

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jelka POHAR

**VLOGA PROTEOLIZE V SIGNALIZACIJI
DVOVERIŽNE RNK PREKO TOLL-PODOBNEGA
RECEPTORJA 3**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jelka POHAR

**VLOGA PROTEOLIZE V SIGNALIZACIJI DVOVERIŽNE RNK
PREKO TOLL-PODOBNEGA RECEPTORJA 3**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF PROTEOLYSIS ON SIGNALING OF DOUBLE
STRANDED RNA THROUGH THE TOLL LIKE RECEPTOR 3**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

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

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Gregor Anderluh, za somentorja prof. dr. Roman Jerala ter za recenzenta prof. dr. Tom Turk.

Mentor: prof. dr. Gregor Anderluh

Somentor: prof. dr. Roman Jerala

Recenzent: prof dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK-LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Tom TURK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Roman JERALA

Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biotehnologijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jelka Pohar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 616-097 : 577.27 : 577.112 (043)=163.6
KG	imunski sistem/prirojena imunost/receptor TLR3/proteoliza/katepsini/protimikrobnii peptidi/povečana občutljivost receptorja
AV	POHAR, Jelka
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)/JERALA, Roman (somentor)/TURK, Tom (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	VLOGA PROTEOLIZE V SIGNALIZACIJI DVOČLENNE RNK PREKO TOLL-PODOBNEGA RECEPTORJA 3
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XXI, 104 str., 26 pregledov, 37 sl., 4 pril., 50 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Celice imunskega sistema ter številne druge celice v človeškem telesu izražajo Toll-podobne receptorje (TLR), ki prepozna različne molekule patogenih mikrobov. Receptorja TLR3 in TLR9 se nahajata v endosomih, kjer prepoznata dvočlenno RNK (dvRNK) oziroma nemetilirane CpG vzorce v bakterijski enoveržni DNK. Aktivacija signalne poti vodi do sinteze interferonov tipa 1 in vnetnih citokinov. Poznavanje interakcij med ligandom, receptorjem in drugimi molekulami je ključno pri spoznavanju nastanka avtoimunskeih bolezni in pretiranega odziva, ki lahko vodi v sepsko. Sintezni analogi ligandov se uporabljajo tudi kot adjuvansi za vakcine, ker pospešijo dozorevanje imunskeih celic pridobljene imunosti. Pred kratkim smo pri receptorju hTLR3 potrdili mesti na luminalni domeni pomembni za vezavo in prepoznavo dvRNK. Poleg tega smo ugotovili, da je za sprožitev signalne poti potrebna točno določena konformacija nukleinske kisline. Pri diplomski nalogi pa smo se osredotočili na morebitne druge molekule, ki bi lahko vplivale na odgovor TLR3. Pokazali so, da so pri signalizaciji preko TLR9 verjetno pomembni katepsini (cisteinske proteaze). Ugotovili smo, da sta inhibitorja cisteinskih proteaz E-64 in cistatin F zmanjšala odziv na stimulacijo z analogom dvočlenne RNK - poli(I:C). Preveriti smo žeeli tudi vpliv protimikrobnega peptida LL-37. Vezava lastnih nukleinskih kislin in njihova predstavitev lahko vodi do avtoimunski bolezni kot sta luskavica in eritematozni lupus. Dodatek LL-37 je povzročil zmanjšanje odziva s poli(I:C). Pri študiju medsebojnih vplivov med receptorjema TLR3 in TLR9 smo potrdili, da povezava obstaja, saj se v primeru kotransfekcije ter ob stimulaciji z ligandom za en receptor v endosome premakne tudi drugi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 616-097 : 572.27 : 577.112 (043)=163.6
CX	immune system/innate immunity/receptor TLR3/proteolysis/cathepsines/antimicrobial peptides/sensitization
AU	POHAR, Jelka
AA	ANDERLUH, Gregor (supervisor)/ JERALA, Roman (co - advisor)/ TURK, Tom (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2007
TI	THE INFLUENCE OF PROTEOLYSIS ON SIGNALING OF DOUBLE STRANDED RNA THROUGH THE TOLL LIKE RECEPTOR 3
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XXI, 104 p., 26 tab., 37 fig., 4 ann., 50 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Cells participating in the innate immune response and numerous other human cells express Toll-like receptors (TLR), which recognize different molecular components of pathogens. TLR3 and TLR9 receptors are expressed in endosomes sensing doublestranded RNA (dsRNA) and nonmethylated bacterial singlestranded DNA sequences, respectively. Activated signalling pathways result in production of interferon type 1 and inflammatory cytokines. Interactions between ligands and receptors are crucial in understanding of autoimmune diseases and development of excessive response which can lead to sepsis. Ligand analogues are also used as vaccine adjuvants since they have the ability of promoting maturation of immune system. Recently we confirmed the presence of two binding sites in luminal domain of TLR3. We also confirmed that binding and signal transduction are dependent on secondary structure of nucleic acid. In this present work we have focused on accessory molecules that modulate TLR3 responses. It has been shown that cathepsins (cysteine proteases) are required in TLR9 signaling. Inhibitors of cysteine proteases E-64 and cystatine F decrease cellular response after stimulation with ligand poly(I:C) that mimics dsRNA. We also tested the effect of antimicrobial peptide LL-37 which converts inert-self DNA into a potent trigger of interferon production due to TLR9 activation. Breaking of innate tolerance to self-DNA may lead to autoimmune diseases such as psoriasis and lupus erythematosus. However addition of LL-37 caused decerase in TLR3 response. Investigating possible interactions between TLR3 and TLR9 signalling showed that interaction exists. In case of cotransfection stimulation of one causes endosomal localization of another receptor.

KAZALO VSEBINE

	stran
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
KAZALO SLIK	XII
KAZALO PRILOG	XIV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XV
SLOVARČEK.....	XIX
 1 UVOD	 1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA.....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
 2 PREGLED OBJAV	 3
2.1 IMUNSKI SISTEM	3
2.2 RECEPTORJI TLR	4
2.2.2 ZNOTRAJCELIČNA SIGNALNA POT	6
2.2.2.1 Od MyD88 odvisna pot	7
2.2.2.2 Od MyD88 neodvisna pot oziroma od TRIF odvisna pot	8
2.2.3 RECEPTOR TLR3	9
2.2.3.1 Lokalizacija receptorja	10
2.2.3.2 Ektodomena	11

2.2.3.3 Dvočlena RNK kot ligand	12
2.2.3.4 Vezava in prepoznavanje liganda	12
2.2.3.5 Vezavno mesto za dvočleno RNK na receptorju.....	13
2.2.4 RECEPTOR TLR9	16
2.3 VPLIV DODATNIH MOLEKUL IN MEDSEBOJNIH VPLIVOV RECEPTORJEV NA SIGNALIZACIJO PREKO RECEPTORJEV TLR3 IN TLR9	18
2.3.1 PROTEAZE IN KATEPSINI.....	18
2.3.1.1 Katepsini in apotoza	21
2.3.2 INHIBITORJI PROTEAZ	21
2.3.2.1 Cistatin F	21
2.3.2.2 E-64	22
2.3.3 PROTİMİKROBNI PEPTIDI IN LL-37	22
2.3.4 VPLIV KATEPSINOV NA SIGNALIZACIJO.....	23
2.3.5 VPLIV LL-37 NA SIGNALIZACIJO PREKO TLR	24
2.3.6 SENZBILIZACIJA.....	25
3 MATERIALI IN METODE	26
3.1 MATERIALI.....	26
3.1.1 KEMIKALIJE	26
3.1.2 UPORABLJENE RAZTOPINE, PUFRI IN STANDARDI	27
3.1.3 LABORATORIJSKA OPREMA	30
3.1.4 UPORABLJENA PROTITELESA	31
3.1.5 UPORABLJENI PLAZMIDI	31
3.1.6 OLIGONUKLEOTIDI ZA VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO	36
3.1.7 ORGANIZMI	37
3.1.7.1 Bakterijski sevi.....	37
3.1.7.2 Celične kulture.....	37
3.1.8 GOJIŠČA.....	37

