odstranili.

3.2.4.3 Liza celic

Celice smo shranili pri -20 °C ali pa jih lizirali s pufrom za lizo »His tag« proteinov. Volumen liznega pufra je odvisen od volumna fermentacije. Za 500 ml fermentacijo smo dodali 10 ml liznega pufra. Dodali smo še CPI-His (mešanico proteaznih inhibitorjev za proteine s histidinskim repom) v razmerju 1:500 (v/v) in inkubirali 30 minut na ledu.

3.2.4.4 Soniciranje

Sledilo je soniciranje celic s sonikatorjem. Lizat smo odpipetirali v stekleno čašo, ki smo jo namestili v večjo čašo, napolnjeno z ledom. Soniciranje je potekalo pri nastavitvah pulza 1s ON, 2s OFF, času 3 minute in amplitudi 45 %. Sondo smo vsakokrat očistili z etanolom in destilirano vodo. Po soniciranju smo vzorec prenesli v čiste centrifugirke in centrifugirali 30 minut pri 12 000 vrt./min in 4 °C. Supernatant smo prenesli v sveže falkonke, supernatante in usedline smo shranili pri -20 °C. Nadaljevali smo z detekcijo proteina z SDS-PAGE elektroforezo in prenosom western, ki sta opisana v poglavju 3.2.6.11.

3.2.5 Delo s celično kulturo HEK293

3.2.5.1 Gojenje celic HEK293

Celična linija je primerna za poskuse z receptorji TLR, saj receptorjev TLR ne izraža, vsebuje pa gene, potrebne za signalno pot. Celično kulturo smo gojili v za to namenjenih posodicah v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂. Celice se pritrdijo na dno in rastejo v monosloju. Gojišče smo jim zamenjali približno vsake 3 dni, ko so zrastle do prevelike gostote pa smo jih s pomočjo tripsina odlepili od dna posodice in jih zredčili. Ob vsaki redčitvi ali pasaži smo si označili število pasaže, celice smo uporabljali za poskuse nekje do 10-te pasaže.

3.2.5.2 Transfekcija celic HEK293

Za meritve luciferazne aktivnosti smo celice HEK293 nacepili na ploščo s 96 luknjami in sicer po $1,8-2,5 \cdot 10^4$ celic na luknjo (skupni volumen suspenzije je 100 µL v posamezni luknji). Celice smo naslednji dan transficirali z ustrezno mešanico plazmidov s transfekcijskim reagentom JetPei™ po protokolu proizvajalca. V transfekcijski mešanici za luciferazni test so potrebni poročevalski plazmidi, to sta bila poročevalec Fluc (NF-κB-luc) in poročevalec Rluc (phRL-TK). Maso DNA v posamezni luknjici smo izenačili z dodatkom praznega plazmida pcDNA3. Transficirane celice smo inkubirali 1 dan pri 37 °C in 5% CO₂, nato pa smo jih stimulirali s komercialno dostopnim rekombinantnim flagelinom bakterije *S.tyhimurium* v koncentraciji 50 ng/ml.

Za potrditev izražanja proteinov v celicah HEK293, smo nacepili $3,5 \cdot 10^5$ celic na luknjo na ploščo s 6 luknjami, pri čemer je bil skupni volumen suspenzije 2 mL v posamezni luknji. Celice smo naslednji dan transficirali z željenim plazmidom s transfekcijskim reagentom JetPei™ po protokolih proizvajalca, transficirane celice smo inkubirali 48h pri 37° C in 5 % CO₂, nato smo celice lizirali in določili prisotnost proteina v lizatu.

Za mikroskopsko določitev izražanja proteinov smo celice HEK293 nacepili na ploščo z 8 luknjami, primerno za konfokalni mikroskop, in sicer po $1,5-2,5 \cdot 10^3$ celic v posamezno luknjo (skupni volumen 200 µL v posamezni luknji). Po 24 urah smo s transfekcijskimi

reagenti JetPei™, JetPrime™ ali lipofektamin celice transficirali z maksimalno 300 ng plazmidne DNA. Po nadaljnjih 18-20 urah inkubacije pri 37 °C in 5% CO₂ smo celice stimulirali s 50 ng/ml rekombinantnega flagelina, odvisno od poskusa. Po stimulaciji smo celice čez največ eno uro pregledali pod konfokalnim mikroskopom.

3.2.5.3 Dvojni luciferazni test

Aktivnost konstruktov smo določevali z uporabo dvojnega luciferaznega testa, ki temelji na aktivaciji signalne poti TLR5 preko aktivacije promotorja NFκB, pod kontrolo katerega je gen za kresničkino luciferazo. Celice smo transficirali s plazmidi z zapisom za himerne proteine, za katere smo želeli preveriti sposobnost aktivacije z ligandom. V celice smo s transfekcijo vnesli 20 ng himernih proteinov. V transfekcijsko mešanico smo dodali še potrebne reporterske plazmide, pGL2 (luciferazni reporterski vektor, ki vsebuje zapis za kresničkino luciferazo, pod kontrolo promotorja NFκB) in phRL-TK (*Renilla* luciferazni reporterski vektor, ki vsebuje zapis za *Renilla* luciferazo, pod kontrolo konstitutivnega promotorja). Dan po transfekciji smo celicam zamenjali gojišče in jim dodali 20 μl rekombinantnega flagelina (50 ng/ml). Po 24 urah smo celicam odstranili gojišče in jih lizirali z liznim pufrom, nato smo ploščo do naslednjega dneva zamrznili. Pufra za merjenje luciferazne aktivnosti smo pripravili tik pred uporabo. Pufer za merjenje luciferazne aktivnosti je vseboval 1-kratni luciferazni pufer, koencim A, DTT, ATP in D-luciferin. Pufer za merjenje aktivnosti *Renilla* pa 1-kratni *Renilla* pufer in coelenterazin. Ploščo z liziranimi celicami smo vstavili v luminometer Orion II. Injektorje smo najprej sprali in nato potopili v ustrezni pufer. Pri dvojnem luciferaznem testu luminometer najprej pomeni aktivnost kresničkine luciferaze (Fluc), nato pa še aktivnost *Renilla* luciferaze (Rluc). Ker imata oba encima različna substrata in delujeta pri različnih pH, je mogoče njuno aktivnost ločeno meriti v istem vzorcu. Aktivnost Rluc nam pove delež transficiranih celic, saj se *Renilla* luciferaza izraža konstitutivno in nam tako prikazuje delež celic, ki so sprejele plazmid z zapisom za Rluc, medtem ko nam aktivnost Fluc (Fluc pod IFNβ-promotorjem) kaže aktivacijo signalne poti TLR5. Razmerje Fluc/Rluc (RLE – relativne luciferazne enote) nam torej pove normalizirano vrednost stimuliranih celic glede na transficirane celice.

3.2.5.4 Fiksacija celic za mikroskopiranje

Stimulirane celice, namenjene za delo z mikroskopom, smo najmanj eno uro po stimulaciji fiksirali, tako da smo odsesali gojišče in jih enkrat sprali z 200 ml 1x PBS. Nato smo jim dodali 150 μ l 4% (m/v) paraformaldehida (PFA) in inkubirali na sobni temperaturi 10 min. PFA smo odsesali in celice 3x sprali z 1x PBS. Če smo celice takoj (v roku 1 ure) pogledali pod mikroskopom, smo jih pustili kar v PBS. Če smo jih hoteli fiksirati za dalj časa, smo PBS po zadnjem spiranju odsesali in celicam dodali po eno kapljico na sobno temperaturo ogretega reagenta za fiksacijo fluorescentnih proteinov ProLong Gold, ki vsebuje tudi barvilo DAPI, ki barva jedra.

3.2.5.5 Določanje izražanja proteinov

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS

SDS-PAGE omogoča ločbo proteinov skozi zamrežen gel na osnovi njihove velikosti oz molekulske mase. Med dve stekelci smo vlili najprej 10% ločitveni gel, ko je ta polimeriziral pa še 4% vstopni gel (preglednici 20 in 21). Gele smo navlažili in shranili do uporabe na 4°C.

Preglednica 20: sestava 10% ločitvenega 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 μ l
Akrlamid/bis 30 % stok	3,3 ml
10 % APS	50 μ l
TEMED	5 μ l

Preglednica 21: sestava 4% vstopnega SDS gela (volumen za 2 gela)

Komponenta	Volumen
VSTOPNI GEL (4%)	
MQ	3,05 ml
1,5 M Tris-HCl, pH=6,8	1,25 ml
10 % (w/v) SDS	50 µl
Akrilamid/bis 30 % stok	0,665 ml

Celične lizate smo sonicirali pri amplitudi 60% 30 min (1 s pulz in 1 s mirovanje), nato smo jih v ohlajeni centrifugi centrifugirali 30 min pri 13200 rpm. Supernatant smo prenesli v svežo epico in določili koncentracijo proteinov z testom BCA (ang. »bicinchoninic acid assay«), ki temelji na nastanku obarvanega produkta ob prisotnosti peptidnih vezi. S pomočjo standardov določimo umeritveno krivuljo, iz katere lahko odčitamo neznane koncentracije proteinov v vzorcu. Vzorce za elektroforezo smo pripravili tako, da smo jim dodali 4-kratni reducirajoči nanašalni pufer, s pipeto pomešali in nanесли v žepke gela, v svoj žepk smo dodali še proteinski velikostni standard. Za elektroforezo smo uporabili vertikalni sistem Mini-Protean II. Elektroforeza je potekala v 1-kratnem elektroforeznem pufru z SDS približno 45 min pri konstantni napetosti 200 V.

Prenos western

Po končani elektroforezi smo poliakrilamidni gel sprali z MQ in ga namočili v pufer za mokri prenos, prav tako smo v pufer namočili tudi nitrocelulozno membrano (z 0,45 µm velikimi porami), filtrirne papirje enake velikosti in gobice. Sestavili smo t.i. »sendvič«, značilen za prenos western: najprej gobica, filter papir, nato nitrocelulozna membrana, poliakrilamidni gel, filter papir in spet gobica. Sestavljen sendvič smo povaljali s stekleno palčko, da bi se znebili mehurčkov, ki bi utegnili motiti prenos proteinov. Prenos proteinov iz gela na membrano je potekal 1 uro pri konstantnem toku 350 mA. Po končanem prenosu smo membrano sprali z MQ in jo dali čez noč v 0,2-odstotni (m/v) I-BLOCK pri 4 °C. Na ta način smo blokirali prosta vezavna mesta na membrani. Naslednji dan smo membrano inkubirali najprej 1h s primarnimi protitelesi, raztopljenimi v 0,2-odstotni raztopini I-BLOCK, nato smo jo spirali in inkubirali še 45min v sekundarnih protitelesih, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (uporabljena protitelesa so navedena v preglednici 7). Detekcija je

potekala s substratom, ki je vseboval luminol, katerega hrenova peroksidaza oksidira. Pri tem se sprošča svetloba, ki jo zaznamo fotografsko.

Konstrukti s TLR5 imajo na 3' koncu označevalec AU1, zato smo uporabili primarna protitelesa proti AU1, redčena v razmerju 1:1000. Sekundarna protitelesa smo redčili v razmerju 1:4000. Po končnem spiranju sekundarnih protiteles smo membrano inkubirali 5min v reagentu ECL, nakar smo jo slikali z napravo G:BOX, 15 minut vsakih 45 sekund, da se je razvil ustrezen signal, slike smo nato primerno računalniško obdelali. Pričakovano velikost proteinov smo na podlagi AK zaporedja določili z uporabo prosto dostopnega spletnega orodja ProtParam.

3.2.6 Konfokalna mikroskopija

Za določanje lokalizacije fluorescenčno označenega proteina TLR5 ter za merjenje učinkovitosti metode FRET in rekonstitucijo cepljenih proteinov 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 zaslonko z numerično aperturo 1.40. Glede na vrsto fluorofora smo uporabili različne laserje, ki se razlikujejo po valovni dolžini laserske svetlobe.

Poleg izbire 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 proteine, označene s fluorescentnim proteinom mCERULEAN smo vzbujali z laserjem valovne dolžine 433 nm, oddano fluorescenco pa detektirali pri valovnih dolžini 470 – 520 nm. Himerne proteine, označene s proteinom mCITRIN smo vzbujali z laserjem valovne dolžine 516, oddano fluorescenco smo detektirali pri 525 – 540 nm. Za kontrolo smo uporabili še plazmid s proteinsko fuzijo »EEA1-cherry«, torej fuzijo proteina, ki se nahaja v endosomih (ang. »early endosomal associated protein«) in fluorescenčnega

proteina mCherry, ki ima ekscitacijski maksimum pri 587 nm in emisijski maksimum pri 610 nm.

Pri metodi bledenja akceptorja za določitev FRET-a, smo akceptor (mCITRIN) obsevali s stoodstotno močjo laserja valovne dolžine 516, tako da smo fluorofor uničili (uničenje fluorofora na tak način imenujemo bledenje, ang. »bleaching«). Posneli smo sliko celic pred in po bledenju akceptorja. Računalniški podporni program je izmeril intenziteto fluorescence donorja in akceptorja pred in po bledenju akceptorja in izračunal uspešnost FRETa (teoretične osnove izračuna so obrazložene v poglavju 2.4).

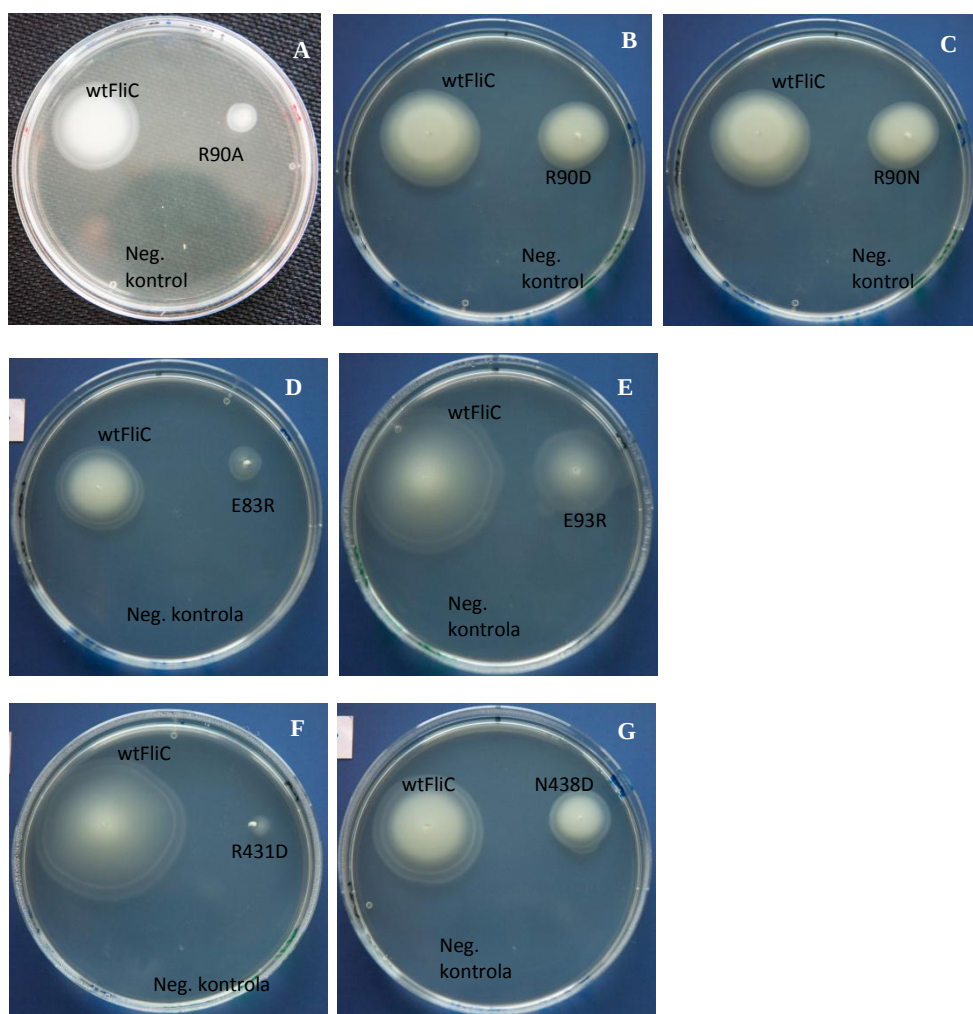
4 REZULTATI

4.1 VPLIV MUTACIJ FLAGELINA NA GIBLJIVOST BAKTERIJ

Monomeri flagelina se sestavljajo v protofilament, pravilno sestavljeni filament pa so ključnega pomena za gibljivost bička in posledično za gibljivost bakterij (Yonekura in sod., 2003). Mutacije v flagelinu lahko vplivajo na sestavo protofilamenta in tako zmanjšajo ali onemogočijo gibljivost bakterij. Pripravili smo sedem različnih točkovnih mutacij v N-terminalni (R90N, R90A, R90D, E83R in E93R) in C-terminalni (N438D in R431D) ohranjeni regiji flagelina bakterije *S. typhimurium*. Za test gibljivosti smo uporabili bakterijski sev *S. typhimurium* *FliC-/FljB-*, ki ima gen za flagelin deaktiviran. Plazmid pRP4-FliC z nemutiranim genom za flagelin bakterije *S. typhimurium* smo uporabili kot pozitivno kontrolo v testu gibljivosti. Za negativno kontrolo smo v celice vnesli prazen vektor pcDNA3. Kompetentne celice *S. typhimurium* *FliC-/FljB-* smo transformirali z elektroporacijo in razmazali na trdno gojišče LB. Naslednji dan smo po eno kolonijo precepili na poltrdno gojišče za testiranje gibljivosti. Vsaka plošče je vsebovala poleg testiranih kolonij, ki so izražale mutirani flagelin, tudi pozitivno in negativno kontrolo. Rezultati so predstavljeni v preglednici 22 in na sliki 12.

Giblјive bakterije se na poltrdnem gojišču širijo v koncentričnem krogu navzven od mesta inokulacije (slika 12). Grobo oceno gibljivosti nam omogoča meritev premera vidnega območja gibanja. Pri bakterijah, ki vsebujejo le prazen vektor pcDNA3, na ploščah nismo opazili gibanja, saj so kolonije vidne le kot manjše pike. Pri pozitivni kontroli smo opazili nastanek večjih krogov na vseh ploščah, kar je posledica gibanja bakterij, ki izražajo nemutirani flagelin (slike 12A-G). Na plošče smo nacepili tudi kolonije, katerim smo vnesli plazmid z zapisom za mutirane različice flagelina. Na sliki 12A, 12B in 12C vidimo vpliv mutacije na mestu 90 na gibljivost bakterij. Vidimo, da ima mutacija R90A, od treh preučevanih mutacij na tem mestu, največji vpliv na gibljivost (slika 12A). Tudi mutaciji R90D in R90N nekoliko zmanjšata gibljivost (sliki 12B in 12C). Mutacije E83R (slika 12D), E93R (slika 12E) in N438D (slika 12G) prav tako zmanjšajo gibljivost, medtem ko mutacija R431D gibljivost praktično izniči (slika 12F).

Na podlagi testa gibljivosti lahko mutante flagelina razdelimo v tri skupine. Gibljivost smo primerjali z gibljivostjo bakterij z nemutiranim flagelinom, tako da smo izmerili premer vidnega območja kolonije, ki je posledica gibanja po poltrdnem mediju. Mutacije, ki na gibljivost najmanj vplivajo so: R90D in R90N. Mutacije, ki gibljivost zmanjšajo za 30-60% ali manj so: R90A, E83R, E93R in N438D. Mutacija, ki gibljivost praktično izniči, je R431D (preglednica 22). Mutacije R90A, R90D, R90N, E83R in E93R se nahajajo v N-terminalnem in mutacije N438D in R432D v C-terminalnem ohranjenem delu aminokislinskega zaporedja flagelina.



Slika 12: Test gibljivosti. Vpliv mutacij R90A (A), R90D (B), R90N (C), E83R (D), E93R (E), R431D (F), N438D (G) na gibljivost bakterije *S. typhimurium* *FliC-/FljB-*. Na medij LBA (0,3% agar, 1mM IPTG) smo z zobatrebcem precepili kolonijo in spremljali rast na 37 °C 16-18h. Na vsaki plošči je poleg bakterije, ki izraža točkovno mutiran flagelin, nacepljena tudi pozitivna kontrola, *S. typhimurium* *FliC-/FljB-*, ki izraža divji tip flagelina in negativna kontrola, *S. typhimurium* *FliC-/FljB-*, transformirana s praznim vektorjem pcDNA3.

Preglednica 22: Mutacije flagelina in njihov vpliv na gibljivost bakterij

Oznaka mutacije	Mesto mutacije v AK zaporedju	Sprememba aminokisline	Sprememba nukleotidnega zaporedja	Odstotek zmanjšane gibljivosti*	Vpliv mutacije na gibljivost**
R90A	90	Arginin (R) v alanin (A)	CGT → GCC	65%	+ +
R90D	90	Arginin (R) v aspartat (D)	CGT → GAT	30%	+
R90N	90	Arginin (R) v asparagin (N)	CGT → AAC	30%	+
E83R	83	Glutamat (E) v arginin (R)	GAA → CGG	60%	+ +
E93R	93	Glutamat (E) v arginin (R)	GAA → CGC	40%	+ +
N438D	438	asparagin (N) v aspartat (D)	AAC → GAC	55%	+ +
R431D	431	Arginin (R) v aspartat (D)	CGT → GAT	90%	+ + +

*Odstotek zmanjšane gibljivost smo izračunali glede na divji tip, tako da smo primerjali premer vidne cone gibljivosti bakterij

**Vpliv mutacij, da zmanjšajo gibljivost glede na divji tip, smo razdelili v tri razrede: 70-100% zmanjšana gibljivost (+ + +), od 40-70% zmanjšana gibljivost (+ +) in od 0-40% zmanjšana gibljivost (+).

4.2 PRIPRAVA S FLUOROFORI OZNAČENEGA FLAGELINA

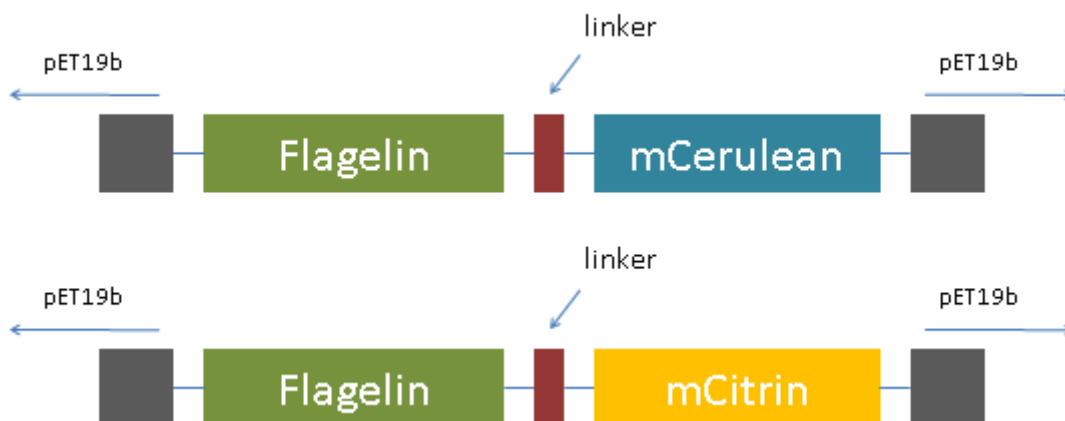
V literaturi navajajo, da monomer flagelina aktivira TLR5 (Andersen-Nissen in sod., 2003). Ker flagelin spontano polimerizira (Mimori-Kiyosue in sod., 1996), smo želeli preveriti, ali je mogoče, da so tudi dimeri oz. multimeri sposobni aktivirati receptor TLR5. V ta namen smo pripravili dva genska konstrukta, ki nosita zapis za flagelin, ki je preko 5 AK dolgega linkerja povezan z zapisoma za fluorescentna proteina, mCERULEAN in mCITRIN.

Posamezne gene in vektor smo sestavili skupaj v plazmid s pomočjo metode lepljenja po Gibsonu. Uporabili smo vektor pET19b, namenjen izražanju v bakterijskih celicah. Koraki lepljenja po Gibsonu so bili sledeči:

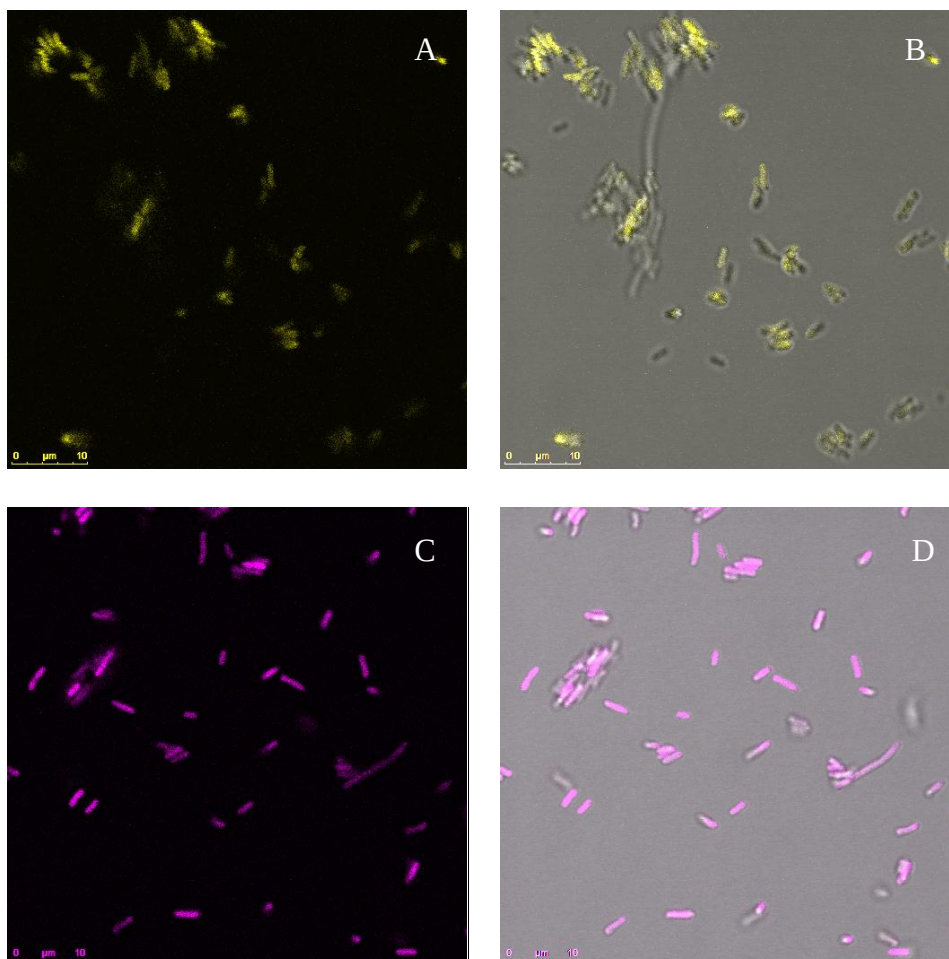
- V PCR reakciji smo z začetnimi oligonukleotidi (Gib_FliC_pET19b_F, Gib_FliC_mCer_R) pomnožili gen za flagelin. Zaporedje linkerja je bilo vsebovano v oligonukleotidih.
- Gen za mCerulean oz. mCitrin brez start kodona smo pomnožili z začetnimi oligonukleotidi Gib_mCer_FliC_F in Gib_mCer_pET19b_R. Zaradi podobnosti zaporedij fluorescentnih proteinov smo za oba lahko uporabili iste začetne oligonukleotide.
- Z reakcijo PCR smo pomnožili tudi vektor z začetnimi oligonukleotidi Gib_pET19b_FliC_R in Gib_pET19b_mCer_F.
- PCR produkte smo združili z metodo lepljenja po Gibsonu

Pravilno sestavo genskih konstruktov smo potrdili z določevanjem nukleotidnega zaporedja (priloga 3). Shematski prikaz sestavljenih genskih konstruktov je prikazan na sliki 13. Tako sestavljene konstrukte smo nato vnesli v bakterijske celice *E. coli* BL21[DE3]pLysS in preverili izražanje himernih proteinov s konfokalnim mikroskopom.

Prekonočno kulturo bakterij smo kanili na objektno stekelce in pregledali pod konfokalnim mikroskopom. Kot je razvidno iz slike 14, se himerni flagelin, označen s fluoroforom, izraža v bakterijskih celicah ob indukciji z IPTG-jem. Na slikah 14A in 14B vidimo izražanje himernega proteina FLIC-mCER v bakterijskih celicah, na slikah 14C in 14D izražanje himernega proteina FLIC-mCIT.



Slika 13: Shematski prikaz pripravljenih plazmidov pFliC-mCer (zgoraj) in pFliC-mCit (spodaj).



Slika 14: Bakterije *E. coli* BL21[DE3]pLysS transformirane s plazmidom pFliC-mCit in pFliC-mCer. 10 μl prekonočne kulture, kateri smo dodali 1 mM IPTG, smo kanili na objektno stekelce, le tega pa pokrili s krovnim stekelcem. Preparat smo takoj pregledali pod konfokalnim mikroskopom. Na slikah A in B vidimo izražanje himernega proteina FLIC-mCER v bakterijskih celicah, na slikah C in D izražanje himernega proteina FLIC-mCIT.

4.3 DIMERIZACIJA RECEPTORJA TLR5 PO STIMULACIJI S FLAGELINOM

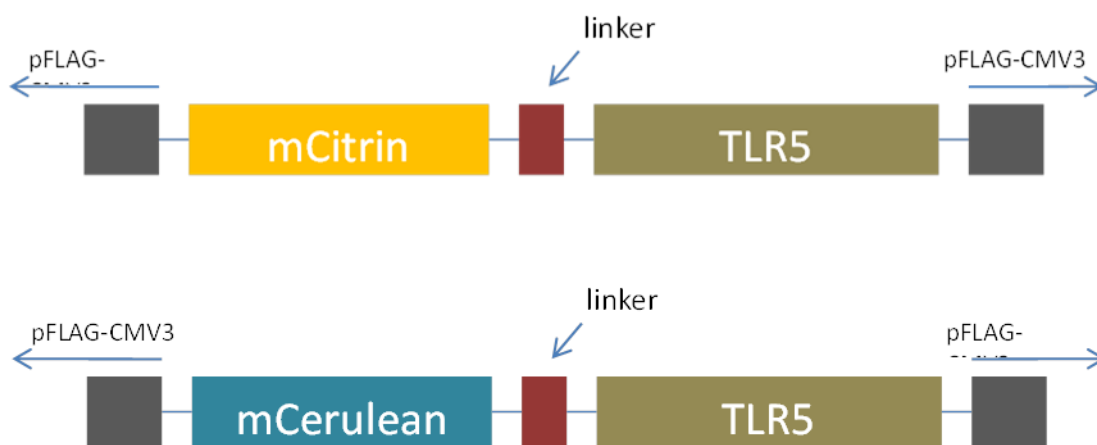
V literaturi obstaja nekaj predlaganih modelov dimerizacije TLR5 ob vezavi liganda, vendar natančen mehanizem še ni poznan. Teoretično sta v homodimeru možna dva načina postavitve receptorja. Monomera se lahko postavita paralelno, v tej postavitvi sta si posamezna N-terminalna konca blizu. Nastanek takšne oblike dimera bi lahko dokazali z metodo FRET ali metodo cepljenih proteinov. V nasprotnem primeru se lahko homodimer sestavi tako, da sta N-terminalna konca obrnjena vsak k sebi in sta v maksimalni oddaljenosti eden od drugega. V tem primeru pričakujemo minimalno uspešnost FRETa, prav tako ne pričakujemo rekonstitucije cepljenih proteinov. Ker smo želeli pokazati, na kakšen način se TLR5 sestavi v dimer, smo pripravili dva himerna proteina TLR5 s fluorescentnimi označevalci na N-terminalnem koncu, za metodo FRET. V isti namen smo pripravili dva konstrukta za metodo cepljenih proteinov, s po eno podenoto fluorofora vezano na N-terminalni konec TLR5. Himerne TLR5 smo vnesli v celične linije HEK293.

4.3.1 Metoda FRET

4.3.1.1 Priprava genskih konstruktov za metodo FRET

Za metodo FRET smo pripravili konstrukt *mCit-link-TLR5* v pFLAG-CMV3 (v nadaljevanju pmCit-TLR5) z uporabo metode lepljenja po Gibsonu. Konstrukt *mCer-link-TLR5* v pFLAG-CMV3 (v nadaljevanju pmCer-TLR5) kot tudi plazmide za pozitivno in negativno kontrolo metode FRET smo pridobili iz zbirke plazmidov Kemijskega inštituta. Za pozitivno kontrolo smo uporabili genski konstrukt z zapisom za mCerulean brez stop kodona, povezanega preko kratkega linkerja z zapisom za mCitirin v vektorju pSB1-AK3 (v nadaljevanju pmCit-link-mCer). Za negativno kontrolo smo uporabili plazmid pSB1-AK8, z zapisom za mCerulean in pSB1-AK8, z zapisom za mCitirin (V nadaljevanju pmCit-AK8 in pmCer-AK8). Celično lokalizacijo in aktivnost himernih proteinov TLR5, ki so imeli fuzijo na N-terminalnem koncu, smo primerjali tudi s proteinom TLR5-CFP, ki je izražen v vektorju pFLAG-CMV3 (v nadaljevanju plazmid pTLR5-CFP), torej s konstruktom s fuzijo na C-terminalnem koncu.

Genska konstrukta *mCit-link-TLR5* in *mCer-link-TLR5* sta vstavljena v vektor pFLAG-CMV3 in imata sledečo zgradbo (slika 15): start kodonu sledi označevalec FLAG, nato zapis za mCerulean oz. mCitrin brez stop kodona, ki se preko 10 AK dolgega linkerja povezuje z zapisom TLR5 brez začetnega metionina in na koncu še označevalec AU1. Linker smo dodali z začetnimi oligonukleotidi in je predstavljal del homologije, potrebne za reakcijo lepljenja po Gibsonu. Zaporedja so shematsko prikazana spodaj in ustrezajo zaporedjem pripravljenih konstruktov, kar smo potrdili z določevanjem nukleotidnega zaporedja (priloga 1).



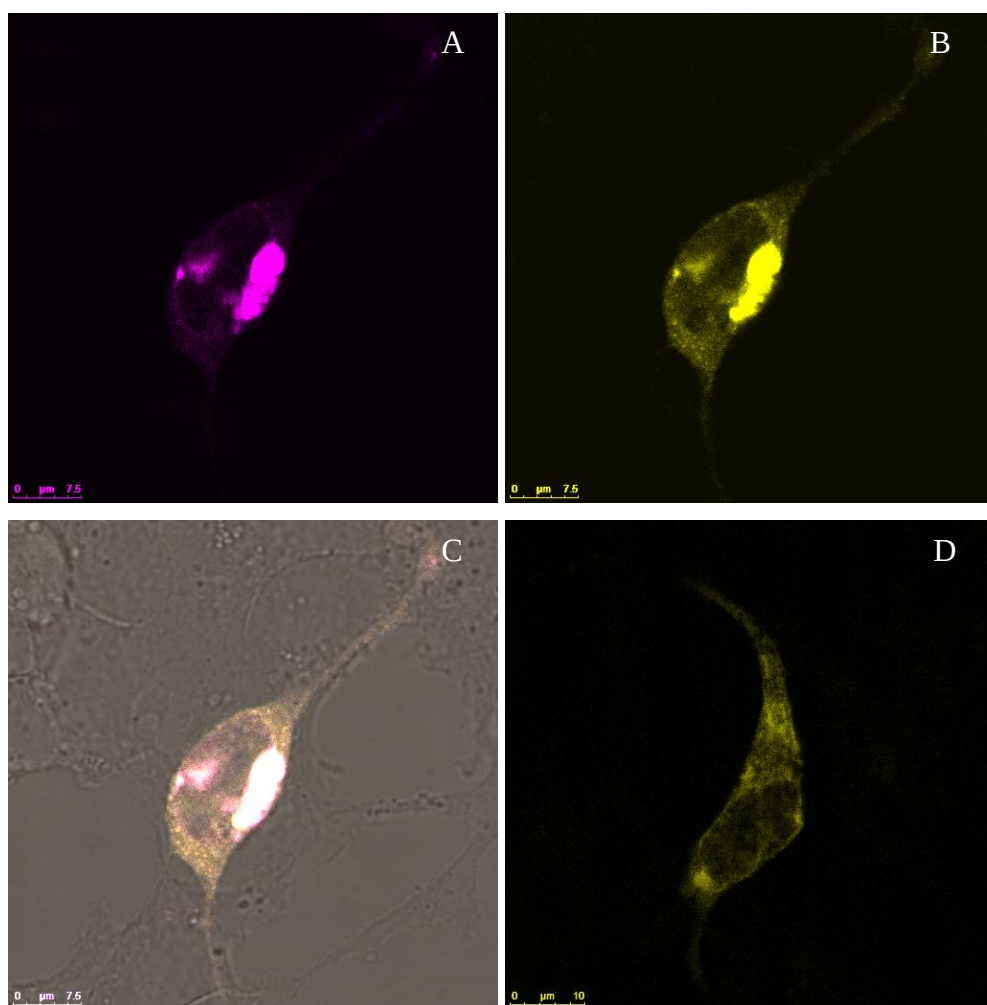
Slika 15: Shematski prikaz konstruktov za metodo FRET. Na zgornji shemi je prikazana sestava plazmida pmCit-TLR5, na spodnji shemi sestava plazmida pmCer-TLR5.