3.1.8.1 Gojenje <i>E. coli</i>	37
3.2 METODE	39
3.2.1 STERILIZACIJA RAZTOPIN, GOJIŠČ IN STEKLOVINE	39
3.2.2 OSNOVNE METODE MOLEKULARNEGA KLONIRANJA.....	39
3.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	39
3.2.2.2 Elektroforeza DNK na agaroznem gelu.....	40
3.2.2.3 Čiščenje pomnožkov PCR po verižni reakciji s polimerazo	41
3.2.2.4 Izolacija fragmentov DNK iz agaroznih gelov	41
3.2.2.5 Cepitev DNK z restrikcijskimi encimi.....	42
3.2.2.6 Ligacija	43
3.2.2.7 Kemijska transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5α.....	44
3.2.2.8 Izolacija plazmidne DNK.....	44
3.2.2.8.1 Izolacija plazmidne DNK v manjših količinah – mini prep	44
3.2.2.8.2 Izolacija plazmidne DNK s komercialno dostopnim kompletom	45
3.2.2.8.3 Izolacija plazmidne DNK, ki ne vsebuje endotoksina.....	45
3.2.2.8.4 Določanje koncentracije nukleinskih kislin.....	46
3.2.2.9 Določanje nukleotidnega zaporedja.....	46
3.2.3 DELO V CELIČNEM LABORATORIJU	47
3.2.3.1 Odmrzovanje celic	47
3.2.3.2 Gojenje človeških celičnih kultur HEK293 in HEK293T	47
3.2.3.3 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293 in HEK293T	48
3.2.3.4 Stimulacija transficiranih celic HEK293 in HEK293T	52
3.2.3.5 Liza transficiranih celic HEK293 in HEK293T	53
3.2.4 MERJENJE LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI	54
3.2.5 DOLOČANJE IZRAŽANJA PROTEINOV	55
3.2.5.1 Merjenje koncentracije proteinov – BCA test	56
3.2.5.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS-PAGE) ..	56
3.2.5.3 Prenos western	57
3.2.5.4 Imunodetekcija proteinov po prenosu western.....	57

3.2.6 OZNAČEVANJE SINTEZNE RNA (poli(I:C))	59
3.2.7 MIKROSKOPIRANJE	60
3.2.7.1 Obdelava slik.....	62
3.2.7.2 Določanje kolokalizacije z računalniškimi programi.....	62
3.2.8 PREGLED OSNOVNEGA POTEKA EKSPERIMENTOV	64
3.2.8.1 Lokalizacija TLR3.....	64
3.2.8.2 Vpliv stimulacije enega receptorja na lokalizacijo drugega.....	66
3.2.8.3 Vpliv proteaz in njihovih inhibitorjev na signalizacijo dvRNK preko TLR3.....	67
3.2.8.4 Dokazovanje izražanja proteinov.....	68
4 REZULTATI	69
4.1 PRIDOBITEV KONSTRUKTA hTLR3-mCER	69
4.1.1 PRODUKTI POMNOŽEVANJA S POLIMERAZO	69
4.1.2 RESTRIKCIJA GENSKIH PRODUKTOV IN VEKTORJA IN LIGACIJA.....	70
4.2 REZULTATI MIKROSKOPIRANJA	72
4.2.1 LOKALIZACIJA PROTEINA hTLR3-mCer IN OZNAČENE poli(I:C)	72
4.2.2 VPLIV STIMULACIJE ENEGA TLR NA PREMIK DRUGEGA TLR	74
4.3 VPLIV PROTEAZ NA SIGNALIZACIJO PREKO RECEPTORJA TLR3	82
4.3.1 REZULTATI MERJENJA LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI.....	82
4.3.1.1 Vpliv inhibitorja E-64 in peptida LL-37 na signalizacijo preko hTLR3	82
4.3.1.2 Vpliv katepsinov na signalizacijo preko hTLR3.....	83
4.3.1.3 Vpliv cistatina 7 na signalizacijo preko hTLR3.....	85
4.3.1.4 Vpliv hCAP-18 na signalizacijo preko hTLR3	86
4.3.2 REZULTATI DOKAZOVANJA IZRAŽANJA PROTEINOV	87
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	88
5.1 RAZPRAVA.....	88
5.1.1 MEDSEBOJNO DELOVANJE ENDOSOMALNIH TLR OB STIMULACIJI Z LIGANDOM	89

5.1.2	VPLIV PROTEOLIZE NA SIGNALIZACIJO PREKO TLR3	92
5.1.3	NADALJNJE RAZISKAVE	94
5.2	SKLEPI	95
6	POVZETEK.....	96
VIRI.....		98

ZAHVALA**PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

stran

Preglednica 1: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti, uporabljeni v diplomskem delu.	26
Preglednica 2: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri detekciji proteinov....	27
Preglednica 3: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri izdelavi DNK-konstruktov, pri merjenju luciferazne aktivnosti ter pri delu v celičnem laboratoriju.	28
Preglednica 4: Uporabljeni laboratorijski oprema.	30
Preglednica 5: Protitelesa, uporabljeni v diplomskem delu.....	31
Preglednica 6: Plazmidi, uporabljeni v diplomskem delu.	31
Preglednica 7: Oligonukleotidi, uporabljeni v diplomskem delu.....	36
Preglednica 8: Uporabljen sev bakterije <i>Escherichia coli</i>	37
Preglednica 9: Uporabljeni celični kulture.....	37
Preglednica 10: Tekoče gojišče LB za bakterije.	37
Preglednica 11: Trdno gojišče LB za bakterije.	38
Preglednica 12: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNK-polimerazo AccuPrime <i>Pfx</i>	39
Preglednica 13: Temperaturni program PCR pri uporabi DNK-polimeraze AccuPrime <i>Pfx</i>	40
Preglednica 14: Količine plazmidov, s katerimi smo vedno transficirali celice v eni luknjici za merjenje luciferazne aktivnosti.....	49
Preglednica 15: Količine plazmidov za transfekcijo pri ugotavljanju vpliva stimulacije z različnimi stimulacijskimi mešanicami na signalizacijo preko receptorja hTLR3.....	49
Preglednica 16: Količine plazmidov za transfekcijo pri ugotavljanju vpliva različnih količin katepsinov (L1, S, K) na signalizacijo poli(I:C) preko hTLR3.....	50
Preglednica 17: Količine plazmidov za transfekcijo pri ugotavljanju vpliva inhibitorja cistatina 7 na signalizacijo poli(I:C) preko hTLR3.	51

Preglednica 18: Količine plazmidov za transfekcijo pri ugotavljanju vpliva proteina hCAP-18 (človeški katelicidin) na signalizacijo poli(I:C) preko hTLR3.....	51
Preglednica 19: Količine plazmidov, s katerimi smo transficirali celice za ugotavljanje proteinske sinteze.	52
Preglednica 20: Kombinacij plazmidov za transfekcijo ter oznake pridobljenih lizatov.	55
Preglednica 21: Približne velikosti iskanih proteinov.	59
Preglednica 22: Vrste laserjev in valovne dolžine, pri katerih vzbujajo fluorescenco.....	60
Preglednica 23: Označevalci, ki smo jih uporabljali pri barvanju organelov.....	61
Preglednica 24: Prikaz količin plazmidov za transfekcijo, načina stimulacije in barvanja organelov celic HEK293T za opazovanje lokalizacije proteina hTLR3-mCer in označene poli(I:C).	61
Preglednica 25: Prikaz količin plazmidov za transfekcijo, načina stimulacije in barvanja organelov celic HEK293T za opazovanje premika označenih receptorjev....	62
Preglednica 26: Rezultati merjenja intenzitete lis iz filmov dobljenih po imunodetekciji proteinov.....	87