Priprava genskih konstruktov in vstavljanje v ekspresijski vektor pFLAG-CMV3 je potekala po sledečih stopnjah:

- S PCR reakcijo smo pomnožili zapis za mCitrin in TLR5 z začetnimi oligonukleotidi (Gib_mCit_pFLAG_F in Gib_mCer_TLR5_R za mCitrin in Gib_TLR5_mCit_F in Gib_TLR5_pFLAG_R za TLR5).
- Pomnožili smo tudi ekspresijski vektor pFLAG-CMV3 z začetnimi oligonukleotidi Gib_pFLAG_TLR5_F in Gib_pFLAG_mCer_R.
- PCR produkt mCitrin-a, TLR5 in vektorja smo združili z metodo lepljenja po Gibsonu

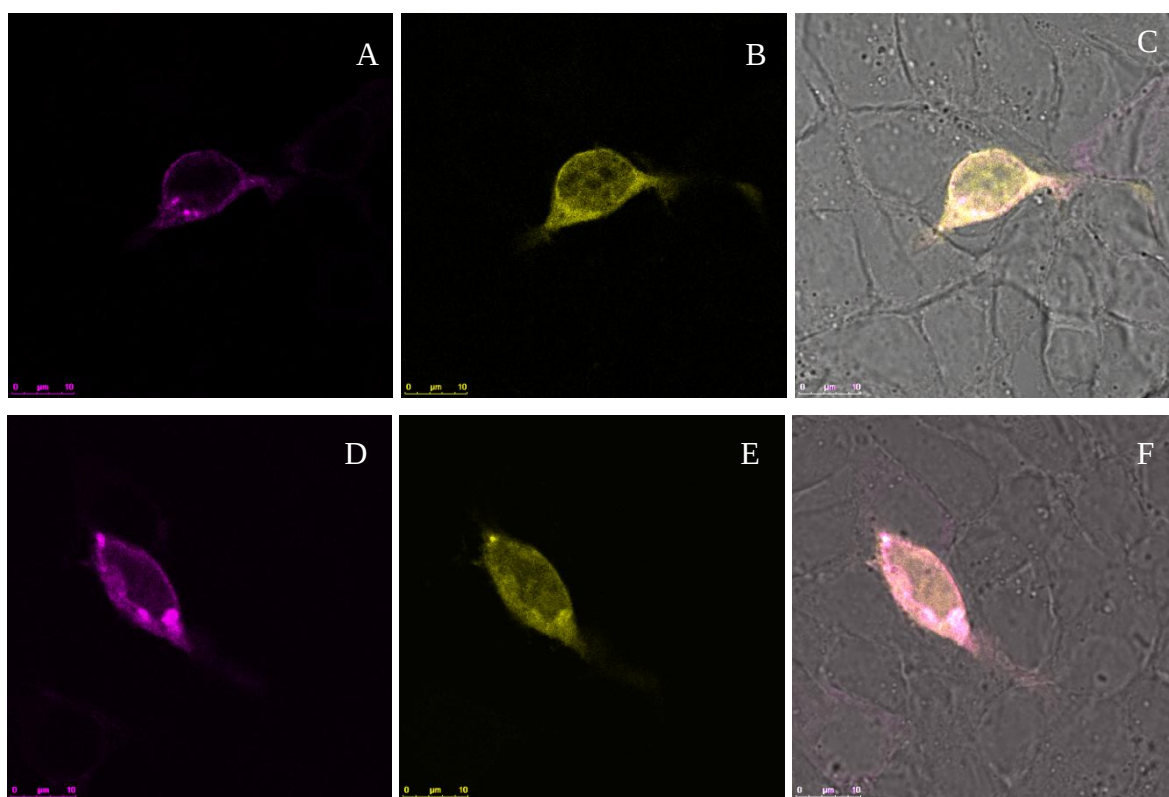
4.3.1.2 Celična lokalizacija receptorja TLR5, označenega s fluorescentnim poročevalskim proteinom na N ali C-terminalnem koncu

Receptor TLR5 je transmembranski protein tipa I, ki je izražen na površini celic (Feuillet in sod., 2006). Želeli smo preveriti, ali je celična lokalizacija pripravljenih himernih proteinov mCIT-TLR5 in mCER-TLR5 podobna opisani lokalizaciji receptorja TLR5. Za primerjavo smo uporabili himerni protein TLR5-CFP. Celično porazdelitev omenjenih proteinov smo spremljali v celicah HEK293.



Slika 16: Izražanje in celična porazdelitev himernih proteinov mCIT-TLR5, mCER-TLR5 in TLR5-CFP v celicah HEK293. Celice na sliki A in B smo kotransficirali s 150 ng pmCit-TLR5 in 150 ng pmCer-TLR5. Celice smo vzbujali z ustreznimi valovnimi dolžinami, na sliki A vidimo izražanje proteina mCIT-TLR5, na sliki B mCER-TLR5 in na sliki C sestavljeno sliko s presevno svetlobo in prekrivanjem signala obeh vzbujenih fluoroforov. Na sliki D vidimo celice, transficirane s plazmidom pTLR5-CFP (300ng).

Iz slike 16 je razvidno, da se proteini mCIT-TLR5 in mCER-TLR5 izražajo v zadostni količini in da je lokalizacija proteinov podobna lokalizaciji TLR5-CFP (slika 16D). Opazili smo, da se večina proteinov mCIT-TLR5 in mCER-TLR5 nahaja v endosomih in endoplazemskem retikulumu, le malo proteina se nahaja na membrani. Na sliki 16C vidimo na podlagi prekrivanja signalov obeh vzbujenih fluoroforov, da se proteina mCER-TLR5 in mCIT-TLR5 izražata na istih lokacijah v celici.

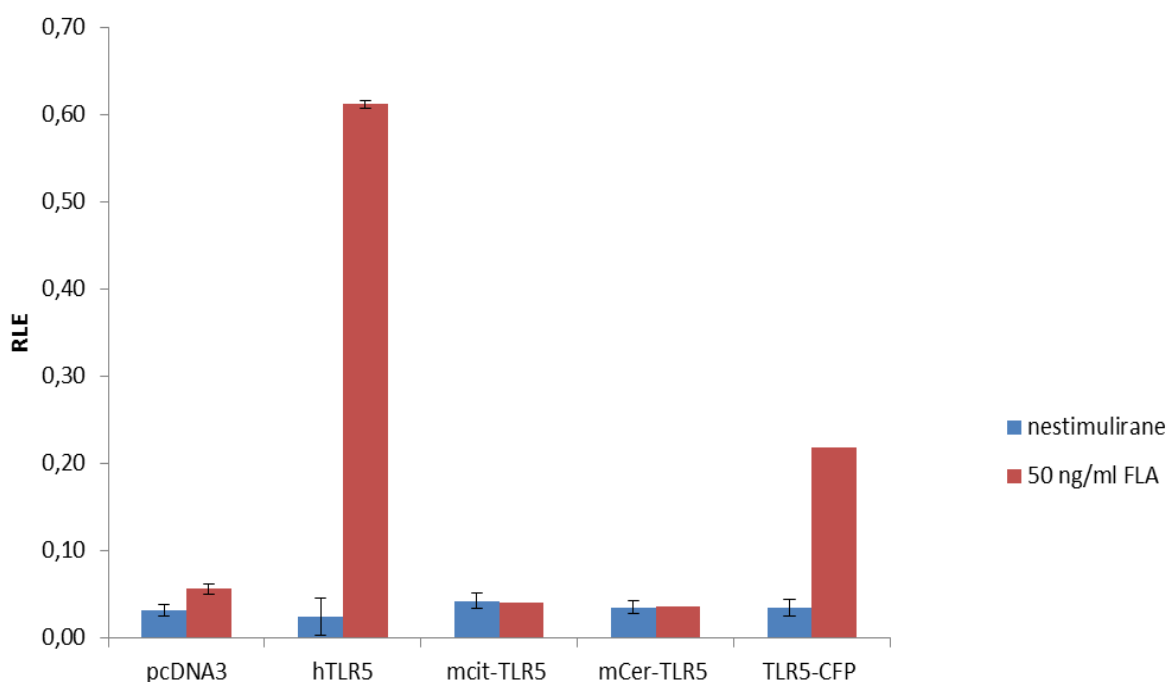


Slika 17: Izražanje in prostorska porazdelitev mCIT-TLR5 in mCER-TLR5 v celicah HEK293 pred in po stimulaciji s flagelinom. Celice HEK293 smo kotransficirali s plazmidoma pmCit-TLR5 (150ng) in pmCer-TLR5 (150ng) in jih stimulirali s flagelinom *S. typhimurium* 50 ng/ml. [A-C] Celice pred stimulacijo s flagelinom in [D-F] celice stimulirane s flagelinom. A in D prikazujeta izražanje proteina mCER-TLR5, B in E prikazujeta izražanje proteina mCIT-TLR5 in sliki C in D prikazujeta sliko s presežno svetlobo skupaj s prekrivanjem signala obeh fluoroforov.

Primerjali smo tudi celično razporeditev himernih proteinov pred in po stimulaciji s flagelinom. Na sliki 17 (A-C) vidimo nestimulirane celice, na sliki 17 (D-F) pa celice, stimulirane s 50 ng/ml flagelina. Po stimulaciji smo opazili povečanje zgoščevanje himernih proteinov v endosomih

4.3.1.3 Sposobnost odziva himernih proteinov mCIT-TLR5 in mCER-TLR5 na aktivacijo s flagelinom

Želeli smo preveriti, ali dodatek fluoroforma na N-terminalni konec receptorja vpliva na funkcijo TLR5, torej na vezavo liganda in aktivacijo signalne poti. Aktivnost himernih receptorjev smo preverili na celičnih linijah HEK293 z uporabo dvojnega luciferaznega testa. Celične linije HEK293 smo transficirali s plazmidi pmCit-TLR5, pmCer-TLR5, pTLR5-CFP, pUNO-hTLR5 in pcDNA3. pcDNA3 je prazen plazmid, ki nam je služil za negativno kontrolo, pUNO-hTLR5 je plazmid z zapisom za humani flagelin in nam je služil za pozitivno kontrolo poskusa. Natančnejši postopek izvedbe dvojnega luciferaznega testa je opisan pod poglavjem 3.2.5.10. Aktivacijo izražanja reporterske luciferaze smo merili po dodatku komercialno dostopnega rekombinantnega flagelina bakterije *S. typhimurium*, v koncentraciji 50 ng/ml, le-to smo primerjali z aktivnostjo luciferaze brez dodatka liganda.



Slika 18: Grafični prikaz aktivnosti himernih proteinov, izražene v relativnih luciferaznih enotah. Celicam, transficiranim s pUNO-hTLR, pcDNA3, pmCit-TLR5, mCER-TLR5, TLR5-CFP in ustreznimi reporterskimi plazmidi smo 24 ur po transfekciji dodali flagelin ali PBS. Po 18h stimulacije smo celice lizirali in jim izmerili luciferazno aktivnost.

Rezultati (slika 18) so pokazali, da je receptor TLR5, ki ima na N-terminalnem koncu dodan fluorescentni protein, nesposoben vezave liganda in signalizacije preko TLR5 signalne poti, medtem ko hTLR5 in TLR5-CFP, ki ima fluorofor vezan na C-terminalnem koncu, v prisotnosti flagelina *S. typhimurium* aktivirata izražanje poročevalskega reporterskega proteina, ki je pod kontrolo promotorja NF κ B, pri čemer je nivo aktivacije TLR5-CFP nekoliko nižji v primerjavi s hTLR5.

4.3.1.4 Izvedba metode FRET

Postavitev receptorja TLR5 v dimeru smo preverili z metodo FRET. Za primerjavo smo uporabili tudi dve kontroli, negativno in pozitivno kontrolo. Medtem ko pričakujemo učinkovitost FRETa negativne kontrole do največ 5%, naj bi bila učinkovitost pozitivne kontrole do 30%.

Za **pozitivno kontrolo** smo uporabili konstrukt, v katerem sta v vektorju pSB1-AK3 zapisa za mCitrin in mCerulean eden za drugim, vmes je kratek vezavni linker. Gre torej za fuzijski protein obeh fluoroforov, pri katerem pričakujemo pozitiven FRET.

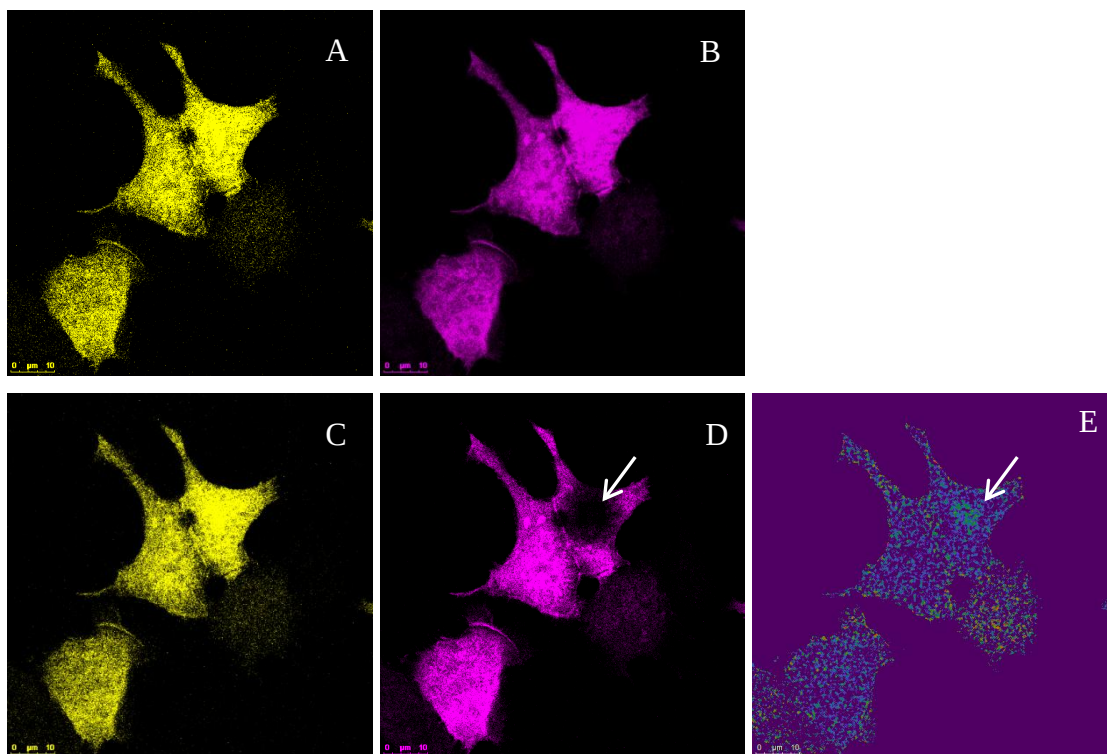
Za **negativno kontrolo** smo v celice vnesli dva plazmida, pmCit-AK8 z zapisom za mCITRIN in pmCer-TLR5 z zapisom za mCERULEAN, torej oba posamična proteina, v tem primeru smo pričakovali minimalni FRET. Oba konstrukta sta v vektorju pSB1-AK8. Poleg pozitivne in negativne kontrole, smo za nastavitve jakosti laserjev za vzbujanje fluoroforov mCitrin in mCerulean, napetosti detektorjev (fotopomnoževalk) in območja detekcije pripravili tudi celice, transficirane s posamičnimi plazmidi pmCer-TLR5 in pmCit-TLR5, ki nosijo zapis za proteina mCER-TLR5 in mCIT-TLR5.

Plazmida pmCer-TLR5 in pmCit-TLR5, ki izražata proteina mCIT-TLR5 in mCER-TLR5 smo hkrati vnesli v celice v dveh ponovitvah in eno od ponovitev po 18-20 h stimulirali s 50 ng/ml flagelina.

Za določanje učinkovitosti FRETa smo uporabili metodo bledenja akceptorja. To pomeni, da smo območje celice s fluorofori obsevali s 100-odstotno močjo laserja valovne dolžine

akceptorja (v našem primeru, laser valovne dolžine 516 nm). Na ta način smo akceptor na tem območju uničili, kar imenujemo bledenje akceptorja. Slike celic smo posneli pred in po bledenju akceptorja. Na podlagi razlik izmerjene fluorescence donorja in akceptorja pred in po obsevanju, smo s pomočjo programske opreme izračunali učinkovitost FRETa (preglednica 23).

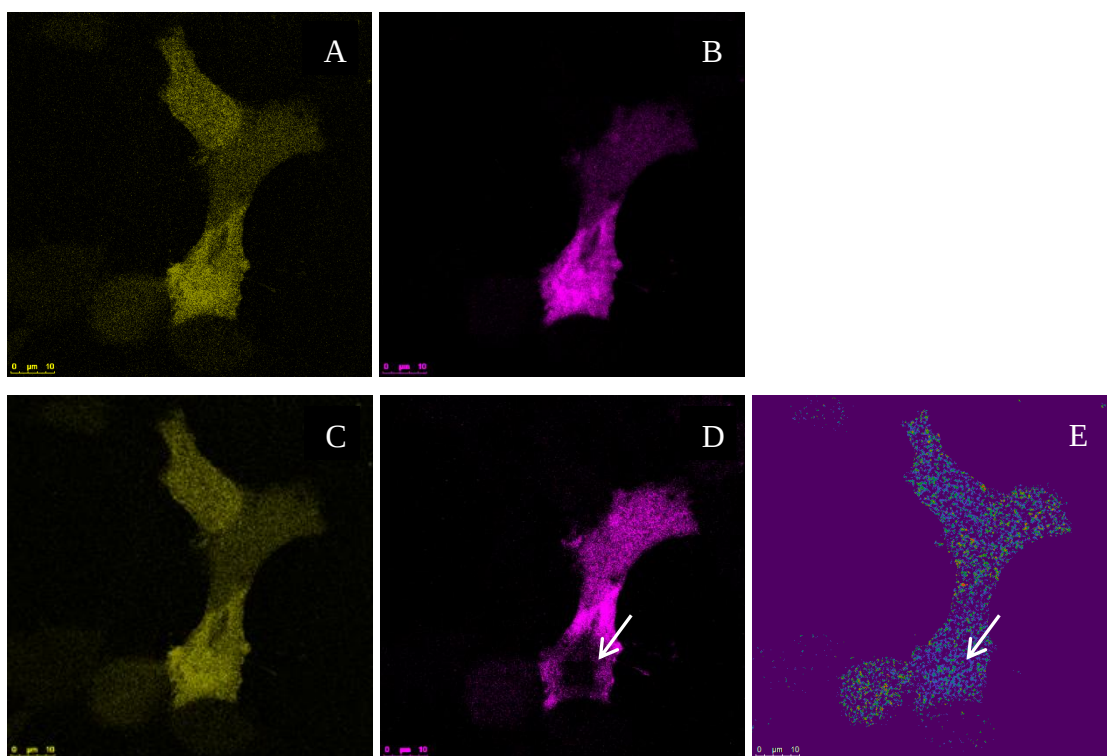
V prvi fazi smo za FRET analizo izbrali celice pozitivne in negativne kontrole, katerih intenziteta fluorescence je bila podobna. Za pozitivno kontrolo metode FRET smo celice HEK293 transficirali s plazmidom pmCit-link-mCer (300ng). Za negativno kontrolo smo celice transficirali s transfekcijsko mešanico, ki je vsebovala plazmida pmCit-AK8 (150 ng) pmCer-TLR5 (150 ng). Po 48 h smo celice fiksirali in preverili izražanje proteinov s konfokalnim mikroskopom (sliki 19 in 20). Za merjenje učinkovitosti FRETa smo uporabili metodo bledenja akceptorja.



Slika 19: pozitivna kontrola metode FRET. Celice HEK293 smo transficirali s 150 ng plazmida, ki nosi zapis za mCERULEAN-LINK-mCITRIN in se izraža v citosolu. Na zgornjih slikah vidimo donor (A) in akceptor (B) pred bledenjem (pre-bleach), na sliki C vidimo donor in na sliki D akceptor po bledenju akceptorja (post-bleach). Z belo puščico je označeno območje obsevanja. Na sliki E je prikazana z barvno lestvico uspešnost FRETa, določena z računalniškim programom Leica LAS AF Lite.

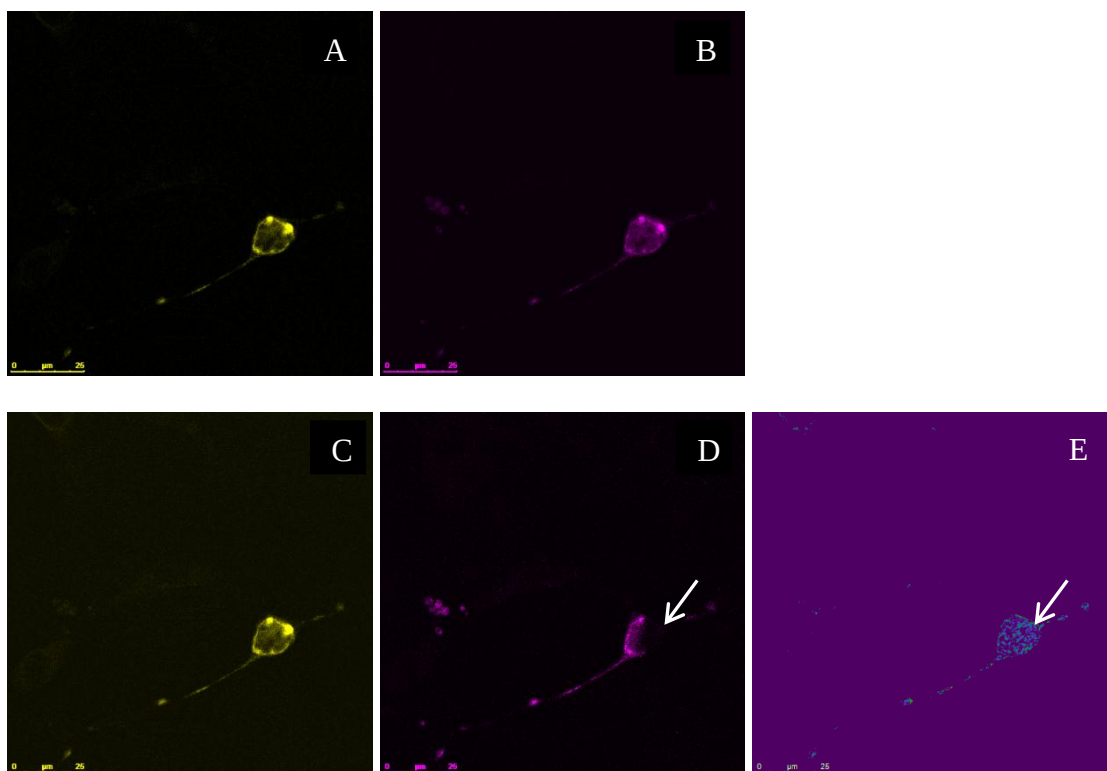
Pri analizi pozitivne kontrole z metodo FRET, smo po bledenju akceptorja z uporabo 100% moči laserja po pričakovanjih opazili, da se fluorescenca donorja poveča. Izračun računalniškega programa (po formuli omenjeni v poglavju 2.4) je pokazal, da je uspešnost FRETa v povprečju 20%.

Za negativno kontrolo smo uporabili celice, transficirane s plazmidoma, ki izražata mCITRIN in mCERULEAN kot ločena proteina (slika 20). Uspešnost FRETa pri negativni kontroli je znašala v povprečju 4%. Razliko med pozitivno in negativno kontrolo lahko vidimo tudi na slikah 19E in 20E, na katerih je z barvno lestvico ponazorjena stopnja uspešnosti FRETa. Na sliki 19E vidimo opazno razliko v barvi na območju bledenja akceptorja, označeno z belo puščico, medtem ko na sliki 20E podobnih razlik ni.

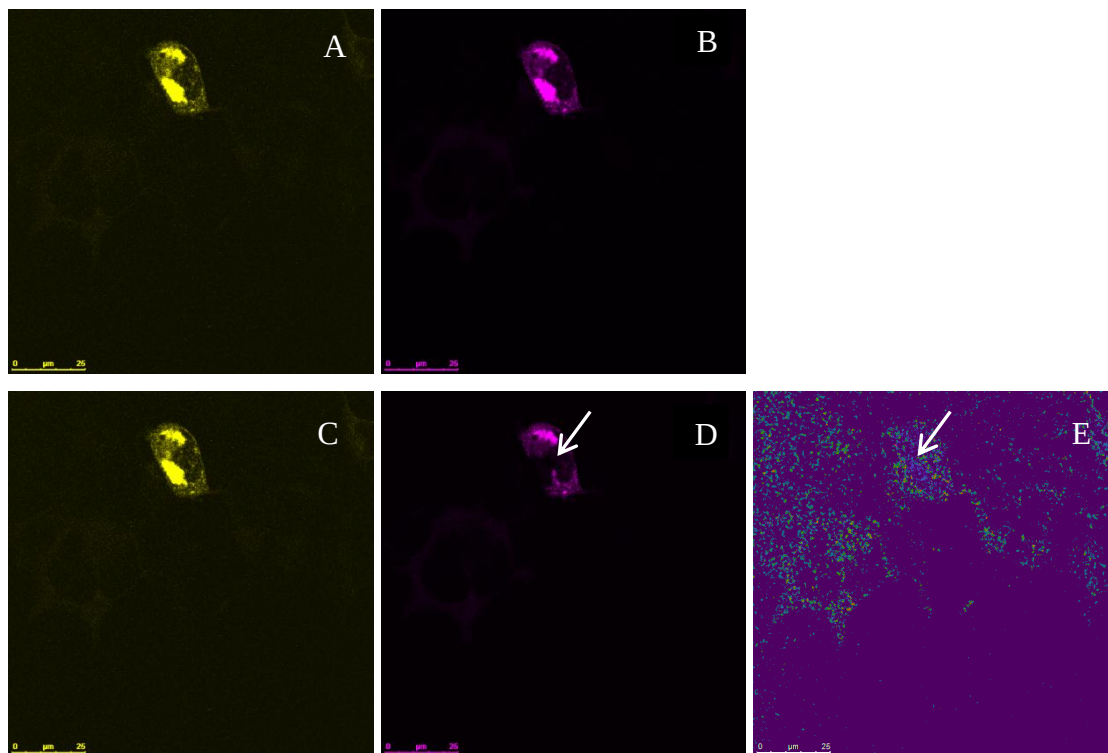


Slika 20: negativna kontrola metode FRET. Celice HEK293 smo transficirali s po 150 ng plazmidov, ki nosita zapis za proteina mCERULEAN in mCITRINE, ki se izražata v citoplazmi. Na zgornjih slikah vidimo donor (A) in akceptor (B) pred bledenjem (pre-bleach), na sliki C vidimo donor in na sliki D akceptor po bledenju (post-bleach). Z belo puščico je označeno območje obsevanja. Na sliki E je prikazana z barvno lestvico uspešnost FRETa, določena z računalniškim programom Leica LAS AF Lite.

Za analizo dimerizacije receptorja TLR5 smo celice HEK293 transficirali s transfekcijsko mešanico, ki je vsebovala plazmida pmCer-TLR5 (150ng) in pmCit-TLR5 (150 ng). Po 18 urah smo eno serijo transficiranih celic stimulirali s flagelinom (50 ng/ml), drugi pa dodali enak volumen 1x PBS. Za merjenje uspešnosti FRETa smo uporabili metodo bledenja akceptorja. Ker nas je zanimalo, ali pride do razlik v uspešnosti FRETa ob dodatku flagelina, smo izvedli eksperiment z nestimuliranimi celicami (slika 21) in s celicami, z dodanim flagelinom (slika 22).



Slika 21: FRET nestimuliranih celic, ki izražajo himerne proteine mCER-TLR5 in mCIT-TLR5. Celice Hek293 smo transficirali s plazmidoma z zapisom za mCER-TLR5 in mCIT-TLR5. Na zgornjih dveh slikah vidimo donor (mCER-TLR5, slika A) in akceptor (mCIT-TLR5, slika B) pred obsevanjem (pre-bleach), na spodnjih dveh slikah vidimo donor (C) in akceptor (D) po obsevanju (post-bleach). Z belo puščico je označeno območje obsevanja, na tem mestu lahko vidimo bledenje akceptorja. Na sliki E vidimo z barvno lestvico označeno stopnjo uspešnosti FRET.



Slika 22: FRET s flagelinom stimuliranih celic, ki izražajo himerne proteine mCER-TLR5 in mCIT-TLR5. Celice Hek293 smo transficirali s plazmidoma z zapisom mCER-TLR5 in mCIT-TLR5. Po 18 urah smo celicam dodali 50 ng/ml flagelina. Na zgornjih dveh slikah vidimo donor (mCER-TLR5, slika A) in akceptor (mCIT-TLR5, slika B) pred obsevanjem (pre-bleach), na spodnjih dveh slikah vidimo donor (C) in akceptor (D) po obsevanju (post-bleach). Z belo puščico je označeno območje obsevanja, na tem mestu lahko vidimo bledenje akceptorja na sliki D. Na sliki E vidimo z barvno lestvico označeno stopnjo uspešnosti FRET.

Po izračunu, ki ga je opravil program, ni bilo razlik med vrednostjo E pri stimuliranih (slika 22) in pri nestimuliranih celicah (slika 21). Vrednost je bila v povprečju primerljiva z izračunano vrednostjo negativne kontrole (preglednica 23). Dodatek flagelina torej ni imel vpliva na uspešnost FRETa. Iz rezultatov uspešnosti FRETa lahko torej sklepamo le, da receptor ob dodatku liganda ni dimeriziral, ali da ni dimeriziral na način, da bi bili N-terminalni konci himernega receptorja v zadostni bližini za FRET.

Preglednica 23: Uspešnost FRETa

	<i>pozitivna kontrola</i>	<i>negativna kontrola</i>	<i>Nestimulirane celice s FRET parom</i>	<i>Stimulirane celice s FRET parom</i>
E	20%	4%	5%	4%

Osnove izračuna so obrazložene v poglavju 2.4. Za vsak vzorec smo naredili vsaj deset meritev, celoten postopek od transfekcije do meritev smo večkrat ponovili. V preglednici 23 navajamo povprečja meritev.

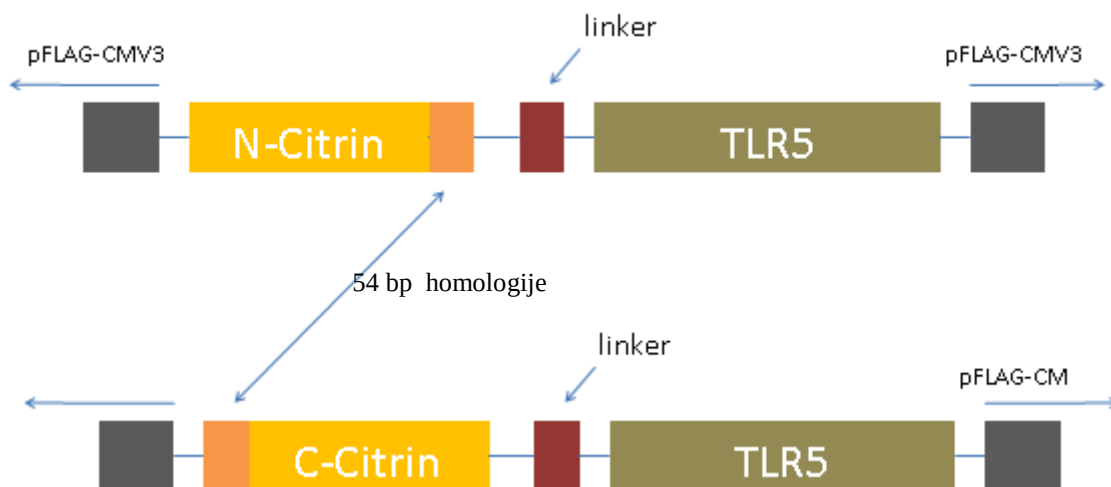
V povprečju je vrednost E za pozitivno kontrolo znašala 20%. Vrednost E za FRET-TLR5 je bila primerljiva z vrednostjo, določeno za negativno kontrolo in je znašala od 4-5%. Zaključimo lahko, da ob dodatku flagelina receptor TLR5 ne tvori dimera, pri katerem bi bila N-terminalna konca molekule v zadostni bližini za prenos fluorescentne energije.

4.4 CEPLJENI PROTEINI

Podobno kot z merjenjem uspešnosti FRETa smo tudi z metodo cepljenih proteinov skušali raziskati način dimerizacije TLR5. Metoda cepljenih proteinov, podobno kot metoda FRET temelji na zaznavanju fluorescence ob zadostni bližini analiziranih molekul. V primeru metode cepljenih proteinov razdelimo fluorofor na dve podenoti, ki se, ko sta zadosti blizu, sestavita v funkcionalen fluorescenčni protein, kar lahko zaznamo z merjenjem fluorescence. Plazmide, z zapisom za genske konstrukte cepljenih proteinov, vezanih na N-terminalni konec TLR5, je pripravila Karolina Ivičak (Kemijski inštitut).

4.4.1 Priprava genskih konstruktov s cepljenimi proteini

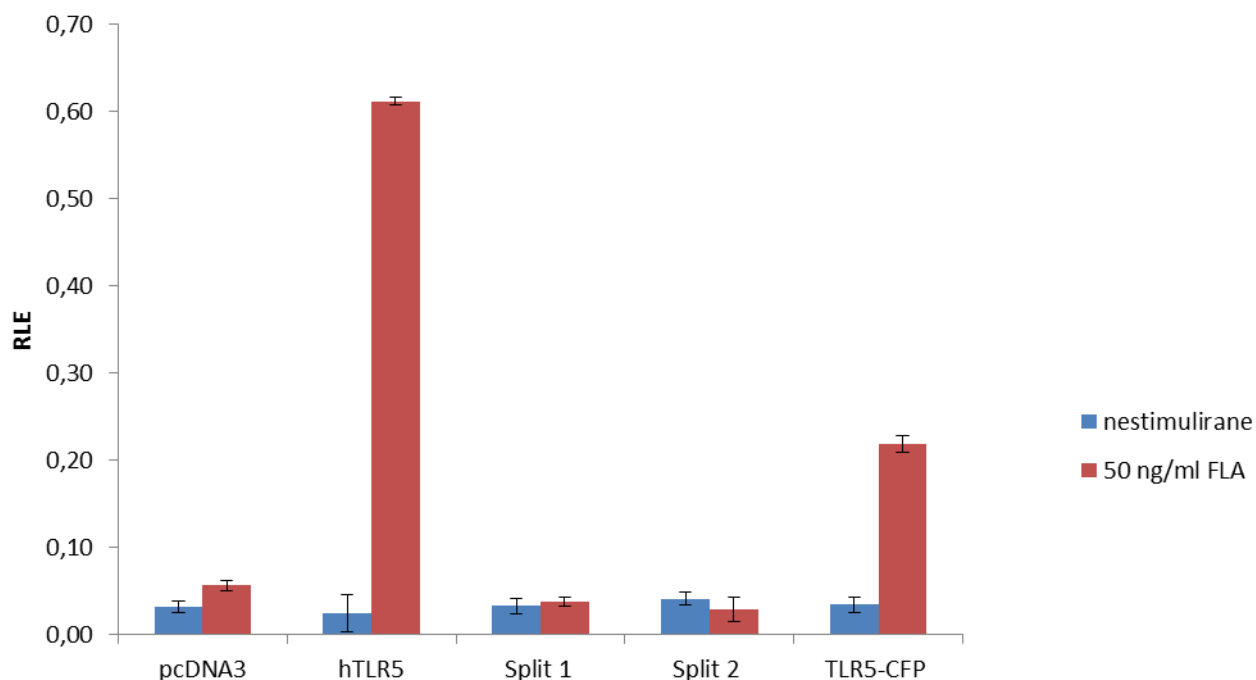
Plazmid pN-Cit-TLR5 (v nadaljevanju pSplit1, nosi zapis za protein SPLIT1) je sestavljen iz N-terminalnega konca podenote rumenega fluorescenčnega proteina mCitrin, ki je preko linkerja povezan s TLR5, plazmid pC-Cit-TLR5 (v nadaljevanju pSplit2, nosi zapis za protein SPLIT2) pa je sestavljen iz C-terminalnega dela podenote mCitrina, prav tako z linkerjem vezanega na TLR5. Oba konstrukta sta vstavljena v vektor pFLAG-CMV3. Med zapisom za N-konec citrina in C-konec citrina je 54 bp (oz. 18 AK) dolgo prekrivanje. Na sliki 23 vidimo shematski prikaz sestavljenih genskih konstruktov. Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje himernih konstruktov je navedeno v prilogi 2.



Slika 23: Shematski prikaz genetskih konstruktov cepljenih proteinov, preko linkerja vezanih na TLR5. Na zgornji shemi je prikazan plazmid pSplit1, na spodnji shemi pa pSplit2.

4.4.2 Aktivnost himernih receptorjev TLR5 s cepljenimi proteini N-citrin in C-citrin vezanimi na N-terminalni del

Tako kot pri himernih proteinih, uporabljenih pri metodi FRET, nas je tudi pri himernih proteinih SPLIT1 in SPLIT2 zanimal vpliv dodanih podenot fluorofora na N-terminalni konec TLR5 na sposobnost aktivacije signalne poti po dodatku flagelina. Aktivnost smo preverili z uporabo dvojnega luciferaznega testa. Celice HEK293 smo transficirali s plazmidi pSplit1, pSplit2, pcDNA3, pUNO-hTLR5 in pTLR5-CFP. Kontrole so enake kot pri dvojnem luciferaznem testu v poglavju 4.2.1.3. Rezultat aktivnosti himernih proteinov po aktivaciji s flagelinom je prikazan na sliki 24.