KAZALO SLIK

	stran
Slika 1: Receptorji TLR in njihovi ligandi.....	4
Slika 2: Splošna zgradba receptorjev TLR.....	5
Slika 3: Shematski prikaz adapterskih proteinov, ki sodelujejo pri prenosu signala preko receptorjev TLR in vsebujejo domeno TIR (Kawai in Akira, 2004: 14).	6
Slika 4: Shematski prikaz poti signalizacije preko receptorjev TLR3 in TLR4 (Kawai in Akira, 2006).....	9
Slika 5: Splošna struktura luminalne domene TLR3 (Pirher in sod. 2008: 761).....	14
Slika 6: Prileganje A- in B-konformacije v vezavna mesta ECD (Pirher in sod, 2008: 762). ..	15
Slika 7: Model kompleksa TLR3 dimera in različno dolgih fragmentov dsRNA (Pirher in sod, 2008: 762).....	16
Slika 8: Shema katelicidina hCAP-18.....	22
Slika 9: Shema vektorja pcDNA3.	32
Slika 10: Shema plazmidov pUNO-hTLR3 in pUNO-hTLR9-HA.....	33
Slika 11: Shema vektorjev, v katere so vstavljeni cDNA inserti z zapisi za človeške katepsine L1, S in K (CTSL1, CTSS, CTSK), katelicidin protimikrobn peptid (CAMP) in cistatin F (CST7).	34
Slika 12: Shematski prikaz dela plazmida pHRL-TK.....	34
Slika 13: Shema načrtovanja pomnoževanja gena za mCerulean.	36
Slika 14: Shema osnovnega poteka eksperimenta za preverjanje kolokalizacije TLR3-mCer in z Alexa Fluor hidrazid 633 označene poli(I:C).	65
Slika 15: Poenostavljena shema konstruktov TLR3 in TLR9	66
Slika 16: Poenostavljena shema osnovnega poteka eksperimenta za raziskovanje vpliva premika sorodnih receptorjev v endosome.....	67
Slika 17: Poenostavljena shema osnovnega poteka eksperimenta za raziskovanje vpliva katepsinov in inhibitorjev proteaz na signalizacijo preko TLR3 z dvojnim luciferaznim testom.	67

Slika 18: Poenostavljena shema osnovnega poteka eksperimenta za preverjanje proteinske sinteze človeškega receptorja TLR3.....	68
Slika 19: Slika 1,2-odstotnega agaroznega gela s produktom PCR-reakcije za pomnoževanje gena za fluorescentni protein mCerulean.	69
Slika 20: Slika 1,0-odstotnega agaroznega gela z rezanim vektorjem pcDNA3.....	70
Slika 21: Slika 1,0-odstotnega agaroznega gela z rezanim vektorjem pUNO-hTLR3.....	71
Slika 22: Kolokalizacija hTLR3-mCer in označene poli(I:C) ali označene poli(I:C) ob dodatku LL-37 v endosomih.....	72
Slika 23: Stimulacija s poli(I:C) poveča lokalizacijo hTLR3-mCer v lizosomskih veziklih.	74
Slika 24: Stimulacija s poli(I:C) poveča lokalizacijo hTLR3-mCer v endosomih.....	75
Slika 25: Stimulacija z ODN 10104 poveča lokalizacijo hTLR9-YFP v lizosomskih veziklih.	76
Slika 26: Stimulacija z ODN 10104 poveča lokalizacijo hTLR9-YFP v endosomih.	77
Slika 27: Stimulacija z ODN 10104 poveča lokalizacijo hTLR3-mCer v lizosomskih veziklih.	78
Slika 28: Stimulacija z ODN 10104 poveča lokalizacijo hTLR3-mCer v endosomih.	79
Slika 29: Stimulacija s poli(I:C) poveča lokalizacijo hTLR3-mCer v lizosomskih veziklih.	80
Slika 30: Stimulacija s poli(I:C) poveča lokalizacijo hTLR9-YFP v endosomih.	81
Slika 31: Vpliv različnih stimulacijskih mešanic na signalizacijsko pot preko hTLR3. Način stimulacije je	82
Slika 33: Vpliv količine katepsinov (L1, S in K) na signalizacijsko pot preko hTLR3 ob stimulaciji s poli(I:C).	84
Slika 34: Vpliv količine inhibitorja cistatina F signalizacijsko pot preko hTLR3 ob stimulacijia s poli(I:C) ali poli(I:C) v kompleksu s peptidom LL-37.	85
Slika 35: Vpliv količine proteina hCAP-18 (človeški katelicidin) na signalizacijsko pot preko hTLR3 ob stimulaciji s poli(I:C) ali poli(I:C) ob dodatki inhibitorja E-64.	86
Slika 36: Imunodetekcija proteinov hTLR3 in mCerulean..	87
Slika 37: Model premika receptorjev iz ER v endosome.	91

KAZALO PRILOG

Priloga A: Genski kod in okrajšave aminokislin.

Priloga B: Statistična obdelava rezultatov merjenja luciferazne aktivnosti pri odzivu hTLR3 ob dodatku LL-37 in E-64. Preizkusili smo domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc z uporabo Studentove porazdelitve pri 99-odstotnem intervalu zaupanja.

Priloga C: Statistična obdelava rezultatov merjenja luciferazne aktivnosti pri odzivu hTLR3 ob transfekciji s pCAMP in dodatku E-64. Preizkusili smo domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc z uporabo Studentove porazdelitve pri 99-odstotnem intervalu zaupanja.

Priloga D: Statistična obdelava rezultatov merjenja luciferazne aktivnosti pri odzivu hTLR3 ob transfekciji s pCST7. Preizkusili smo domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc z uporabo Studentove porazdelitve pri 99-odstotnem intervalu zaupanja.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca pri določeni valovni dolžini
AK	aminokislina, aminokislinski ostanek
Amp	ampicilin
ang.	angleško
APS	amonijev persulfat
Ba/F3	mišje B celice iz periferne krvi
bp	bazni par
CPI	mešanica proteaznih inhibitorjev (ang. protease inhibitor cocktail)
CpG	dvinukleotidni motivi iz citozina in gvanina (ang. cytosine-phosphate-guanine)
CpG-ODN	oligodeoksinukleotidi s CpG motivi
Da	dalton, enota za molekulsko maso
DC	dendritične celice (ang. dendritic cells)
DD	domena smrti (ang. death domain)
DEPC	dietilpirokarbonat
DMEM	gojišče za celične kulture (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dnMyD88	dominantno negativna oblika proteina MyD88
dNTP	2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat
DOC	deoksiholična kislina (5b-holan-24-ojska kislina-3a,12a-diol)
DTT	ditiotreitol
dvRNK	dvojerižna ribonukleinska kislina (ang. double stranded RNA - dsRNA)
E-64	L-trans-epoksisukcinil-leiucilamido(4-guanidino) butan, ang. trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane) je ireverzibilni inhibitor cisteinskih proteaz
ECD	luminalna domena

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
EGTA	etilen glikol tetraacetna kislina
ER	endoplazmatski retikulum
EtBr	etidijev bromid
FBS	fetalni telečji serum (ang. fetal bovine serum)
Fluc	kresničkina luciferaza
hCAP-18	človeški katelicidin
HEK293	trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (ang. human embryonic kidney cell line)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
hMD-2	humani oziroma človeški MD-2
hTLR3	humani oziroma človeški receptor TLR3
hTLR9	humani oziroma človeški receptor TLR9
IFN	interferon
IFN- α	interferon alfa
IFN- β	interferon beta
IKK	inhibitorna kapa B kinaza (ang. I κ B kinase)
IL	interlevkin
IRAK	kinaza, povezana z receptorjem IL-1 (ang. IL-1 receptor-associated kinase)
IRF3	interferonski odzivni faktor 3 (ang. interferon response factor 3)
IRF7	interferonski odzivni faktor 7 (ang. interferon response factor 7)
kDa	kilo Da (1000 Da)
konc.	koncentracija
LB	gojišče Luria-Bertani
LBP	LPS-vezavni protein (ang. LPS-binding protein)
LL-37	protimikrobeni peptid, ki nastane po cepitvi prekurzorja hCAP-18
LPS	lipopolisaharid, imenovan tudi endotoksin