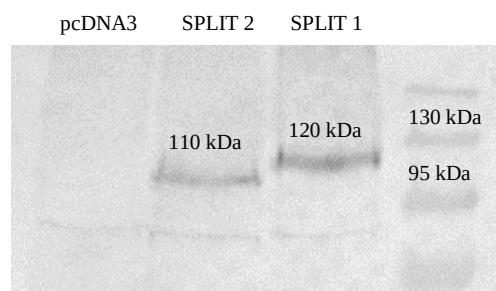
Slika 24: Aktivnost himernih proteinov SPLIT1 in SPLIT2, izražena v relativnih luciferaznih enotah. Celicam, transficiranim s pUNO-hTLR, pcDNA3, pSplit1, pSplit2, TLR5-CFP in ustreznimi reporterskimi plazmidi smo 24h po transfekciji dodali flagelin ali PBS. Po 18 h stimulacije smo celice lizirali in jim izmerili luciferazno aktivnost.

Kot je razvidno iz slike 24 tudi himerni receptorji, s podenotami fluoroforma, vezanimi na N-terminalni konec TLR5, niso sposobni vezave liganda in aktivacije signalne poti. Enote relativne luciferazne aktivnosti SPLIT1 in SPLIT2 so primerljive z negativno kontrolo. Vidimo torej, da vezava proteinov na ta del ektodomene receptorja TLR5 bistveno vpliva na njegovo funkcijo.

4.4.3 Dokaz izražanja konstruktov cepljenih proteinov

Proteinov SPLIT1 in SPLIT2 samih po sebi ne moremo vizualizirati pod mikroskopom, za to smo se morali najprej prepričati, da se proteini v celicah izražajo. To je še posebej pomembno, ker se ne aktivirajo ob dodatku flagelina (slika 24). Izražanje proteinov smo preverili s prenosom western. Proteine, izražene v celicah HEK293, smo določili z zajčjimi poliklonskimi primarnimi protitelesi, specifičnimi za označevalec AU1, ter s kozjimi poliklonskimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice, transficirane s praznim plazmidom pcDNA3.

Pričakovano velikost proteinov smo na podlagi AK zaporedja določili z uporabo prosto dostopnega spletnega orodja ProtParam.

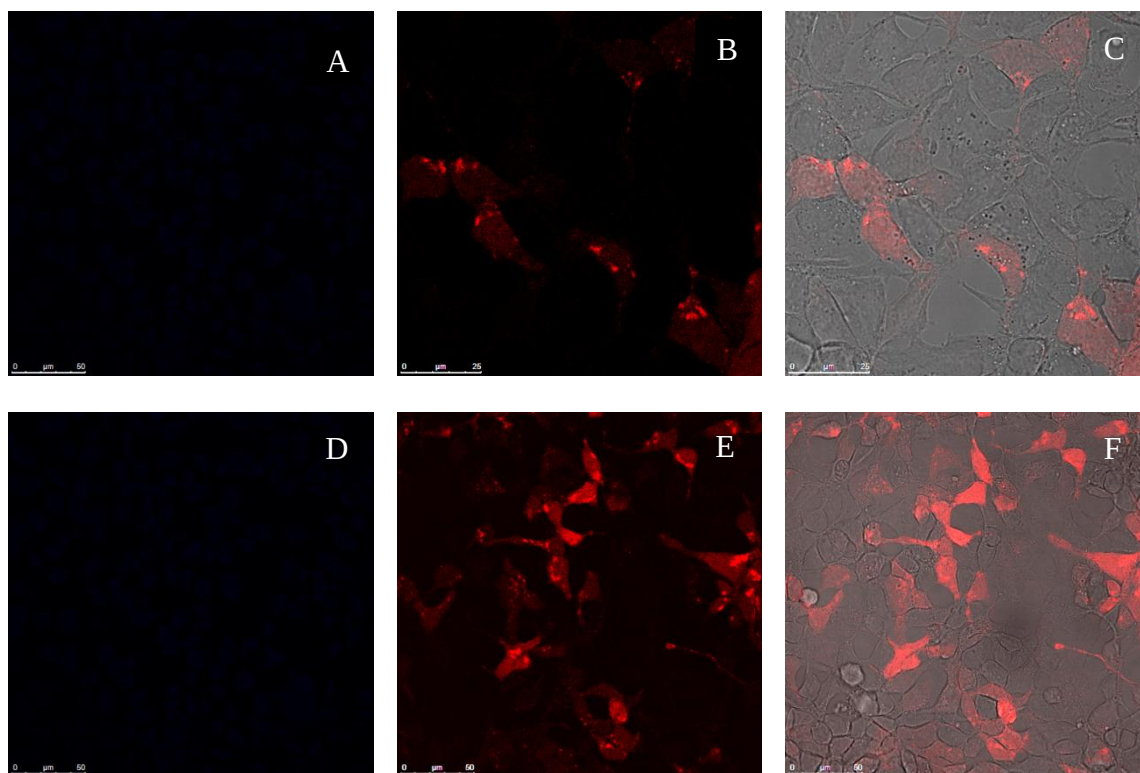


Slika 25: Določevanje proteinov SPLIT1 in SPLIT2 v celičnem lizatu V prvem stolpcu vidimo negativno kontrolo, lizat celic, transficiranih s praznim plazmidom pcDNA3. V drugem stolpcu vidimo SPLIT 2 (110 kDa) in v tretjem SPLIT 2 (120 kDa). V četrti stolpec smo nanegli proteinski velikostni standard.

Oba proteina smo lahko določili v celičnem lizatu (slika 26), kar je potrdilo izražanje proteinov SPLIT1 in SPLIT2 v celicah HEK293. Kot vidimo na sliki, je protein SPLIT1 nekoliko večji od proteina SPLIT2 (za 10 kDa). Razlika v velikosti je zaradi vsebovane homologije med podenotama, zaradi česar je nukleotidno zaporedje zapisa za SPLIT1 daljše za 54 bp.

4.4.4 Opazovanje sestavljanja cepljenih proteinov

Nacepljene celice HEK293 smo transficirali s transfekcijsko mešanico, ki je vsebovala plazmide pSplit1 (120 ng), pSplit2 (120 ng) in EEA1-mCherry (60 ng). EEA1-mCherry je fuzijski protein rdečega fluorescentnega proteina mCherry in EEA1 (early endosomal associated protein 1), ki je značilno lokaliziran v endosomih. Genski konstrukt smo uporabili za kontrolo transfekcije, saj posamezne podenote citrina same po sebi ne oddajajo fluorescence in tako ne moremo vizualizirati posameznih himernih proteinov. Transficirali smo po dve luknji celic, eno luknjico smo nato stimulirali s flagelinom (50 ng/ml).



Slika 26: Celice HEK293, transficirane s plazmidi pSplit1 in pSplit2 in z pEEA1-mCherry, za kontrolo transfekcije. Eno ponovitev transficiranih celic smo 18h po transfekciji stimulirali s flagelinom (50 ng/ml). Na slikah (A-C) vidimo nestimulirane celice, na slikah (D-E) celice z dodanim flagelinom (50 ng/ml). Slike smo vzbujali z laserji valovne dolžine ekscitacije mCITRINA (516 nm). Na slikah B in E vidimo iste celice, vzbujane z laserji valovne dolžine ekscitacijskega maksimuma mCherry (587 nm). Slike C in F so slike s presežno svetlobo skupaj s signalom fluorofora.

Kot je razvidno iz slike 26, razlik med stimuliranimi in nestimuliranimi celicami nismo zaznali. Citrin se ni sestavil v funkcionalen fluorofor, torej himerni TLR5 ni dimeriziral na način, da bi bile podenote fluorofora v zadostni bližini. Uspešnost transfekcije smo potrdili s transfekcijo rdečega fluorescentnega proteina (sliki 26C in 26D).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Flagelin predstavlja pomemben virulenčni dejavnik nekaterih človeških patogenov. Ob okužbi aktivira receptor prirojene imunosti TLR5 in s tem sodeluje pri sprožitvi kompleksnega imunskega odgovora gostitelja (Hayashi in sod., 2001). TLR5 prepozna evolucijsko zelo dobro ohranjeno mesto v flagelinu, ključno za gibljivost bakterij (Smith in sod., 2003, Andersen-Nissen in sod., 2005). Tudi mesto interakcije na receptorju TLR5 je evolucijsko dobro ohranjeno in se nahaja na izpostavljenem vbočenem delu ektodome membranskega receptorja (Andersen-Nissen in sod., 2007). Kljub poznanim regijam na flagelinu in receptorju TLR5, ki sodelujejo pri vezavi in dimerizaciji, natančen mehanizem ni poznan.

5.1.1 Vpliv mutacij flagelina na gibljivost

Mesta prepoznavanja flagelina z receptorjem TLR5 in mesta, ki vplivajo na funkcionalnost flagelina, so v literaturi določili s pomočjo delecij in točkovne mutageneze. V diplomskem delu smo pripravili sedem mutacij v ohranjenem delu flagelina, mutacije E83R, R90A, R90D, R90N, E93R, R431D in N438D in določili njihov vpliv na sestavo protofilamentov in gibljivost brezflagelinskih sevov *S. typhimurium* *FliC-/FljB-*.

Aminokisline na mestih 90, 94 in 97 tvorijo centralno jedro strukture, ki je ključna za sestavo protofilamentov iz monomernih enot in tako ključnega pomena za gibljivost (Smith in sod., 2003). Te aminokisline se nahajajo na izbočenem delu molekule flagelina, ki ob dimerizaciji predstavlja stičišče med sosednjimi monomeri. Večina v literaturi navedenih mutacij na tem delu (E83A, R90A, L94A) zmanjša gibljivost bakterij. Na gibljivost vplivajo tudi nekatere mutacije na mestih, ki se nahajajo prostorsko blizu kontaktne površine med monomeri (npr. mutacija I411A) in tako najverjetneje vplivajo na pravilno konformacijo te regije (Smith in sod., 2003).

Mutacija R90A je mutacija aminokisline arginin (R) v aminokislino alanin (A) na mestu 90 v primarni aminokislinski sekvenci. Mutageneza izbranih aminokislinskih ostankov v

alanin je razširjena metoda preučevanja proteinske strukture in funkcije, saj se odstrani stranska skupina na β C-atomu, hkrati pa se ne spremeni konformacija glavne verige, kot npr. pri zamenjavi s prolinom ali glicinom. Poleg tega zaradi majhne, nenabite stranske verige ne nastajajo izrazite sterične ali elektrostatske spremembe v strukturi (Lefevre in sod., 1996). Arginin je AK z daljšo, pozitivno nabito stransko skupino. Poleg omenjene mutacije smo arginin na mestu 90 spremenili še v aspartat (D), AK s krajšo, negativno nabito stransko skupino in asparagin (N), AK z relativno hidrofilno, nenabito stransko skupino. Vse tri mutacije, R90A, R90D in R90N, so vplivale na funkcionalnost flagelina, kar smo zaznali preko zmanjšane mobilnosti bakterije *S. typhimurium* v primerjavi z divjim tipom, vendar ne tako drastično zmanjšano, kot je omenjeno v literaturi. Tako na primer Andersen-Nissen in sod. (2005) omenjajo zmanjšanje gibljivosti za 95% v primerjavi z divjim tipom, v naših poskusih pa se vrednost giblje od 30-65%. Morda gre torej na tem mestu za neko elektrostatsko interakcijo, na račun pozitivno nabite stranske skupine arginina, ki je nujno potrebna za sestavo protofilamenta.

Na mestu 93, ki se prav tako nahaja v regiji, ključni za funkcionalnost bakterijskega bička, smo aminokislino glutamat (E), z negativno nabito stransko skupino, zamenjali z argininom (R). Ta mutacija je zmanjšala gibljivost za približno 40% v primerjavi z divjim tipom. Prav tako bi lahko na podlagi rezultata sklepali, da gre na tem mestu za pomembne elektrostatske interakcije stranske skupine v tvorbi protofilamenta.

Na mestu 83 je pri zamenjavi aminokislinske glutamat (E) v arginin (R) prišlo do zmanjšanja gibljivosti za 60%. Glede na to, da mesto leži izven predvidenega centralnega dela kontakta posameznih monomernih enot (torej regije, ključne za sestavo protofilamenta) (Samatey in sod., 2001), bi lahko sklepali, da morda vpliva na konformacijo in izpostavljenost posameznih AK, ki ležijo znotraj omenjenega dela.

Mutacija na mestu 431 leži v C-terminalnem ohranjenem delu flagelina in praktično izniči gibljivost. Na tem mestu smo nadomestili arginin (R) z aminokislino aspartat (D), z negativno nabito stransko verigo. Na mestu 438 smo zamenjali aminokislino asparagin (N), s polarno, nenabito stransko verigo, z aminokislino aspartat (D). Ta mutacija je gibljivost

zmanjšala približno za polovico. Torej so tudi aminokisline na C-terminalnem delu ohranjene regije, ki ležijo izven omenjene površine stika med monomeri, pomembne za ohranjanje funkcionalne oblike. Morda prav tako vplivajo na konformacijo in izpostavljenost aminokislin v centralni regiji, odgovorni za tvorbo protofilamenta.

Natančna interakcija med flagelinom in TLR5 še ni poznana, zato je smiselno v prihodnjih raziskavah preučiti vpliv na novo pripravljenih mutiranih različic flagelina na aktivacijo receptorja, da bi lahko stopili korak bližje k razumevanju narave interakcije.

5.1.2 Dimerizacija flagelina

V literaturi navajajo, da TLR5 aktivira monomer flagelina (Andersen-Nissen in sod., 2003). Ker se flagelin samodejno združuje v dimere in multimere (Wakabayashi in sod., 1969), nas je zanimalo, ali se poleg monomerov tudi multimeri vežejo na TLR5 in aktivirajo signalizacijo. V ta namen smo pripravili fuzijske proteine flagelina s fluorescentnim proteinom mCERULEAN ali mCITRIN. Fluorescentna označevalca sta par za analizo FRETa. V primeru, da je za aktivacijo potreben dimer flagelina, bi ob stimulaciji s parom himernih flagelinov izmerili FRET. Himerna proteina FLIC-mCER in FLIC-mCIT se v bakterijah izražata, kar smo pokazali z merjenjem fluorescence bakterij s konfokalnim mikroskopom. V nadaljevanju bomo proteine izolirali in preverili sposobnost aktivacije TLR5 signalizacije, njegovo lokalizacijo in potrdili dimerizacijo flagelina.

5.1.3 Dimerizacija receptorja TLR5

Za nekatere receptorje TLR je potek dogodkov ob vezavi liganda in aktivaciji poznan. TLR4 tvori oligomere po vezavi lipopolisaharidov preko interakcije s koreceptorjem MD2 (Kobayashi in sod, 2006). Za TLR9 predpostavljajo, da tvori v membrani konstitutivni dimer, ob vezavi liganda pa se inducirajo konformacijske spremembe, ki omogočajo zadostno zblizanje domen TIR za aktivacijo signalne poti (Latz in sod, 2007). Za nekatere je tudi mehanizem vezave liganda poznan, na primer mehanizem vezave dvojnoverižne RNA na ektodomeno TLR3, ki so ga objavili Pirher in sod. (2008).

Nas je v okviru diplomske naloge zanimalo, na kakšen način dimerizira receptor TLR5. Teoretično lahko receptor TLR5 po vezavi liganda tvori dva različna tipa homodimera. Receptorji se lahko v homodimeru nahajajo paralelno, pri tem sta N-terminalna dela receptorja zelo blizu. V bolj običajni konformaciji, ki je značilna tudi za TLR3, 4 in 9, pa sta N-terminalna konca receptorja daleč vsak sebi. Za namen določitve konformacije dimera smo pripravili fuzijske proteine, s katerimi smo merili uspešnost FRETa, tako da smo fluorescentni par za metodo FRET vezali na N-terminalni konec ektodomene membranskega receptorja. Pripravili smo tudi fuzijske proteine za metodo cepljenih proteinov, tako da smo začetni in končni del mCitrina vezali na N-terminalni del ektodomene TLR5. V primeru, da bi bili fuzijski proteini aktivni in da bi se N-terminalni konci ob dimerizaciji dovolj zblížali, bi pričakovali pozitiven signal FRETa in sestavo cepljenih proteinov (zaznali bi signal ob ekscitaciji mCitrina).

Receptor TLR5 je membranski receptor, ki se nahaja na celični membrani, tako kot receptorji TLR4, TLR1, TLR2 in TLR6 (Akira in sod., 2006). Za TLR4 je bilo pokazano, da se po vezavi liganda in aktivaciji signalne poti naravne imunosti prestavi v endosome (Husebye in sod., 2006). Za TLR5 to ni bilo nedvoumno pokazano, vendar se prav tako pričakuje internalizacija receptorja po vezavi liganda. V diplomski nalogi smo spremljali celično porazdelitev himernih receptorjev TLR5 v celicah HEK293, ki smo jim vnesli himerni protein TLR5 s fluorescirajočim proteinom ali na N- ali C- koncu receptorja. Izkazalo se je, da je večino receptorja znotraj celic v endoplazemskem retikulumu in endosomih in se zelo majhen delež receptorja nahaja na membrani. Himerni receptor s fluorescirajočim proteinom na N-terminalnem koncu se pretežno nahaja v endosomih.

Iz meritev aktivacije TLR5 signalne poti po stimulaciji s flagelinom smo pokazali, da je ta himerni receptor neaktiven. Ker smo iz rezultatov opazili, da se protein izraža in je v celici lokaliziran pretežno v endosomih je to lahko posledica napačne konformacije aminokislin, pomembnih za prepoznavanje liganda. Lahko pa sam fluorescentni protein predstavlja sterično oviro vezave flagelina in je na ta način aktivacija onemogočena. Vsekakor lahko zaključimo, da ni razlik v aktivaciji signalne poti med stimuliranimi in nestimuliranimi vzorci v primerjavi z divjim tipom, pri katerem je nazorno prikazana aktivacija ob

stimulaciji. Za primerjavo smo preizkusili tudi TLR5, ki ima fluorescentni protein dodan na C-terminalnem koncu (TLR5-CFP). Vidimo, da je pri tem konstrukt ob stimulaciji sicer nekoliko nižja aktivacija v primerjavi z divjim tipom, a vseeno signifikantna v primerjavi z nestimuliranimi celicami. Iz neobjavljenih rezultatov (Karolina Ivičak, laboratorija za biotehnologijo, Kemijski inštitut v Ljubljani) vemo, da že dodatek označevalca AU1 na N-terminalni konec TLR5 nekoliko zmanjša aktivnost konstrukta. Očitno je torej konformacija ektodomene in/ali vezava liganda močno odvisna od pravilnega N-terminalnega zaporedja molekule.

Podobne rezultate aktivacije smo dobili tudi s himernimi proteini SPLIT1 in SPLIT2, ki se v celicah izražajo, kar smo potrdili s prenosom Western, vendar so prav tako neaktivni po stimulaciji celic s flagelinom. Tudi proteina SPLIT1 in SPLIT2 imata na N-terminalnem koncu receptorja TLR5 vezan del fluorescirajočega proteina. Prav tako nismo zaznali sestavljanje cepljenih proteinov po stimulaciji s flagelinom, kar bi pomenila paralelno orientacijo receptorjev TLR5 v dimeru. Glede na opisane rezultate težko sklepamo na sestavo dimera receptorjev TLR5, predvsem zaradi dejstva, da so reporterski proteini neaktivni, kljub temu, da se izražajo. Ne moremo izključiti, da je negativen rezultat posledica nepravilnega zvitja ali neaktivnosti receptorja, saj je za dimerizacijo npr. TLR4 potrebna vezava liganda (Kobayashi in sod, 2006).

5.1.4 Priprava konstruktov z metodo lepljenja po Gibsonu

V sklopu diplomske naloge smo večino genskih konstruktov pripravili z lepljenjem po Gibsonu. V literaturi se metoda omenja kot inovacija, s katero lahko sestavljamo zelo velike fragmente DNA, česar s prej znanimi metodami nismo bili sposobni (večje od ~150 kbp) (Gibson in sod., 2009). Prednost metode je tudi, da je lepljene fragmentov neodvisno od prepoznavnih mest za restrikcijske encime. To je pomembno pri kloniranju fragmentov DNA v plazmide z zelo omejeno izbiro prepoznavnih mest za restrikcijske encime in tudi kadar ne želimo imeti v zaporedju, ki ga sestavljamo, ostankov zaporedja prepoznavnih mest restrikcijskih endonukleaz. Gibson in sod. (2009) so metodo uporabili za združevanje velikih fragmentov, mi pa smo metodo prilagodili za združevanje manjših fragmentov. Metoda se je izkazala za zelo uspešno, saj se pri vgrajevanju dveh fragmentov v vektor v

cca. 90 odstotkih poskusov fragmenti vgradijo pravilno. Pomanjkljivost metode je sestavljanje fragmentov, ki imajo podobne začetne ali končne sekvence, saj se lahko zaradi homologije sestavijo v napačnem vrstnem redu ali napačni orientaciji.

5.2 SKLEPI

- Mutacije R90A, R90D, R90N in E93R v ohranjenem delu flagelina, ki predstavlja površino stika med sosednjimi monomeri v protofilamentu in je torej ključna za tvorbo protofilamentov, zmanjšajo gibljivost bakterij.
- Mutacije E83R, R431D in N438D v predelu flagelina, ki ne pride neposredno v stik s sosednjimi monomeri, prav tako zmanjšajo gibljivost bakterij. Morda gre za vpliv na konformacijo in izpostavljenost aminokislin v ključni kontaktni regiji.
- Vezava fluorescentnih proteinov na N-terminalni konec ektodomene TLR5 onemogoči aktivacijo signalne poti po stimulaciji s flagelinom.
- Vezava fluorescentnega proteina CFP na C-terminalni konec TLR5 nekoliko zmanjša sposobnost aktivacije s flagelinom, vendar je razlika vseeno statistično značilna v primerjavi z nestimuliranimi celicami.
- TLR5 s fluoroforom na C-terminalnem koncu se pretežno nahaja v znotrajceličnih organelih, kot so endoplazemski retikulum in endosomi. Manjši delež proteina je lociran na membrani. Fuzijski proteini TLR5 s fluoroforom na N-terminalnem koncu so locirani pretežno v endosomih.
- Med FRET parom, mCerulean in mCitrine na N-terminalnem koncu TLR5 ni fluorescentnega resonančnega prenosa energije, uspešnost FRETa je primerljiva z negativno kontrolo.
- Cepljeni fluorescenčni proteini na N-terminalnem koncu TLR5 se v celicah izražajo in se po stimulaciji s flagelinom ne sestavijo v aktivni fluorofor.
- Lepljenje po Gibsonu je učinkovita metoda združevanja DNA fragmentov.

6 POVZETEK

Receptorji TLR so pomembni receptorji prirojene imunosti, ki prepoznavajo nepogrešljive strukturne ali funkcionalne molekulske motive patogenih bakterij, ključne za njihovo preživetje (Akira in sod., 2006). Receptor TLR5 prepozna in veže flagelin, strukturni del bakterijskega bička, organela, ki omogoča bakteriji gibljivost in s tem selektivno prednost bakterij v določenih nišah (Hayashi in sod., 2001). Nekatere običkane bakterije so sposobne prepoznavo s strani receptorja obiti, vseeno pa ohraniti gibljivost, kar jim predstavlja enega od ključnih virulencnih dejavnikov. Na podlagi razlik v flagelinu omenjenih bakterij temeljijo pomembne študije o naravi interakcije TLR5 s svojim ligandom (Andersen-Nissen in sod., 2003, Zoete in sod., 2010).

Nekaj ključnih aminokislin flagelina, z dokazano vlogo pri aktivaciji TLR5, je prav tako ključnih za gibljivost bakterij. Nahajajo se namreč na površini, ki predstavlja stik med monomeri flagelina, ko se le-ti sestavijo v funkcionalen protofilament (Yonekura in sod., 2003). V diplomski nalogi smo pripravili sedem mutacij v flagelinu, R90A, R90D, R90N, E83R, E93R, N438D in R431D, od katerih se nekatere od njih nahajajo v ohranjeni N ali C-terminalni regiji, a izven omenjene kontaktne površine (E83R, N438D in R431D), in preučili njihov vpliv na gibljivost. Ugotovili smo, da vse mutacije zmanjšajo bakterijsko gibljivost, kar pomeni, da je struktura v tem ohranjenem delu precej rigidna in občutljiva na že majhne spremembe v aminokislinski sestavi.

Receptorji TLR so sestavljeni iz citoplazemske TIR domene, potrebne za signalizacijo, transmembranske domene in ektodomene, odgovorne za vezavo liganda (Akira in sod., 2006). Dimerizacija TIR domen je nujen pogoj za aktivacijo signalne poti. To se zgodi ob vezavi liganda, vendar za TLR5 še ni poznan natančen mehanizem interakcije z ligandom in dimerizacije receptorja. V diplomskem delu smo s pomočjo metode FRET in metode cepljenih proteinov preverjali orientacijo TLR5 v homodimeru. Na N-terminalni konec ektodomene receptorja smo vezali po enega iz para fluorescentnih proteinov, potrebnih za FRET ali po en del (N-terminalni in C-terminalni) rumenega fluorescentnega proteina mCitrin. Predpostavljali smo, da če receptor dimerizira na način, da sta ob stimulaciji s flagelinom N-terminalna konca receptorja v zadostni bližini, da pride do FRETa oz. v

primeru metode cepljenih proteinov sestave funkcionalnega rumenega fluorescenčnega proteina. Pripravljeni fuzijski proteini so bili ob stimulaciji s flagelinom neaktivni, niti niso značilno lokalizirali na plazemski membrani, kot bi pričakovali za receptor TLR5. Fuzija na N-terminalnem koncu očitno vpliva na funkcionalnost receptorja in vezavo liganda. Različne hipoteze o načinu dimerizacije torej nismo mogli ne potrditi, ne ovreči.

7 VIRI

- Abbas A.K., Lichtman A.H., 2004. Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 323 str.
- Akira S., Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. Nature Reviews. Immunology, 4: 499–511
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 124, 4: 783–801
- Andersen-Nissen E., Smith K.D., Strobe K.L., Rassouljian Barrett S.L., Cookson B.T., Logan S.M., Aderem A. 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 26: 9247–9252
- Andersen-Nissen E., Smith K.D., Bonneau R., Strong R.K., Aderem A. 2007. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. The Journal of Experimental Medicine, 204:393-403
- Anderson K.V., Jürgens G., Nüsslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: Genetic studies on the role of the *Toll* gene product. Cell, 42, 3: 779–789
- Bell J.K., Askins J., Hall P.R., Davies D.R., Segal D.M. 2006. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 8792-7
- Brosius J., Erfle M., Storella J. 1985. Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity. The Journal of Biological Chemistry, 260: 3539-3541

- Chaplin D. 2006. Overview of the human immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 2, Suppl 2: S430-S435
- Chaudhary P.M., Ferguson C., Nguyen V., Nguyen O., Massa H., Eby M., Jasmin A., Trask B., Hood L., Nelson P. 1998. Cloning and characterization of two Toll/Interleukin-1 receptor-like genes TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* 91: 4020-4027
- Choe J., Kelker M.S., Wilson I.A. 2005. Crystal Structure of Human Toll-Like Receptor 3 (TLR3) Ectodomain. *Science*, 5734: 581-585
- Crellin N.K., Garcia R.V., Hadisfar O., Allan S.E., Steiner T.S., Levings M.K. 2005. Human CD4+ T Cells Express TLR5 and Its Ligand Flagellin Enhances the Suppressive Capacity and Expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*, 175: 8051-8059
- de la Barrera S., Alemán M., Sasiain M. del C. 2006. Toll-Like receptors in human infectious diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 12: 4173-4184
- de Zoete M.R., Kestra A.M., Wagenaar J.A., van Putten J. 2010. Reconstitution of a Functional Toll-like Receptor 5 Binding Site in *Campylobacter jejuni* Flagellin. *Journal of Biological chemistry*, 285:12149-58
- Dempsey P.W., Vaidya S.A., Cheng G. 2003. The Art of War: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 2604-2621
- Drev S. 2009. Primerjava dveh seroloških metod pri dokazovanju Lymške borelioze. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 5

- Feuillet V., Medjane S., Mondor I., Demaria O., Pagni P.P., Gala'n 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
- Galkin V.E., Yu X., Bielnicki J., Heuser J., Ewing C.P., Guerry P., Egelman E.H. 2008. Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments. *Science*, 320, 5874: 382-385
- Gastard M. 2006. FRET Sensitized Emission (SE) in LASAF. *Confocal Application Notes*, 4: 1-13
- Gewirtz, A.T., Navas T., Lyons S., Godowski P.J., Madara J.L. 2001. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *Journal of Immunology*, 167: 1882–1885
- Gibson D.G., Young L., Chuang R., Venter J.C., Hutchison C.A., Smith H.O. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6: 343 - 345
- Hajjar A.M., O'Mahony D.S., Ozinsky A., Underhill D.M., Aderem A., Klebanoff S.J., Wilson C.B.. 2001. Cutting edge: Functional interactions between Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *Journal of Immunology*, 166: 15–19
- Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akirak S., Underhill D.M., Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410: 1099-1103

Honko A.N., Mizel S.B. 2005. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunologic Research*, 33, 1: 83–101

Husebye H., Halaas Ø., Stenmark H., Tunheim G., Sandanger Ø., Bogen B., Brech A., Latz E., Espevik T. 2006. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO Journal*, 25: 683–692

Janeway C.A. Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54, 1:1-13

Janeway C.A. Jr, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Review Of Immunology*, 20: 197–216

Johnsson N., Varshavsky A. 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 10340–10344

Kawai T., Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11: 373-384

Kobayashi M., Saitoh S., Tanimura N., Takahashi K., Kawasaki K., Nishijima M., Fujimoto Y., Fukase K., Akashi-Takamura S., Miyake K. 2006. Regulatory Roles for MD-2 and TLR4 in Ligand-Induced Receptor Clustering. *The Journal of Immunology*, 176: 6211-6218

Latz E., Verma A., Visintin A., Gong M., Sirois C.M., Klein D.C., Monks B. G., McKnight C.J., Lamphier M.S., Duprex W.P., Espevik T, Golenbock D.T.

2007. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nature Immunology*, 8: 772-9

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 6: 973-983

Lefèvre F., Rémy M., Masson J. 1997. Alanine-stretch scanning mutagenesis: a simple and efficient method to probe protein structure and function. *Nucleic Acids Research*, 25: 447-448

McAllister W. T. 1993. Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity). *Cell*, 39: 385–91

Mimori-Kiyosue Y., Vonderviszt F., Yamashita I., Fujiyoshi Y., Namba K. 1996. Direct interaction of flagellin termini essential for polymorphic ability of flagellar filament. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 24: 15108-15113

Nempont C., Cayet D., Rumbo M., Bompard C., Villeret V., Sirard J-C. 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *Journal Of Immunology*, 181, 3: 2036–2043

Pirher N., Ivičak K., Pohar J., Benčina M., Jeral R. 2008. A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15: 761 - 763

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., Kumasaka T., Yamamoto M., Namba K. 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 410: 331–337

Shaner N., Steinbach P., Tsien R. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2: 905 – 909

Shimomura O., Johnson F., Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59: 223–39

Steiner T. S. 2007. How Flagellin and Toll-Like Receptor 5 Contribute to Enteric Infection. *Infection and Immunity*, 75: 545-552

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 551 str.

Wakabayashi K., Hotani H., Asakura S. Polymerization of salmonella flagellin in the presence of high concentrations of salts. 1969. *Biochimica et Biophysica Acta*, 175: 195-203

Yonekura K., Maki-Yonekura S., Namba K. 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 424: 643-650

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Romanu Jerali za priložnost opravljanja diplomskega dela v Laboratoriju za Biotehnologijo na Kemijskem inštitutu.

Somentorici dr. Mojci Benčina se zahvaljujem za številne nasvete tekom dela, za pomoč pri delu s konfokalnim mikroskopom in za pomoč in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Karolini Ivičak se zahvaljujem za uvajanje v laboratorijsko delo, za pomoč in potrpežljivost.

Prof. dr. Simonu Horvatu se zahvaljujem za prevzem mentorstva in za pregled diplomske naloge.

Prof. dr. Mojci Narat se zahvaljujem za hitro in natančno recenzijo diplomske naloge.

Jelki Pohar se zahvaljujem za uvajanje v delo s celičnimi kulturami.

Blažu Nemcu se zahvaljujem za pomoč pri fotografiranju.

Zahvaljujem se vsem rednim in občasnim prebivalcem laboratorija 120 za krajšanje uric v laboratoriju, skupnim tarnanjem nad neuspehimi in skupnim veseljem nad uspehimi eksperimenti.

»Last but not least« se najlepše zahvaljujem vsem najbližjim za moralno in čustveno podporo, potrpežljivost in družbo tekom študija, predvsem pa tekom izdelave in pisanja diplomske naloge.

PRILOGA A : Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje genskih konstruktov in himernih proteinov, uporabljenih za metodo FRET

Nukleotidno zaporedje pmCer-TLR5

ATG TCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTTGTGGAGCTGCAGTTGCTGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTGTGAGCAA
GGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTACAGCGTG
TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTATCTGCAACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGC
CCTGGCCCCACCCTCGTGACCAACCTGACCTGGGGCGTGCAGTGTCTCGCCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCACGAC
TTCTTCAAGTCCGCCATGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC
ATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACGCCATCAGCGACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA
AGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCAT
CGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG
CGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGTGGCTC
TGGCGGTGGGAGTGGGGGAAGCATTCCTTCCTGCTGCTTTGATGGCCGAATAGCCTTTTATCGTTTCTGCAACCTCACCCA
GGTCCCCCAGGTCTCAACACCACTGAGAGGCTCTGCTGAGCTTCAACTATATCAGGACAGTCACTGCTTCATCCTTCCC
CTTTCTGGAACAGCTGCAGCTGCTGGAGCTCGGGAGCCAGTATACCCCTTGACTATTGACAAGGAGGCCCTCAGAAAACC
TGCCCAACCTTAGAATCTTGGACCTGGGAAGTAGTAAGATATACTTCTTGCATCCAGATGCTTTTCAGGGACTGTTCCATC
TGTTTGAAGTTAGACTGTATTCTGTGGTCTCTCTGATGCTGTATTGAAAGATGGTTATTTCAGAAAATTTAAAGGCTTTAAC
TCGCTTGGATCTATCCAAAAATCAGATTCTGAGCCTTTACCTTCATCCTTCATTTGGGAAGTTGAATTCCTTAAAGTCCAT
AGATTTTCTCTCAACCAATATTCCTTGTATGTGAACATGAGCTCGAGCCCTACAAGGGAAAACGCTCTCCTTTTITAG
CCTCGCAGCTAATAGCTTGTATAGCAGAGTCTCAGTGAGCTGGGGAAAATGTATGAACCCATTCAGAAAACATGGTGCTGG
AGATACTAGATGTTTCTGGAATGGCTGGACAGTGGACATCACAGGAACTTTAGCAATGCCATCAGCAAAAGCCAGGC
CTTCTCTTTGATTTTGGCCACCATCATGCGGTGCCGGGTTTGGCTTCATAACATCAAAGATCTGACCAGAACACATT
TGCTGGCCTGGCCAGAAGTTCAGTGAGACACCTGGATCTTTCACATGGGTTTGTCTTCTCCCTGAACCTACGAGTCTTTGA
GACATCAAGGATTTGAAGGTTCTGAACCTTGCCCTACAACAAGATAAATAAGATTGCAGATGAAGCATTTTACGGACTTG
ACAACCTCCAAGTTCTCAATTTGTCATATAACCTTCTGGGGAACTTTACAGTTTGAATTTCTATGGACTACCTAAGGTAG
CCTACATTGATTTGCAAAAGAATCACATTGCAATAATTCAAGACCAAAACATTCAAATTCCTGAAAAAATTACAGACCTTG
GATCTCCGAGACAATGCTCTTACAACCATTCATTTTATTCCAAGCATACCCGATATCTTCTTGAGTGGAATAAACTAGTG
ACTTTGCCAAAAGATCAACCTTACAGCGAACCTCATCCACTTATCAGAAAAACAGGCTAGAAAATCTAGATATTCTCTACTTT
CTCCTACGGGTACCTCATCTCCAGATTCTCATTTTAAATCAAAATCGCTTCTCCTCTGTAGTGGAGATCAAACCCCTTCA
GAGAATCCCAGCTTAGAACAGCTTTTCTTGGAGAAAATATGTTGCAACTTGCCTGGGAAAACCTGAGCTCTGTTGGGATGT
TTTTGAGGGACTTTTCTCATCTTCAAGTTCTGTATTTGAATCATAACTATCTTAATTCCTTCCACCAGGAGTATTTAGCCAT
CTGACTGCATTAAGGGGACTAAGCCTCAACTCCAACAGGCTGACAGTTCTTTCTCACAATGATTTACCTGCTAATTTAGAG
ATCCTGGACATATCCAGGAACCAAGCTCCTAGCTCCTAATCCTGATGTATTTGTATCACTTAGTGTCTTGGATATAACTCAT
AACAAGTTCAATTTGTGAATGTGAACCTTAGCACTTTTATCAATTGGCTTAATCACACCAATGTCACTATAGCTGGGCCTCCT
GCAGACATATATTGTGTGTACCCTGACTCGCTCTCTGGGGTTTCCCTCTTCTCTTTTCCACGGGAAGGTTGTGATGAAGAG
GAAGTCTTAAAGTCCCTAAAGTTCTCCCTTTTCATTGTATGCACTGTCACTCTGACTCTGTTCTCATGACCATCCTCACAG
TCACAAAGTTCCGGGGCTTCTGTTTTATCTGTTATAAGACAGCCAGAGACTGGTGTTCAAGGACCATCCCCAGGGCACA
GAACCTGATATGTACAAATATGATGCCTATTTGTGCTTCAGCAGCAAAGACTTCACATGGGTGCAGAAATGCTTTGTCTAA
ACACCTGGACACTCAATACAGTGACCAAAAACAGATTCAACCTGTGCTTTGAAGAAAGAGACTTTGTCCCAGGAGAAAAC
CGCATTGCCAATATCCAGGATGCCATCTGGAACAGTAGAAAGATCGTTTGTCTTGTGAGCAGACACTTCCTTAGAGATGG
CTGGTGCCTTGAAGCCTTCAGTTATGCCAGGGCAGGTGCTTATCTGACCTTAACAGTGCTCTCATCATGGTGGTGGTTGG
GTCCTTGTCCCAGTACCAGTTGATGAACATCAATCCATCAGAGGCTTTGTACAGAAAACAGCAGTATTTGAGGTGGCCTG
AGGATCTCCAGGATGTTGGCTGGTTTCTTCATAAACTCTCTCAACAGATACTAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGA
CAATAACATTCCGTTGCAAACTGTAGCAACCATCTCCGACACATACCGCTACATCTAA