LRR	z levcinom bogate ponovitve (ang. leucine-rich repeat)
Mal/TIRAP	adapterski protein podoben MyD88 (ang. MyD88-adaptor-like/TIR- - domain-containing adaptor molecule)
MD-2	diferenciacijski mieloidni protein 2 (ang. myeloid differentiation protein 2)
MQ	mili Q voda, dodatno očiščena destilirana voda
MyD88	diferenciacijski mieloidni protein 88 (ang. myeloid differentiation primary-response protein 88)
NF-κB	jedrni faktor κB (ang. nuclear factor-kappa B)
ODN	oligodeoksinukleotid
PAMP	molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (ang. pathogen-associated molecular patterns)
PBS	fosfatni pufer
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H_3O^+
poli(I:C)	poliinozinska/policitidinska kislina (ang. polyinosinic:polycytidylic acid), tudi poliriboinozinska/poliribocitidinska kislina
RIP1	receptor-vezavni protein 1 (ang. receptor-interacting protein 1)
PRR	receptor za prepoznavanje patogenih motivov (ang. pattern recognition receptor)
RLE	relativne luciferazne enote
Rluc	<i>Renilla</i> luciferaza
RNaza	ribonukleaza
RNK	ribonukleinska kislina
SDS	natrijev dodecil sulfat
TAB	protein, ki veže TAK1 (ang. TAK1-binding protein)
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-κB activator (TANK)-binding kinase 1)
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	Toll-podoben receptor (ang. Toll-like receptor)
TNF α	dejavnik tumorske nekroze α (ang. tumor necrosis factor α)
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)
Tris	tris (hidroksimetil)-aminometan
Tween 20	polioksietilensorbitan monolavrat
vrt./min	vrtljaji na minuto
% (m/v)	odstotek, delež neke snovi, določen kot razmerje mase te snovi z volumnom celotne raztopine

SLOVARČEK

HEK293, HEK293T

HEK293 je celična linija, nastala s transformacijo kulture normalnih človeških embrionalnih ledvičnih celic z DNK adenovirusa 5 v laboratoriju Franka Grahama v poznih sedemdesetih letih dvajsetega stoletja. Celice ne izražajo Toll-podobnih receptorjev (TLR). HEK293T so tip HEK293 celic, v katerih se stabilno izraža antigen T virusa SV40, ki omogoča podvojevanje plazmidov z izvorom podvojevanja SV40, kar omogoča večje izražanje takšnih plazmidov. Celice HEK293T so naredili v laboratoriju Michelle Calos v Stanfordu konec osemdesetih let prejšnjega stoletja.

Luciferaza

Luciferaza je generično ime za encime, ki katalizirajo reakcije bioluminiscence pri organizmih, kot sta kresnička *Photinus pyralis* in koralinjak *Renilla reniformis*. V molekularni biologiji uporabljamо luciferaze kot poročevalske encime, s katerimi spremjamо izražanje genov. V dvojnem luciferaznem testu hkrati uporabimo dve luciferazi; inducibilno izraženo kresničkino luciferazo za spremljanje izražanja genov ter konstitutivno izraženo *Renilla* luciferazo za normalizacijo transfekcije.

MyD88

Adapterski protein, pomemben pri znotrajcelični signalizaciji receptorjev TLR. Zgrajen je iz domene smrti (DD), ki se veže z IRAK kinazami ter domene Toll-interlevkinskega receptorja (TIR), ki se veže z domeno TIR receptorja TLR.

TLR3

Tollu-podoben receptor 3, zgrajen iz luminalne domene ozziroma domene znotraj endosomov, ki vsebuje z levcini bogate ponovitve, transmembranske regije ter znotrajcelične ozziroma citoplazemske domene TIR. Na luminalno domeno se veže

dvočleni virusni RNK ali njeni sintetični analogi, na znotrajcelično domeno pa adapterski proteini, ki vsebujejo domeno TIR.

TLR4

Tollu-podoben receptor 4, zgrajen iz zunajcelične domene, ki vsebuje z levcini bogate ponovitve, transmembranske regije ter znotrajcelične oziroma citoplazemske domene TIR. Na zunajcelično domeno se veže kompleks iz MD-2, CD14 ter LPS, na znotrajcelično domeno pa adapterski proteini, ki vsebujejo domeno TIR.

TLR9

Tollu-podoben receptor 9, zgrajen iz luminalne domene oziroma domene znotraj endosomov, ki vsebuje z levcini bogate ponovitve, transmembranske regije ter znotrajcelične oziroma citoplazemske domene TIR. Na luminalno domeno se veže enoverižna z nemetiliranimi CpG motivi bogata bakterijska DNK ali njeni sintetični analogi, na znotrajcelično domeno pa adapterski proteini, ki vsebujejo domeno TIR.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Toll-podobni receptor 3 (TLR3) se izraža v imunskih in številnih neimunskih celicah, kjer se nahaja v membrani endosomov (Anders in sod., 2005). Prepoznavajo dvočlenno RNK (dvRNK). Vezava povzroči dimerizacijo receptorja ter prenos signala preko od MyD88 neodvisne poti, ki povzroči izražanje interferonov tipa 1 (Akira in Takeda, 2004).

Pri receptorju TLR9, ki ga prav tako najdemo v endosomih in prepoznavajo enoverižno DNA (CpG motiv), so dokazali, da je aktivnost endosomalnih cisteinskih proteaz (katepsini) nujna za prenos signala. Njihova inhibicija prepreči prenos signala (Asagiri in sod., 2008; Matsumoto in sod., 2007).

Na podlagi podobnosti zaznavanja nukleinskih kislin predvidevajo, da catepsini vplivajo tudi na signalizacijo preko receptorja TLR3 (Matsumoto in sod., 2007).

Pri receptorju TLR9 so pokazali, da se odziv na bakterijsko enoverižno DNA poveča, če je le ta vezana na protimikrobnii peptid LL-37. Ta peptid lahko veže tudi človeško DNA in prav tako aktivira TLR9 kar vodi v nastanek avtoimunskih bolezni (npr. luskavica, sistemski eritematozni lupus). Viri navajajo, da LL-37 služi kot prenosač dvočlenne RNK v endosome (Lande in sod., 2007).

Velik pomen za odziv na mikrobe ima tudi poznavanje interakcij in medsebojnih vplivov med receptorji. Tako imenovana senzibilizacija lahko vpliva na povečano občutljivost celic, lahko pa vodi tudi v sepso (Lin in sod., 2000; Pestka in Zhou, 2006),

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo želeli raziskati, na kakšen način catepsini L1, S in K vplivajo na signalizacijo preko receptorja TLR3 ter kako na prenos signala vplivajo inhibitorji cisteinskih proteaz (cistatin F in E-64). Pojasniti smo poskušali tudi vlogo protimikrobnega peptida LL-37

in njegovega prekurzorja človeškega katelicidina hCAP-18, saj lahko LL-37 z vezavo lastnih nukleiskih kislin povzroči avtoimunski odziv.

Infekcija z mikrobi predstavlja signal za več TLR hkrati, zato je pričakovati usklajeno delovanje več receptorjev. Ob stimulaciji receptorji vplivajo tudi na izražanje in lokalizacijo drugih TLR in povečajo občutljivost celic na druge signale. Pretirana občutljivost lahko vodi tudi do nastanka avtoimunskih bolezni. V diplomskem delu smo želeli raziskati, če obstaja komunikacija tudi med človeškima receptorjem TLR3 in TLR9 in ali stimulacija z agonistom enega receptorja vpliva na premik drugega receptorja v endosome.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Tako kot pri receptorju TLR9 pričakujemo, da imajo katepsini in njihovi inhibitorji vpliv tudi na prenos signala preko receptorja TLR3. Pričakovali smo, da se bo signal zaradi proteolitične aktivnosti povečal, ob prisotnosti inhibitorjev pa zmanjšal.
- Glede na objavljene rezultate, ki pojasnjujejo vpliv protimikrobnega peptida LL-37 (Lande in sod., 2007), pričakujemo, da se bo odziv celic na dvRNK ob dodatku LL-37 ali njegovega prekurzorja povišal.
- Pri raziskovanju medsebojnega vpliva med receptorjema TLR3 in TLR9 pričakujemo, da se bo ob stimulaciji enega receptorja z ligandom v endosome in lizosome istočasno premaknil tudi drugi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IMUNSKI SISTEM

Vsi živi organizmi smo izpostavljeni mikroorganizmom v okolju. V primeru vdora mikroorganizmov v naše telo smo v evoluciji razvili učinkovit imunski sistem, ki tujke prepozna in na različne načine poskuša zaustaviti njihovo širjenje in morebitni razvoj bolezni.

Pri vretenčarjih se je razvil zelo kompleksen imunski sistem, ki se deli na prirojeno in pridobljeno imunost. Prirojena ali naravna imunost predstavlja prvo obrambno linijo pred patogenimi mikroorganizmi. Vključuje genetske dejavnike in različne anatomske, mehanske ovire, nespecifične baktericidne snovi telesnih tekočin (npr. lizocim, protimikrobni peptidi) fagocitozo ter različne efektorske mehanizme, kot sta interferon in komplementni sistem (Vozelj, 2000).