LEGENDA:

ATG start kodon
Preprotripsinsko signalno zaporedje vektorja pFLAG-CMV3
Označevalec FLAG
mCerulean
Linker
TLR5
Označevalec AU1
TAA stop kodon

Aminokislinsko zaporedje mCER-TLR5

MSALLILALVGAAVADYKDDDDKLVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPT
LVTTLTWGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLE
YNAISDNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVT
AAGITLGMDELYKGGSGGGSGGSIPSCSFDGRIAFYRFCNLTVQVQVLNTERLLLSFNYIRTVTASSFPFLEQLQLELGSQYTP
LTIDKEAFRNLNLRILDLGSSKIYFLHPDAFQGLFHLFELRLYFCGLSDAVLKDGYFRNLKALTRLDLSKNQIRSLYLHPSFGKL
NSLKSIDFSSNQIFLVCEHELEPLQGKTLSSFFSLAANSLSYRSVSDWGKCMNPFRNMVLEILDVSGNGWTVDTGNFSNAISKSQ
AFSLILAHHIMGAGFGFHNIDPDQNTFAGLARSSVRHLDLSHGFFVSLNSRVFETLKDCLKVLNLAYNKINKIADEAFYGLDNL
QVLNLSYNLLGELYSSNFYGLPKVAYIDLQKNHIAHQDQTFKFLEKLQTLDLRDNALTTIHFIPIPDIFLSGNKLVTLPKINLTA
NLIHLSNRLENLDILYFLLRVPHLQILILNQNRFSSCSGDQTPSENPSLEQLFLGENMLQLAWETELCWDFEGLSHLQVLYLN
HNYLNSLPPGVFSLHTALRGLSLNSNRLTVLSHNDLPANLEILDISRNLQLLAPNPDVFVSLSVLDITHNKFICECELSTFINWLNH
TNVTIAGPPADIYCVYPDSLGSVSLFSLSTEGCDEEEVLKSLKFSLFIVCTVTLTLFLMTILTVTKFRGFCFICYKTAQRLVFKDHP
QGTEPDMYKYDAYLCFSSKDFTWVQNALLKHLDTQYSDQNRFNLCFEERDFVPGENRIANIQDAIWNRSRKIVCLVSRHFLRDG
WCLEAFSYAQGRCLSDLSALIMVVVGSLSQYQLMKHQSIIRGFVQKQQLRWPELDQDVGWFLHKLKQILKKEKEKKKDN
NIPLQTVATISDTYRYI#

Nukleotidno zaporedje pmCit-TLR5

ATGCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTGTGTTGGAGCTGCAGTTGCTGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTGTGAGCAA
GGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTG
TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTTATCTGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGC
CCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCAG
TTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC
ATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA
AGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACACGAGAACACCCCAT
CGCGGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG
CGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCTGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGTGGCTC
TGGCGGTGGGAGTGGGGGAAGCATTCTTCTGCTCTTTGATGGCCGAATAGCCTTTTATCGTTTCTGCAACCTCACCCA
GGTCCCCCAGGTCTCAACACCACTGAGAGGGCTCTGCTGAGCTTCAACTATATCAGGACAGTCACTGCTTCATCCTTCCC
CTTTCTGGAACAGCTGCAGCTGCTGGAGCTCGGGAGCCAGTATACCCCTTGACTATTGACAAGGAGGCCTTCAGAAACC
TGCCCCAACCTTGAATCTTGGACCTGGGAAGTAGTAAGATATACTTCTTGCCATCCAGATGCTTTTCAGGGAGCTGTCCATC
TGTTTGAACCTAGACTGTATTTCTGTGGTCTCTCTGATGCTGTATTGAAAGATGGTTATTTTCAGAAATTTAAAGGCTTTAAC
TCGCTTGGATCTATCCAAAAATCAGATTCTGAGCCTTTACCTTCATCCTTCATTGGGAAGTTGAATTCCTTAAAGTCCAT
AGATTTTTCTCCAAACCAAAATATTCCTTGTATGTGAACATGAGCTCGAGCCCTACAAGGGAAAAACGCTCTCCTTTTTTAG
CCTCGCAGCTAATAGCTTTGTATAGCAGAGTCTCAGTGGACTGGGGAAAAATGTATGAACCCATTAGAAACATGGTGGTGG
AGATACTAGATGTTTCTGGAATGGCTGGACAGTGGACATCACAGGAAACTTTAGCAATGCCATCAGCAAAAGCCAGGC
CTTCTCTTTGATTCTTGCCACCAACATCATGGGTGCCGGGTTGGCTTCATAACATCAAAGATCCTGACCAGAACACATT
TGCTGGCCTGGCCAGAAGTTCAGTGAGACACCTGGATCTTTCACATGGGTTTGCTTCTCCTGAACTCAGGAGTCTTTGA
GACACTCAAGGATTTGAAGGTTCTGAACCTTGCTTACAACAAGATAAAATGAAGATTGCAGATGAAGCATTTTACGGACTTG
ACAACCTCCAAGTTCTCAATTTGTATATAAATCTTCTGGGGGAACCTTTACAGTTTCAATTTCTATGGACTACCTAAGGTAG
CCTACATTGATTTGCAAAAGAATCACATTGCAATAATTCAAGACCAACATTCAAATTCCTGGAAAAATTACAGACCTTG
GATCTCCGAGACAATGCTCTTACAACCATTCAATTTATTCCAAGCATACCCGATATCTTCTTGAGTGGCAATAAACTAGTG
ACTTTGCCAAAGATCAACCTTACAGCGAACCTCATCCACTTATCAGAAAAACAGGCTAGAAAAATCTAGATATTCTCTACTTT
CTCCTACGGGTACCTCCTCAGATTCTCATTTTAAATCAAAATCGCTTCTCCTCCTGTAGTGAGATCAAAACCCCTTCA
GAGAATCCCAGCTTAGAACAGCTTTTCTTGGAGAAAAATATGTTGCAACTTGCCTGGGAAACTGAGCTCTGTTGGGATGT
TTTTGAGGGACTTTCTCATCTTCAAGTTCTGTATTTGAATCATAACTATCTTAATTCCTTCCACCAGGAGTATTTAGCCAT
CTGACTGCATTAAGGGGACTAAGCCTCAACTCCAACAGGCTGACAGTTCTTTCTCACAATGATTTACCTGCTAATTTAGAG
ATCCTGACGATATCCAGGAACCACTCCTAGCTCCTAATCCTGATGTATTGTATCACTTAGTGCTTTGGATATAAATCAT
AACAAGTTCAATTTGTGAATGTGAACCTTAGCACTTTTATCAATTGGCTTAATCACACCAATGTCATATAGCTGGGCCTCCT
GCAGACATATATTGTGTGTACCCTGACTCGCTCTCTGGGGTTTCCCTCTCTCTTTCCACGGAAGGTTGTGATGAAGAG
GAAGTCTTAAAGTCCCTAAAGTTCTCCCTTTTCAATGTATGCACTGTCACTCTGACTCTGTTCCCTCATGACCATCCTCACAG
TCACAAAGTTCCGGGGCTTCTGTTTTATCTGTTATAAGACAGCCAGAGACTGGTGTTCAGGACCATCCCCAGGGCACA
GAACCTGATATGTACAAATATGATGCCTATTTGTGCTTCAGCAGCAAGACTTCACATGGGTGCAGAAATGCTTTGCTCAA
ACACCTGGACACTCAATACAGTGACCAAAACAGATTCAACCTGTGCTTTGAAGAAAGAGACTTTGTCCCAGGAGAAAAC
CGCATTGCCAATATCCAGGATGCCATCTGGAACAGTAGAAAGATCGTTTGTCTTGTGAGCAGACACTTCCTTAGAGATGG
CTGGTGCCTTGAAGCCTTCAGTTATGCCAGGGCAGGTGCTTATCTGACCTAACAGTGTCTCATCATGGTGGTGGTTGG
GTCCTTGTCCCAGTACCAGTTGATGAAACATCAATCCATCAGAGGCTTTGTACAGAAACAGCAGTATTGAGGTGGCCTG
AGGATCTCCAGGATGTTGGCTGGTTTCTCATAAACTCTCTCAACAGATACTAAAGAAAGAAAAAGAAAGAAGAAAGA
CAATAACATTCCGTTGCAAACTGTAGCAACCATCTCCGACACATACCGCTACATCTAA

LEGENDA:

ATG start kodon

Preprotripsinsko signalno zaporedje vektorja pFLAG-CMV3

Označevalec FLAG

mCitrin

Linker

TLR5

Označevalec AU1

TAA stop kodon

Aminokislinsko zaporedje mCER-TLR5

MSALLILALVGAADVADYKDDDDKVSKEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTL
VTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFKSAPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEY
NYNSHNVIYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALSADPNEKRDMVLLFEVFT
AAGITLGMDELYKGGSGGGSGGSIPSCSFDGRIAFYRFCNLTQVPQVLNTERLLLSFNYIRTVTASSFPFLEQLQLELGSQYTP
LTIDKEAFRNLNLRILDLGSSKIYFLHPDAFQGLFHLFELRLYFCGLSDAVLKDGYFRNLKALTRLDLSKNQIRSLYLHPSFGKL
NSLKSIDFSSNQIFLVCEHELEPLQGKTLSTFSLAANSLYSRVSDWGKCMNPFRNMVLEILDVSGNGWTVVDITGNFSNAISKSQ
AFSLILAHHIMGAGFGFHNIDPDQNTFAGLARSSVRHLDLSHGTFVSLNSRVFETLKDCLKVLNLAYNKINKIADEAFYGLDNL
QVLNLSYNLLGELYSSNFYGLPKVAYIDLQKNHIAIIQDQTFKFLEKLQTLDLRDNALTTIHFIPIPDIFLSGNKLVTLPKINLTA
NLIHLSNRLENLDILYFLLRVPHLQILILNQNRFSSTSGDQTPSENPSLEQLFLGENMLQLAWETELCWVDVFEGLSHLQVLYLN
HNYLNSLPPGVFVSHLTALRGLSLNSNRLTVLSHNDLPANLEILDISRNLQLLAPNPDVVFVSLSVLDITHNKFICECELSTFINWLNH
TNVTIAGPPADIYCVYPDLSLGSVSLFSLSTEGCDEEEVLKSLKSLFIVCTVTLTLFLMTILTVTKFRGFCFICYKTAQRLVFKDHP
QGTEPDYKYDAYLCFSSKDFTWVQNALLKHLDTQYSDQNRFNLCFEERDFVPGENRIANIQDAIWNRSRKIVCLVSRHFLRDG
WCLEAFSYAQGRCLSDLSALIMVVVGSLSQYQLMKHQSIKRGFVQKQYLRWPEDLQDVGWFLHKLSSQILKKEKEKKKDN
NIPLQTVATISDTYRYI#

PRILOGA B : Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje genskih konstruktov in himernih proteinov, uporabljenih za metodo cepljenih proteinov

Nukleotidno zaporedje pSplit1

ATG TCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTTGTGGAGCTGCAGTTGCT GACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTGTGAGCAA
GGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGCGGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTG
TCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGC
CCTGGCCCAACCTTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCAG
TTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG
CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC
ATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA
AGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATC GGTGGCTCTGGCGGTGGGAGTGGGGGAAGC ATTGCTTCTCTGCTCTTGAT
GGCCGAATAGCCTTTTATCGTTTCTGCAACCTCACCCAGGTCCCCAGGTCTCAACACCACTGAGAGGCTCCTGCTGAGC
TTCAACTATATCAGGACAGTCACTGCTTCATCCTTCCCTTTCTGGAACAGCTGCAGCTGCTGGAGCTCGGGAGCCAGTAT
ACCCCTTGACTATTGACAAGGAGGCCTTCAGAAACCTGCCAACCTTAGAATCTTGGACCTGGGAAGTAGTAAGATATA
CTTCTGCATCCAGATGCTTTTCAGGAGCTGTTCCATCTGTTTGAACCTTAGACTGTATTTCTGGTCTCTCTGATCGTGA
TTGAAAGATGGTTATTTACAGAAATTTAAAGGCTTTAACTCGCTTGGATCTATCCAAAAATCAGATTCGTAGCCTTTACCT
CATCCTTCATTTGGGAAGTTGAATTCCTTAAAGTCCATAGATTTTCTCCTCAACCAAATATTCCTTGTATGTGAACATGAG
CTCGAGCCCTACAAGGGAAAACGCTCTCCTTTTTCAGCCTCGCAGCTAATAGCTTGTATAGCAGAGTCTCAGTGGACTG
GGGAAAATGTATGAACCCATTTCAGAAACATGGTGTGAGATAGTATGTTTCTGGAAATGGCTGGACAGTGGACATC
ACAGAAACCTTAGCAATTTCTATGGACTACCTAAGGTAGCCTTCTCTTTGATTCTTGCCCAACCATCATGGGTGCCGGTTT
GGCTTCCATAACATCAAAGATCCTGACCAGAACACATTTGCTGGCTGGCCAGAAGTTCAGTGAGACACCTGGATCTTTC
ACATGGGTTTGTCTTCTCCCTGAACCTCAGGAGTCTTTGAGACACTCAAGGATTTGAAGGTTCTGAACCTTGCTTACAACAA
GATAAATAAGATTGCAGATGAAGCATTTTACGGACTTGACAACCTCCAAGTTCTCAATTTGTCATATAACCTTCTGGGG
AACTTTACAGTTTCAAAATTTCTATGGACTACCTAAGGTAGCCTTACATTGATTTGCAAAAGAATCACATTGCAATAATTCAAG
ACCAACATTCAAATTCCTGGAAAAATTACAGACCTTGGATCTCCGAGACAATGCTCTTACAACCATTCATTTTATTCCAA
GCATACCCGATATCTTCTTGAGTGGCAATAAAGTAGTGACTTTGCCAAAGATCAACCTTACAGCGAACCTCATCCACTTAT
CAGAAAAACAGGCTAGAAAACTAGATATTCTCTACTTTCTCTACGGGTACCTCATCTCCAGATTCTCATTTTAAATCAAA
ATCGCTTCTCCTCTAGTGGAGATCAAAACCCCTTCAGAGAATCCAGCTTAGAACAGCTTTTCTTGGAGAAAATATGT
TGCAACTTGCTGGGAACTGAGCTCTGTTGGGATGTTTTGAGGGACTTTCTCATCTTCAAGTTCTGTATTTGAATCATA
ACTATCTTAATTCCTTCCACCAGGAGTATTTAGCCATCTGACTGCATTAAGGGGACTAAGCCTCAACTCCAACAGGCTGA
CAGTTCTTTCTCACAATGATTTACCTGCTAATTTAGAGATCCTGGACATATCCAGGAACCAAGCTCCTAGCTCCTAATCCTG
ATGTATTTGTATCACTAGTGTCTTGGATATAAATCATAACAAGTTTCAATTTGTGAATGTGAACCTTAGCACTTTTATCAATTG
GCTTAATCACACCAATGTCACTATAGCTGGGCTCAGTGCAGACATATATTGTGTGTACCCTGACTCGCTCTCTGGGGTTTC
CCTCTTCTCTTTCCACGGAAGGTTGTGATGAAGAGGAAGTCTTAAAGTCCCTAAAGTTCTCCCTTTTCATTGTATGCACT
GTCACCTGACTCTGTTCTCATGACCATCTCACAGTCACAAAGTTCCGGGGCTTCTGTTTTATCTGTTATAAGACAGCC
CAGAGACTGGTGTCAAGGACCATCCCCAGGGCACAGAACCTGATATGTACAAATATGATGCCTATTTGTGCTTCAGCAG
CAAAGACTTCACATGGGTGCAGAAATGCTTTGCTCAAAACACTGGACACTCAATACAGTGACCAAAAACAGATTCAACCTGT
GCTTTGAAGAAAGAGACTTTGTCCAGGAGAAAACCGCATTGCCAATATCCAGGATGCCATCTGGAACAGTAGAAAGAT
CGTTTGTCTTGTGAGCAGACACTTCTTAGAGATGGCTGGTGCCTTGAAGCCTTCAGTTATGCCAGGGCAGGTGCTTATC
TGACCTTAACAGTGCTCTCATGATGGTGGTGGTGGTCTTGTCCAGTACCAGTTGATGAAACATCAATCCATCAGAGG
CTTTGTACAGAAAACAGCAGTATTTGAGGTGGCTGAGGATCTCCAGGATGTTGGCTGGTTTCTTCAAAACTCTCTCAACA
GATACTAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAGACAATAACATTCCGTGCAAACTGTAGCAACCATCTCCGACACATAC
CGCTACATCTAA

LEGENDA:

ATG start kodon
Preprotripsinsko signalno zaporedje vektorja pFLAG-CMV3
Označevalec FLAG
N-Citrin
Linker
TLR5
Označevalec AU1
TAA stop kodon