Pridobljena imunost vključuje odziv znan samo pri vretenčarjih. Posredujejo ga T in B limfociti, ki izražajo raznolike receptorje za antigene. Posledica je nastanek protiteles, efektorskih celic in imunski spomin (Akira in Takeda, 2004; Vozelj, 2000).

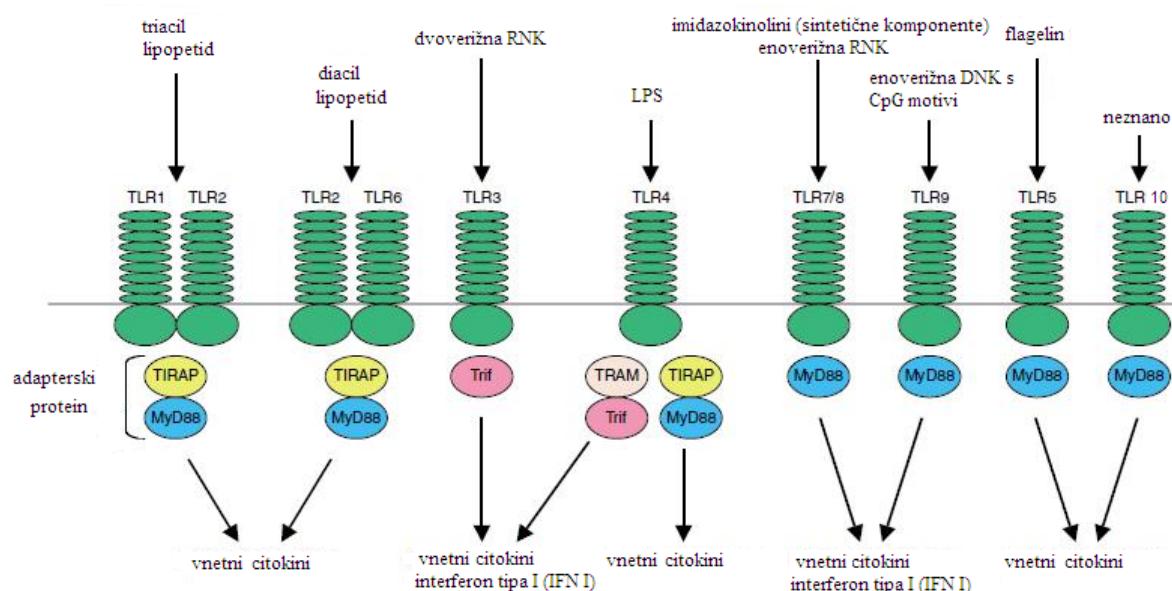
Prirjena imunost je dolgo veljala za dokaj nespecifičen sistem, ki vključuje uničenje patogena in predstavitev antigenov celicam, ki sodelujejo v pridobljeni imunosti. Kljub temu vedno več raziskav potrjuje, da je sistem prirjene imunosti bolj specifičen in je sposoben ločiti med lastnimi molekulami in motivi patogenov. Specifičnost temelji na prepoznavanju značilnih motivov mikroorganizmov. Te motive prepoznavajo evolucijsko ohranjeni Toll-podobni receptorji (ang. Toll-like receptors – TLR). Receptorji TLR imajo ključno vlogo zgodnji fazi obrambe pred patogenimi mikroorganizmi. (Akira in Takeda, 2004).

2.2 RECEPTORJI TLR

2.2.1 ODKRITJE

Receptor Toll je leta 1985 pri vinski mušici (*Drosophila melanogaster*) odkrila Kathryn V. Anderson s sodelavci. Ugotovili so, da receptor sodeluje pri dorzoventralnem razvoju zarodka. Sodeluje pa tudi pri imunskem odzivu mušice na okužbo z glivami in bakterijami (Beutler 2004; Lemaitre in sod., 1996).

Pri človeku so do sedaj odkrili 10 različnih receptorjev, od katerih vsak prepozna specifične in za posamezne patogene mikroorganizme značilne molekulske motive. Te motive imenujemo tudi PAMPs (ang. pathogen-associated molecular patterns) ali molekulske motive patogenih organizmov (Akira in Takeda, 2004; Beutler 2004).

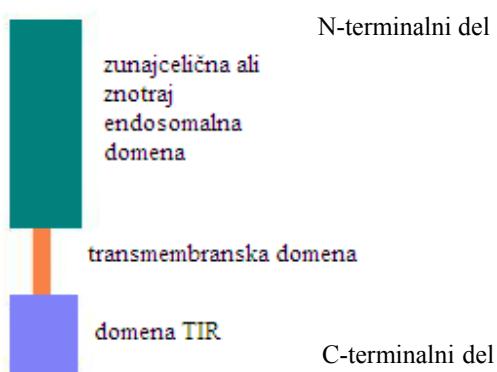


Slika 1: Receptori TLR in njihovi ligandi. Na sliki so prikazani še adapterski proteini, ki sodelujejo pri prenosu signala po dimerizaciji domen TIR ter citokini, katerih prepis sprožijo (Kawai in Akira, 2006: 817).

Receptor TLR4 tako prepozna lipopolisaharid po Gramu negativnih bakterij, TLR2 v kombinaciji s TLR1 ali TLR6 prepozna različne bakterijske komponente kot so peptidoglikan, lipopeptide in lipoproteine po Gramu pozitivnih bakterij. Receptor TLR5 prepozna bakterijski flagelin. Vsi ti našteti receptorji ter TLR10 so vsidrani v citoplazemski membrani. Receptorji TLR3, 7, 8 in 9 pa so v membrani endosomov in prepoznavajo nukleinske kisline. TLR3 prepoznavata dvočlenno RNA, TLR9 pa prepoznavata enoverične CpG (nemetilirani dinukleotidi) DNK bakterijske in virusne motive (Akira, 2004; Kawai in Akira, 2006). Na sliki 1 so prikazani receptorji TLR in njihovi značilni ligandi.

TLR receptorji so membranski glikoproteini tipa 1. Glede na podobnost citoplazemske domene (C terminalni del proteina) jih uvrščamo v naddružino, v katero uvrščamo tudi receptorje za interlevkin 1. Domena je znana kot domena Toll-interlevkinskega receptorja oziroma domena TIR (ang. Toll-interleukin receptor) (Akira in Takeda, 2004).

Receptorji so sestavljeni še iz transmembranske regije, ki prehaja bodisi citoplazemska membrano ali membrano endosomov. N terminalna domena receptorjev je sestavljena iz 19-25 ponovitev z levcinom bogatih sekvenc (ang. leucine-rich repeat). Pri receptorjih, ki ležijo na celični površini, ta domena veže molekule zunaj celice (zunajcelična domena). Pri receptorjih TLR3, 7, 8 in 9 pa je N terminalni del v notranjosti oz. lumnu endosomov, zato ji pravimo tudi luminodomena ali luminalna domena. (Akira, 2004; Kawai in Akira, 2006). Na sliki 2 je prikazana splošna zgradba receptorjev TLR.



Slika 2: Splošna zgradba receptorjev TLR.

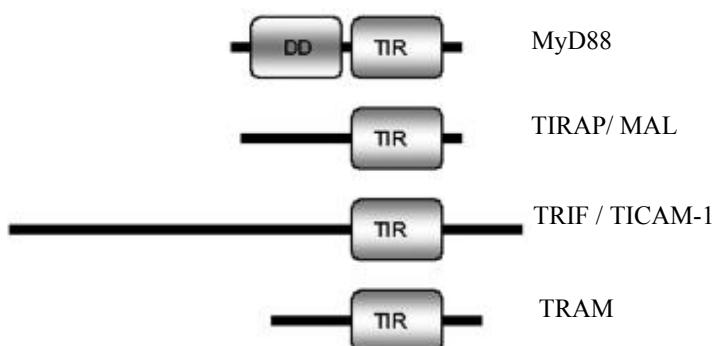
2.2.2 ZNOTRAJCELIČNA SIGNALNA POT

Vezava liganda na receptor povzroči dimerizacijo TLR receptorjev. Zunanja domena ima funkcijo prepozname liganda, citoplazemska domena TIR pa posreduje začetek signalizacijske kaskade, ki privede do prehoda transkripcijskih faktorjev v jedro in izražanja vnetih citokinov ali interferonov tipa 1. Prenos signala zagotavlja adapterski proteini.

Poleg sinteze vnetih citokinov signaliziranje preko receptorjev TLR sproži tudi dozorevanje dendritičnih celic (DC), ki so skupina antigen predstavlajočih celic. Dozorevanje DC je nujno za indukcijo pridobljenega imunskega odziva. Receptorji TLR torej povezujejo prirojeno in pridobljeno imunost (Iwasaki in Medzhitov, 2004).

V grobem ločimo dve različni signalizacijski poti, ki se ločita po tem, kateri adapterski protein prenese signal takoj po dimerizaciji receptorja.

Najbolj pogosta pot je od diferenciacijskega mieloidnega proteina 88 ali MyD88 (ang. myeloid differentiation primary-response protein 88) odvisna pot. Pri od MyD88 neodvisni poti pa sodeluje adapterski protein TRIF (ang. TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF- β), znan tudi kot TICAM-1 (ang. TIR-domain-containing molecule 1), zato ji pravimo tudi od TRIF odvisna pot (Akira, 2004; Kawai in Akira, 2006).



Slika 3: Shematski prikaz adapterskih proteinov, ki sodelujejo pri prenosu signala preko receptorjev TLR in vsebujejo domeno TIR (Kawai in Akira, 2004: 14).

2.2.2.1 Od MyD88 odvisna pot

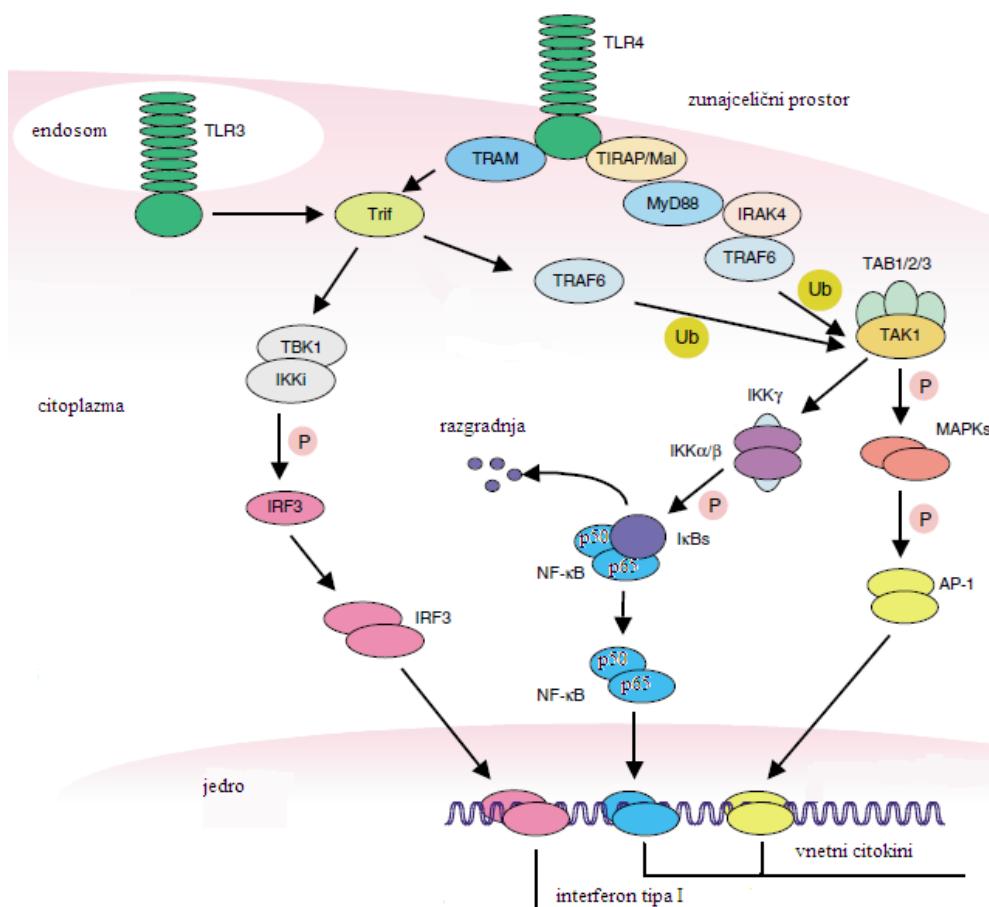
MyD88 je osrednji adapterski protein, ki sodeluje pri prenosu signala preko vseh TLR receptorjev razen preko TLR3. Na C terminalnem delu ima domeno TIR na N terminalnem delu pa domeno smrti (DD, ang. death domain). Loči ju kratko povezovalno zaporedje. MyD88 sodeluje pri prenosu signala preko receptorjev TLR1, 2, 4, 5, 6, ,7, 8, 9 in 10. Pri receptorjih TLR1, 2, 6 in 4 se MyD88 veže le ob prisotnosti adapterskega proteina Mal/TIRAP (ang. MyD88 - adaptor-like/TIR-domain-containing adaptor molecule). Na domeno TIR adapterja Mal/TIRAP se nato s svojo domeno TIR veže protein MyD88. Domena smrti proteina MyD88 se poveže z domeno smrti kinaze IRAK4 (kinaza, povezana z receptorjem IL-1, ang. IL-1R-associated kinase 4). Ta povezava nato omogoči vezavo IRAK1. Kinaze IRAK imajo domeno smrti na N terminalnem delu. Osrednja regija ima kinazno aktivnost, C terminalni del pa je bogat z aminokislinama treonin in serin, zato jih uvrščamo v skupino serin/treonin-kinaz. IRAK4 povzroči fosforilacijo in s tem aktivacijo IRAK1, ki se avtofosforilira. Nanj se nato veže TRAF6 (faktor povezan z receptorjem za TNF, ang. TNF receptor -associated factor 6). Kompleks proteinov IRAK1-TRAF6 se sprosti z receptorja in reagira s kompleksom TAK1 (s transformirajočim rastnim faktorjem β aktivirana kinaza 1, ang. transforming growth factor- β -activated kinase 1), TAB1 (protein, ki veže TAK1, ang. TAK1-binding protein), TAB2 in TAB3 na citoplazemske membrani. TAK1, TAB2 in TAB3 se fosforilirajo, IRAK1 se razgradi. Preostali kompleks se v citosolu poveže z ubikvitin ligazama UBC13 (ang. ubiquitin conjugating enzyme 13) in UEV1A (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1). To vodi do ubikvitiniliranja TRAF6 in posledično aktivacije TAK1. Aktivirana TAK1 kinaza fosforilira kompleks IKK (inhibitorni kapa B (I κ B) kinazni kompleks, ang. inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex). Sestavljata ga podenoti IKK α , IKK β ter regulatorna podenota IKK γ ozziroma NEMO (ang. NF- κ B essential modulator). IKK kompleks nato fosforilira I κ B in ga označi za poliubikvitiniliranje. I κ B se razgradi kar privede do sprostitev transkripcjskega faktorja NF- κ B iz inhibitornega kompleksa in njegov prenos v jedro, kjer sproži prepisovanje od NF- κ B-odvisnih genov

(Kawai in Akira, 2006; Akira in Takeda, 2004). Shematski prikaz signalizacijske poti je prikazan na sliki 4.

2.2.2.2 Od MyD88 neodvisna pot oziroma od TRIF odvisna pot

Po aktivaciji receptorja TLR3 pride do sprožitve od MyD88 neodvisne poti oziroma od TRIF (ang. TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF- β) odvisne poti. TRIF je znan tudi kot TICAM-1 (ang. TIR-domain-containing molecule 1). Do aktivacije te poti pride tudi pri receptorju TLR4. To so ugotovili s študijami na makrofagih, ki niso izražali MyD88. Od TRIF odvisna pot aktivacije povzroči zakasnjen NF- κ B-odgovor in aktivacijo transkripcijskega faktorja IRF3 (interferonski odzivni faktor 3). IRF3 sproži nastanek IFN (interferon) α in β ter izražanje IFN-inducibilnih genov. Poleg adapterskega proteina TRIF pri odzivu s TLR4 sodeluje še protein TRAM (ang. TRIF-related adaptor molecule), znan tudi kot TICAM-2 (ang. TIR-domain-containing molecule 2), ki se veže na TIR domeno TLR4. Adapterski protein TRAM je značilen samo za od MyD88 neodvisno pot TLR4. Preko domene TIR se na TRAM veže še TRIF. N terminalna domena TRAM se lahko veže s TRAF6 in povzroči aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B.