Aminokislinsko zaporedje SPLIT1

MSALLILALVGAAVADYKDDDDKLVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPT
LVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLE
YNYNSHNVIYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIGSGGGSGGSIPSCSFDGRIAFYRFCNLTQVPQVLNTERLLLSFNYYIRTVTASSF
PFLEQLQLLELGSQYTPLTIDKEAFRNLPNLRILDLGSSKIYFLHPDAFQGLFHLFELRLYFCGLSDAVLKDGYFRNLKALTRLDL
SKNQIRSLYLHPSFGKLSLKSIDFSSNQIFLVCEHELEPLQGKTLFFFSLAANSLSYRSVSDWGKCMNPFNRNMVLEILDVSGNG
WTVDTITGNFSNAISKSQAFSLILAHHIMGAGFGFHNKDPDQNTFAGLARSSVRHLDLSHGFFVFSLSNSRVFETLKDLKVLNLAY
NKINKIADEAFYGLDNLQVLNLSYNLLGELYSSNFYGLPKVAYIDLQKNHIAIIQDQTFKFLEKLQTLDLRDNALTTIHFIPIPI
FLSGNKLVTLPKINLTANLIHLSNRLENLDILYFLLRVPHLQILILNQNRFSFGSGDQTPSENPSLEQLFLGENMLQLAWETELC
WDVFEGLSHLQVLYLNHNLYLSLPPGVFSLHTALRGLSLNSNRSLTVLSHNDLPANLEILDISRNQLLAPNPDVFSLSVLDITHN
KFICECELSTFINWLNHTNVTIAGPPADIYCVYPDSLGSVSLFSLSTEGCDEEEVLKSLKFSLFIVCTVTLTLFLMTILTVTKFRGF
CFICYKTAQRLVFKDHPQGTPEPDYKYDAYLCFSSKDFTWVQNALLKHLDTQYSDQNRNLCFEERDFVPGENRIANIQDAIW
NSRKIVCLVSRHFLRDGWCLEAFSYAQGRCLSDLSALIMVVVGSLSQYQLMKHQSIRGFVQKQYLRWPEDLQDVGWFLH
KLSQQILKKEKEKKDNNIPLQTVATISDTYRY#

Nukleotidno zaporedje pSplit2

ATGCTGCACTTCTGATCCTAGCTCTTGTGGAGCTGCAGTTGCTGACTACAAAGACGATGACGACAAGCTTGCCGACAA
GCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTAC
CAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAA
AGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTCTGTACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG
CTGTACAAGGGTGGCTCTGGCGGTGGGAGTGGGGGAAGCATTCTTCTGCTCCTTTGATGGCCGAATAGCCTTTTATCGT
TTCTGCAACCTCACCCAGGTCCCCAGGTCTCAACACCACTGAGAGGCTCCTGCTGAGCTTCAACTATATCAGGACAGT
CACTGCTTCATCCTTCCCCTTTCTGGAACAGCTGCAGCTGCTGGAGCTCGGGAGCCAGTATACCCCTTGACTATTGACAA
GGAGGCCTTCAGAAACCTGCCCAACCTTAGAATCTTGGACCTGGGAAGTAGTAAGATATACTTCTTGCATCCAGATGCTT
TTCAGGGACTGTTCCATCTGTTTGAACCTAGACTGTATTTCTGTGGTCTCTCTGATGCTGTATTGAAAGATGGTTATTTTCAG
AAATTTAAAGGCTTTAACTCGCTTGGATCTATCCAAAAATCAGATTCTGAGCCTTTACCTTCATCCTTCATTTGGGAAGTT
GAATTCCTTAAAGTCCATAGATTTTTCTCCAACCAAAATATTCCTTGTATGTGAACATGAGCTCGAGCCCTACAAGGGAA
AACGCTCTCCTTTTTAGCCTCGCAGCTAATAGCTTGTATAGCAGAGTCTCAGTGGACTGGGGAAAATGTATGAACCCATT
CAGAAACATGGTGCTGGAGATACTAGATGTTTTCTGAAATGGCTGGACAGTGGACATCACAGGAACTTTAGCAATGCC
ATCAGCAAAAGCCAGGCCTTCTTTGATTCTTCCAAAACATCAGATTCTGGGTGCCGGGTTTGGCTTCCATAACATCAAAGAT
CCTGACCAGAACACATTTGCTGGCCTGGCCAGAAGTTCAGTGAGACACCTGGATCTTTCACATGGGTTTGTCTTCTCCCTG
AACTCACGAGTCTTTGAGACACTCAAGGATTTGAAGGTTCTGAACCTTGCCTACAACAAGATAAATAAGATTGCAGATGA
AGCATTTTACGGACTTGACAACCTCCAAGTTCTCAATTTGTATATAACCTTCTGGGGAACTTTACAGTTCGAATTTCTA
TGGACTACCTAAGGTAGCCTACATTGATTTGCAAAAGAATCACATTGCAATAATTCAAGACCAAAACATTCAAATTCCTGG
AAAAATTACAGACCTTGATCTCCGAGACAATGCTCTTACAACCATTCATTTTATTCCAAGCATACCCGATATCTTCTTGA
GTGGCAATAAACTAGTGACTTTGCCAAAGATCAACCTTACAGCGAACCTCATCCACTTATCAGAAAACAGGCTAGAAAAT
CTAGATATTTCTTACTTTCTCCTACGGGTACCTCATCTCCAGATTTCTCATTTTAAATCAAAATCGCTTCTCCTCTGTAGTG
GAGATCAAAACCCCTTCAGAGAATCCAGCTTAGAACAGCTTTTCTTGGAGAAAATATGTTGCAACTTGCCTGGGAACT
GAGCTCTGTTGGGATGTTTTTGAGGGACTTTCTCATCTTCAAGTTCTGATATTTGAATCATAACTATCTTAATTCCTTCCAC
CAGGAGTATTTAGCCATCTGACTGCATTAAGGGGACTAAGCCTCAACTCCAACAGGCTGACAGTCTTTCTCACAAATGAT
TTACCTGCTAATTTAGAGATCTGACATATCCAGGAACAGCTCCTAGCTCCTAATCCTGATGTATTTGTATCACTTACT
GTCTTGGATATAAATCATAACAAGTTCATTTGTGAATGTGAACCTTAGCACTTTTATCAATTGGCTTAATCACACCAATGTC
ACTATAGCTGGGCTCCTGCAGACATATATTGTGTGTACCCTGACTCGCTCTCTGGGGTTTCCCTCTTCTCTCTTTCACGG
AAGGTTGTGATGAAGAGGAAGTCTTAAAGTCCCTAAAGTTCTCCCTTTTCATTGTATGCACTGTCACTCTGACTCTGTTCC
TCATGACCATCCTCACAGTCACAAAGTTCGGGGCTTCTGTTTTATCTGTTATAAGACAGCCAGAGACTGGTGTCAAGG
ACCATCCCCAGGGCACAGAACCTGATATGTACAAATATGATGCCTATTTGTGCTTCAGCAGCAAAGACTTCACATGGGTG
CAGAATGCTTTGCTCAAACACCTGGACACTCAATACAGTGACCAAAACAGATTCAACCTGTGCTTTGAAGAAAAGAGACTT
TGTCCCAGGAGAAAACCGCATTGCCAATATCCAGGATGCCATCTGGAACAGTAGAAAAGATCGTTTGTCTTGTGAGCAGAC
ACTTCTTAGAGATGGCTGGTGCCTTGAAGCCTTCAGTTATGCCCAGGGCAGGTGCTTATCTGACCTTAACAGTGCTCTCA
TCATGGTGGTGGTGGGTCTTGTCCCAGTACCAGTTGATGAAACATCAATCCATCAGAGGCTTTGTACAGAAAACAGCAG
TATTTAGGTGGCTGAGGATCTCCAGGATGTGGCTGTTTCTTCAAAACTCTCTCAACAGATACTAAAGAAAAGAAAA
AGAAAAGAAGAAAGACAATAACATTCCGTTGCAAACTGTAGCAACCATCTCCGACACATACCGCTACATCTAA

LEGENDA:

ATG start kodon
Preprotripsinsko signalno zaporedje vektorja pFLAG-CMV3
Označevalec FLAG
C-Citrin
Linker
TLR5
Označevalec AU1
TAA stop kodon

Aminokislinsko zaporedje SPLIT2

MSALLILALVGAADVADYKDDDDKLADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALS KDP
NEKRDMVLLFEVTAAGITLGMDELYKGGSGGSGGSIPSCSFDGRIAFYRFCNLTQVPQVLNTERLLLSFNRYIRTVTASSFPF
LEQLQLELGSQYTPLTIDKEAFRNLNLRILDLGSSKIYFLHPDAFQGLFHLFELRLYFCGLSDAVLKDGYFRNLKALTRLDLS
KNQIRSLYLHPSFGKLSNLSKIDFSSNQIFLVEHELEPLQGKLSFFSLAANSLSYRSVSDWGKCMNPFNMVLEILDVSGNG
WTVDTGNFSNAISKQAFSLILAHHIMGAGFGFHNKDPDQNTFAGLARSSVRHLDLSHGFFVLSNRSVFETLKDLKVLNLAY
NKINKIADEAFYGLDNLQVLNLSYNLLGELYSSNFYGLPKVAYIDLQKNHIAHQDQTFKFLEKLQTLDRDNALTTIHFIPIPI
FLSGNKLVTLPKINLTANLIHLSNRLNLDILYFLLRVPHLQILNQNRFSSCSGDQTPSENPSLEQLFLGENMLQLAWETELC
WDVFEGLSHLQVLYLNHNYLNSLPPGVFSLHTALRGLSLNSNRLTVLSHNDLPANLEILDISRNQLLAPNPDPVFSLSVL DITHN
KFICECELSTFINWLNHTNVTIAGPPADIYCVYPDLSGVSLFSLSTEGCDEEEVLKSLKFSLFIVCTVTLTFLMTILTVTKFRGF
CFICYKTAQRLVFKDHPQGTEPDMYKYDAYLCFSSKDFTWVQNALLKHLDTQYSDQNRFNLCFEERDFVPGENRIANIQDAIW
NSRKIVCLVSRHFLRDGWCLEAFSYAQGRCLSDNLSALIMVVVGSLSQYQLMKHQSIIRGFVQKQYLRWPEDLQDVGWFLH
KLSQQLKKEKEKKKDNINPLQTVATISDTRYI#

PRILOGA C : Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje genskih konstruktov in himernih proteinov Flagelina, označenega s fluorofori

Nukleotidno zaporedje pFliC-mCer

ATGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCAGCAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAGCATATGCTCGAGGC
ACAAGTCATTAATACAAACAGCCTGTGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCCCAGTCCGCTCTGGGCACCGCTA
TCGAGCGTCTGTCTTCCGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGG
TCAGGCGATTGCTAACCCTTTTACCGCGAACATCAAAGGTCTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGTATCTCCA
TTGCGCAGACCACTGAAGGCGCGCTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAACCTGGCGGTTTCACTGTGCT
AACAGCACCAACTCCCAGTCTGACCTCGACTCCATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGCCTGAACGAAATCGACCGTGTATC
CGGCCAGACTCAGTTCAACGGCGTGAAAGTCCTGGCGCAGGACAACACCTGACCATCCAGGTTGGTGCCAACGACGGT
GAAACTATCGATATCGATCTGAAGCAGATCAACTCTCAGACCCTGGGTCTGGATACGCTGAATGTGCAACAAAAATATAA
GGTCAGCGATACGGCTGCAACTGTTACAGGATATGCCGATACTACGATTGCTTTAGACAATAGTACTTTAAAGCCTCGG
CTACTGGTCTTGGTGGTACTGACCAGAAAATTGATGGCGATTTAAAAATTTGATGATACGACTGGAAAAATATTACGCCAAA
GTTACCGTTACGGGGGGAAGTGGTAAAGATGGCTATTATGAAGTTTCCGTTGATAAGACGAACGGTGAGGTGACTCTTGC
TGGCGGTGCGACTTCCCCGCTTACAGGTGGACTACCTGCGACAGCAACTGAGGATGTGAAA
AATGTACAAGTTGCAAATGCTGATTTGACAGAGGCTAAAGCCGATTGACAGCAGCAGGTGTTACCGGCACAGCATCTGT
TGTTAAGTCTTCTTATACTGATAATAACGGTAAAACTATTGATGGTGGTTTACGAGTTAAGGTAGGCGATGATTACTATT
TGCAACTCAAAATAAAGATGGTTCCATAAGTATTAATACTACGAAATACACTGCAGATGACGGTACATCCAAAAGTGCAC
TAAACAAACTGGGTGGCGCAGACGGCAAAACCGAAGTTGTTCTATTGGTGGTAAAACCTTACGCTGCAAGTAAAGCCGA
AGGTCACAACTTTAAAGCACAGCCTGATCTGGCGGAAGCGGCTGCTACAACCACCGAAAACCCGCTGCAGAAAATTGAT
GCTGCTTTGGCACAGGTTGACACGTTACGTTCTGACCTGGGTGCGGTACAGAACCCTTTCAACTCCGCTATTACCAACCTG
GGCAACACCGTAAACAACCTGACTTCTGCCCGTAGCCGTATCGAAGATTCCGACTACGCGACCGAAGTTTCCAACATGTC
TCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGCGCGGTACCTCCGTTCTGGCGCAGGCGAACCAGGTTCCGCAAAACGTCCTCTCTTTAC
TGCGTGGTCTGGTCTGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGC
GACGTAACCGGCCACAAGTTACGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAAGTTCA
TCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCACTGCTTCCCGCG
TACCCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTT
CAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGGAGGTGAAGTTCCAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG
GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACGCCATCAGCGACAACGCTATATCA
CCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAATTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGC
CGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCA
AGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGTCCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCGCCGGGATCACTCTCGG
CATGGACGAGCTGTACAAGTAA

LEGENDA:

ATG start kodon

Označevalec HIS

Flagelin

Linker

mCerulean

TAA stop kodon

Aminoislinsko zaporedje FLIC-mCER

MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMLEMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTA
NIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNQLQVRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQD
NTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDTLNVQKQYKVSATAATVTGYADTTIALDNSTFKASATGLGGTDQKIDGDLKFDD
TTGKYAKVTVTGGTGKDGYYEVSVDKTNGEVTLAGGATSPLTGGLPATATEDVKNVQVANADLTEAKAALTAAGVTGTA
SVVKMSYTDNNGKTIDGGLAVKVGDDYYSATQNKDGSISINTTKYTADDGTSKTALNKLGGADGKTEVVSIGGKTYAASKAE
GHNFKAQPDLAEEAAATTENPLQKIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLTSARSRIEDSDYATEVSNMSRAQ
ILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLRGSGSMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYKGLTLKFICTTGK
LPVPWPVLVTTLTWGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDG
NILGHKLEYNAISDNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHM
VLEFVTAAGITLGMDELYK#

Nukleotidno zaporedje pFliC-mCit

ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCAGCAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAGCATATGCTCGAGGC
ACAAGTCATTAATACAAACAGCCTGTGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCCCAGTCCGCTCTGGGCACCGCTA
TCGAGCGCTGTCTTCCGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGACGATGCGGCAGG
TCAGGCGATTGCTAACCGTTTTACCGCGAACATCAAAGGTCTGACTCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGTATCTCCA
TTGCGCAGACCACTGAAGGCGCGTGAACGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAACCTGGCGGTTTCAGTCTGCT
AACAGCACCAACTCCCAGTCTGACCTCGACTCCATCCAGGCTGAAATCACCCAGCGCCTGAACGAAATCGACCGTGTATC
CGGCCAGATCAGTTCAACGGCGTGAAGTCTTGCGCAGGACAAACCCCTGACCATCCAGGTTGGTGCCAACGACGGT
GAACTATCGATATCGATCTGAAGCAGATCAACTCTCAGACCCTGGGTCTGGATACGCTGAATGTGCAACAAAAATATAA
GGTCAGCGATACGGCTGCAACTGTACAGGATATGCCGATACTACGATTGCTTTAGACAATAGTACTTTTAAAGCCTCGG
CTACTGGTCTTGGTGGTACTGACCAGAAAATTGATGGCGATTTAAAAATTTGATGATACGACTGGAAAAATTACGCCAAA
GTTACCGTTACGGGGGGAACCTGTAAGATGGCTATTATGAAGTTTCCGTTGATAAGACGAACGGTGAGGTGACTCTTGC
TGGCGGTGCGACTTCCCCGCTTACAGGTGGACTACCTGCGACAGCAACTGAGGATGTGAAA
AATGTACAAGTTGCAAATGCTGATTTGACAGAGGCTAAAGCCGCAATTGACAGCAGCAGGTGTTACCGGCACAGCATCTGT
TGTTAAGATGTCTTATACTGATAATAACGGTAAACTATTGATGGTGGTTTAGCAGTTAAGGTAGGCGATGATTACTATT
TGCAACTCAAAATAAAGATGGTTCCATAAGTATTAATACTACGAAATACACTGCAGATGACGGTACATCCAAAACCTGCAC
TAAACAACTGGGTGGCGCAGACGGCAAAACCGAAGTTGTTCTATTGGTGGTAAACTTACGCTGCAAGTAAAGCCGA
AGGTCACAACTTTAAAGCACAGCTGATCTGGCGGAAGCGGCTGCTACACCACCGAAAACCCGCTGCAGAAAATTGAT
GCTGCTTTGGCACAGGTTGACACGTTACGTTCTGACCTGGGTGCGGTACAGAACCGTTTCAACTCCGCTATTACCAACCTG
GGCAACACCGTAAACAACCTGACTTCTGCCGTAGCGTATCGAAGATTCCGACTACGCGACCGAAGTTTCCAACATGTC
TCGCGCGCAGATTCTGCAGCAGGCCGGTACCTCCGTTCTGGCGCAGGCGAACAGGTTCCGCAAAACGTCCTCTCTTTAC
TGCGTGGTCTGGTCTGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGC
GACGTAAACGGCCACAAGTTACGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGCGGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCA
TCTGCACCACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCTGTACACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTTCGCCCCGCT
ACCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC
AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAG
GGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCTATATCA
TGGCCGACAAGCAGAAGACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGC
CGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAAGTCCG
CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGC
ATGGACGAGCTGTACAAGTAA

LEGENDA:

ATG start kodon

Označevalec HIS

Flagelin

Linker

mCitrin

TAA stop kodon

Aminoislinsko zaporedje FLIC-mCIT

MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMLEMAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIANRFTA
NIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQAEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQD
NLTITQVGANDGETIDILKQINSQTLGLDTLNVQKQKVSdTAAATVTGYADTTIALDNSTFKASATGLGGTDQKIDGDLKFDD
TTGKYYAKVTVTGGTGKDGYYEVSVDKTNGEVTLAGGATSPLTGGLPATATEDVKNVQVANADLTEAKAALTAAGVTGTA
SVVKMSYTDNNGTIDGGLAVKVGDDYYSATQNKDGSISINTTKYTADDGTSKTALNKLGGADGKTEVVSIGGKTYAASKAE
GHNFKAQPDLAEEAAATTENPLQKIDAALAQVDTLRSDLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLTSARSRIEDSDYATEVSNMSRAQ
ILQAGTSLAQANQVPQNVLSLLRGSBSGMVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGK
LPVPWPVLVTTFGYGLMCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDG
NILGHKLEYNYSNHNYYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSYQSALS KDPNEKRDH
MVLLEFVTAAGITLGMDELYK