Za aktivacijo od IFN tipa 1 odvisnih genov mora priti do sinteze IRF3. N terminalna domena proteina TRIF se poveže z netipičnima IKK kinazama - TBK1 (ang. TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1) in IKK- ϵ . Kinazi fosforilirata IRF3 (ang. IFN-regulatory factor 3), kar privede do dimerizacije. Dimer IRF3 potuje v jedro in sproži prepis genov (Akira in Takeda, 2004; Kawai in Akira, 2006).



Slika 4: Shematski prikaz poti signalizacije preko receptorjev TLR3 in TLR4 (Kawai in Akira, 2006).

2.2.3 RECEPTOR TLR3

Toll-like receptor 3 (TLR3) prepoznavata dvočleno RNK molekulo, ki je produkt v življenjskem krogu večine virusov. Po aktivaciji se signal s TIR domene prenese neposredno na adaptersko molekulo TRIF, preko katere se signalizacija nadaljuje po že opisani od MyD88 neodvisni poti. Sprožena signalna pot vodi do aktivacije transkripcionskega faktorja IRF3 pa tudi do NF-κB. Rezultat je produkcija vnetnih in protivirusnih citokinov (Jorgenson in sod., 2005).

Receptor TLR3 je po strukturi podoben receptorjem TLR7, 8 in 9, ki prepoznavajo derivate nukleinskih kislin. Filogenetske analize kažejo, da je najbolj soroden receptorju TLR9, ki prepozna bakterijsko CpG DNK (Matsumoto in sod., 2002).

Receptor prepozna značilne lastnosti dvRNK in njene analoga poli(I:C) (poliinosin-policitidinska kislina, ang. polyinosine–polycytidylic acid). Dvočlena DNK, poli deoksiinosin-deoksicitidinska kislina (poli(dI:dC)) in enočlena RNK ne stimulirajo signalne poti preko TLR3. Znotrajcelični TLR3 lahko prepozna tudi nekatere mRNK molekule, najverjetneje zaradi tvorbe dvočlenih segmentov (Wang in Carmichael, 2004).

Pri miškah, ki niso izražale receptorja TLR3, so opazili zmanjšan odziv na poli(I:C) in zmanjšano producijo vnetnih citokinov. Stimulacija s poli(I:C) preko receptorja TLR3 lahko sproži aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B in preko mitogena aktiviranih kinaz (MAP kinaze, ang. mitogen-activated protein kinases) neodvisno od MyD88 in povzroči zorenje dendritičnih celic (Jiang in sod., 2004; Ranjith-Kumar in sod., 2007). Miške brez gena za TLR3 niso bile sposobne ustrezno odgovoriti na okužbo s citomegalovirusom (Bell in sod., 2006).

2.2.3.1 Lokalizacija receptorja

Lokalizacija in izražanje receptorja TLR3 sta odvisna od vrste celic. Receptor najdemo predvsem v membrani endosomov in lisosomov dendritičnih celic, naravnih celic ubijalk, mastocitov, epitelnih celicah prebavnega trakta, epiteliju maternične sluznice, pri fibroblastih pa so jih dokazali tudi na plazemski membrani. Študije, pri katerih so naredili mutacije v TIR domeni, so pokazale, da je za lokalizacijo TLR3 znotraj celice pomembno zaporedje 23 aminokislin od Glu⁷²⁷ do Asp⁷⁴⁹ (Jorgenson in sod., 2005; Nishiya in sod., 2005; Matsumoto in sod., 2002;).

Po vezavi liganda receptorji tvorijo dimere kar privede do prenosa signala (Liu in sod., 2008).

V nestimuliranih celicah se TLR3 nahaja v ER in se ob stimulaciji z dvRNK premakne v endosome. TLR3 lahko v endosome pride po sekretorni poti preko Golgijevega aparata ali pa direktno iz ER. Tako kot pri TLR9 so tudi za receptor TLR3 dokazali, da je občutljiv na deglikozilacijo z endoglikozidazo H. Endoglikozidaza H ne more deglikozilirati proteinov, ki so bili glikozilirani v Golgijevem aparatu. Ker je TLR3 na endoglikozidazo H občutljiv, v endosome verjetno pride neposredno iz ER (Johnsen in sod. 2006; Lande in sod., 2007).

2.2.3.2 Ektodomena

Ektodomena (ECD, ang ectodomain) ima obliko podkve iz ponovitev bogatih z levcinom. ECD se dejansko nahaja znotraj oziroma v lumnu endosomov, zato jo imenujemo tudi luminalna domena. Na podlagi preteklih študij kristalne strukture so ugotovili, da je luminalna domena z molekulsko maso 95525 Da zgrajena iz 23 tipičnih LLR in dveh netipičnih LRR ponovitev. Konkavno notranjost zanke je sestavlja 25 paralelnih β struktur, ki tvorijo neprekinjen β -list. Hidrofobni aminokislinski ostanki so obrnjeni v podkev in oblikujejo hidrofobno jedro, ki stabilizira LLR. Zunanja stran ECD je po strukturi bolj razgibana in močno ter neenakomerno glikozilirana. Na C-terminalnem delu podkve glikozilacije ni, kar nakazuje na prosto površino za intermolekularne interakcije z ligandi (Bell in sod., 2005; Bell in sod., 2006).

Ponovitvi LRR12 in LRR20 vsebujeta daljše vstavke aminokislinskih ostankov in oblikujeta zanki. Vstavki na teh mestih so ohranjeni tudi pri receptorjih TLR3 drugih sesalskih vrst (Bell in sod., 2005; Bell in sod., 2006).

2.2.3.3 Dvoverižna RNK kot ligand

Glavni vir dvRNK v celicah je virusna okužba, čeprav ta oblika nastaja tudi v normalnem celičnem ciklu. Celice višjih evkariontov vsebujejo malo ali nič citoplazemske dvRNK. V sesalskih celicah dolga dvRNK sproži od interferona odvisno signalno pot. Ker dvRNK nastaja skoraj pri vseh okužbah virusov, je bil odgovor preko interferona verjetno primarni protivirusni obrambni sistem. V citoplazmi dvRNK neodvisno prepoznavajo še protein kinaza R (PRK, ang. protein kinase R) in 2'-4'A sistem (ang. 2'-5'-oligoadenylate synthetase and RNase L) (Wang in Carmichael, 2004).

Po okužbi z virusom pride do sinteze in izločanja interferonov tipa 1 (INF- α in INF- β) v zunajcelični prostor. Tam delujejo na sosednje celice kot parakrini citokini. Začnejo od interferona odvisno signalno pot, aktivirajo transkripcijske faktorje kar vodi v regulacijo že prej naštetih sistemov: PKR, 2'-4'A sistem ter še nekaterih drugih. (Wang in Carmichael, 2004)

S sintetičnimi analogi dvRNK kot sta poli(I:C) ali poli(A:U) lahko v celicah izzovemo imunski odziv pri živalih in celo pridobitev odpornosti na okužbo z virusi. Sintezni ligandi morajo imeti obe hidroksilni skupini na ribozu. Zaporedje nukleotidov za aktivacijo TLR3 ni pomembno. Kot analog se dvRNK najpogosteje uporablja sintetični ligand poli(I:C), saj so zanj dokazali da sproži aktivacijo TLR3 v enaki meri kot dvRNK. Osnovni gradniki liganda so riboinozinska in ribocitidinska kislina (Green in sod., 1978; Bell in sod., 2006).

2.2.3.4 Vezava in prepoznavanje liganda

Receptorji TLR3 se specifično odzovejo na fragmente dsRNA ali njihove sintezne analoge, ki so daljši od 21 baznih parov (Green in sod., 1978).

Vezava poli(I:C) oziroma dvRNK na luminalno domeno je odvisna od pH v okolju, v katerem prihaja do stika z ECD. Afiniteta in specifičnost vezave dvRNK na luminalno domeno se bistveno poveča pri nizkih pH vrednostih, največja pa je pri pH 4.2. TLR3 veže dvRNK pri

pH vrednostih, ki se ujemajo s kislostjo v endosomih (zgodnji endosomi imajo pH približno 6.0, pozni pa manj kot 5.5). Pri povišanju pH na 7.5 pride do popolne disociacije dvRNK od ECD. Od pH okolja je odvisna tudi vezava CpG DNK na receptor TLR9. Sposobnost vezave dvRNK je odvisna tudi od dolžine dvRNK fragmentov. Krajši fragmenti namreč zahtevajo nižji pH kot daljši. Vezava liganda, dimerizacija receptorjev in sprožena signalizacija, ki sledi, je pri receptorjih TLR3 in TLR9 torej odvisna od kolokalizacije ligandov in receptorjev v kislih kompartmenih (Ranjith-Kumar in sod., 2007; Leonard in sod., 2008). Dvoverižna RNK oziroma CpG DNK morata torej priti v notranjost endosomov, kjer se vežeta z receptorji. Bafilomicin, ki je inhibitor zakisanja endosomov, prepreči signalno pot. (Matsumoto in sod., 2007).

Signalna pot preko receptorja TLR3 ne vodi samo do aktivacije transkripcijskega faktorja IRF3 ter do prepisa od interferona tipa 1 odvisnih genov. Adapterski protein TRIF se lahko preko 6 aminokislin dolgega zaporedja veže na adapterski protein TRAF6. To področje imenujemo tudi TRAF6 vezavna sekvenca. Z mutacijami v tej regiji so preprečili aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B, na IRF3 pa niso vplivale, kar pomeni, da se signalni poti ločita pri adapterju TRIF (Jiang in sod., 2004).

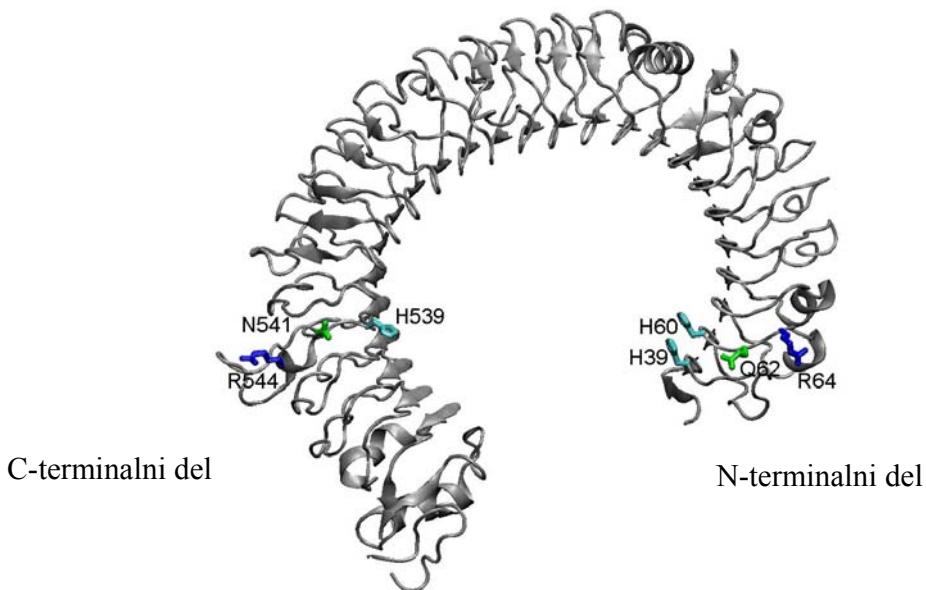
2.2.3.5 Vezavno mesto za dvoverižno RNK na receptorju

Pri raziskovanju iskanja mesta, kamor se vežejo ligandi, je več skupin raziskovalcev uporabilo metodo uvajanja točkovnih mutacij. Pri proučevanju mutacij na območjih zanke, ki jo tvori LRR20, so odkrili, da sta za vezavo dsRNA oziroma poli(I:C) bistvenega pomena dve aminokislini, in sicer His539 in Asn541. Aminokislini sta na mestu, kjer ni glikozilacije.

Raziskovalci so namesto histidina uvedli glutaminsko kislino, namesto asparagina pa alanin. Odsotnost pozitivnega naboja, na katerem koli izmed teh mest, je vodila v popolno izgubo sposobnosti vezave liganda, kar kaže, da pride do povezovanja med negativno nabitim delom liganda in pozitivno nabitim aminokislinskimi ostanki (Bell in sod., 2006).

Raziskovanja oziroma potrditve drugega vezavnega mesta na C terminalnem delu in ugotavljanja vpliva konformacije nukleinske kisline smo se lotili tudi v raziskovalni skupini prof. dr Romana Jerale in o zaključkih objavili članek "A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation" (Pirher in sod. 2008). Objavili pa so tudi že kristalno strukturo luminalne domene receptorja v kompleksu z ligandom (Liu in sod., 2008). Z uvajanjem točkastih mutacij smo raziskovali vpliv na drugo vezavno mesto za dvočleno RNA na luminalni domeni. Na N terminalnem delu domene sta med vretenčarji ohranjena dva histidinska ostanka, za katera so prav tako predvidevali, da sodelujeta pri vezavi dvočlenega RNK. To sta His39 in His60, ki sta v kristalni strukturi v tesnem stiku. Mutacije oba AK v aspartat, pri katerih je prišlo do spremembe naboja, so povzročile zmanjšan odziv. Vlogo pri vezavi pa imata tudi arginina na mestih 64 in 65. Zamenjava v neutralna alanina ni zmanjšala aktivacije, pač pa jo je zmanjšala sprememba Arg64 v glutaminsko kislino zaradi spremembe naboja.

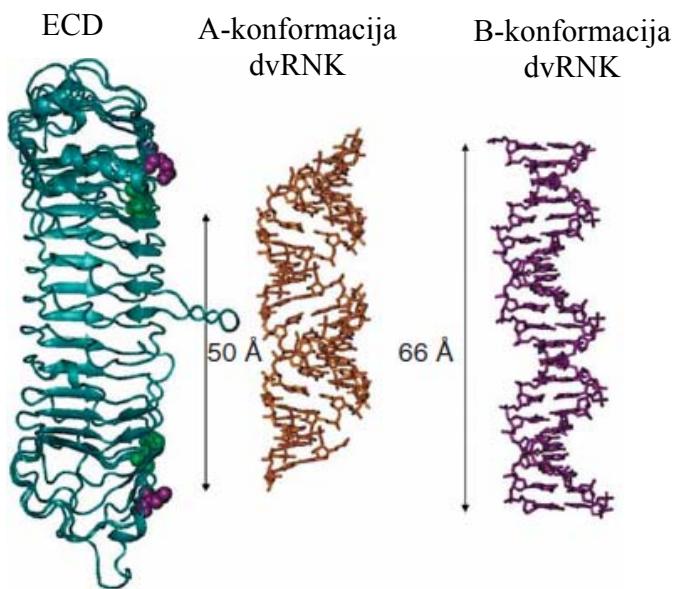
Zamenjava glutamina na 62 mestu z glutaminsko kislino ali alaninom se je odrazila v zmanjšani aktivnosti.



Slika 5: Splošna struktura luminalne domene TLR3 (Pirher in sod. 2008: 761). Na sliki so označena tudi kritična mesta za vezavo dvočlenega RNK .

Poleg potrditve drugega vezavnega mesta za vezavo dvRNK, smo potrdili tudi domneve o vplivu konformacije oziroma sekundarne strukture nukleinske kisline na vezavo in sprožitev signalizacije. Dokazali smo, da TLR3 aktivira dvRNK v A-obliku. Razdalja med aminokislinama His60 in His539 je namreč 50 \AA , kar se ujema z dvema navojema dsRNA v tej konformaciji. Pri B obliku, ki je v fizioloških razmerah najbolj pogosta oblika dvoverižne DNK molekule, je navoj daljši (33 \AA) in ne pride do prileganja v vezavna mesta ECD. B oblika se s fizioloških razmerah lahko veže na receptor, vendar ne sproži aktivacije.

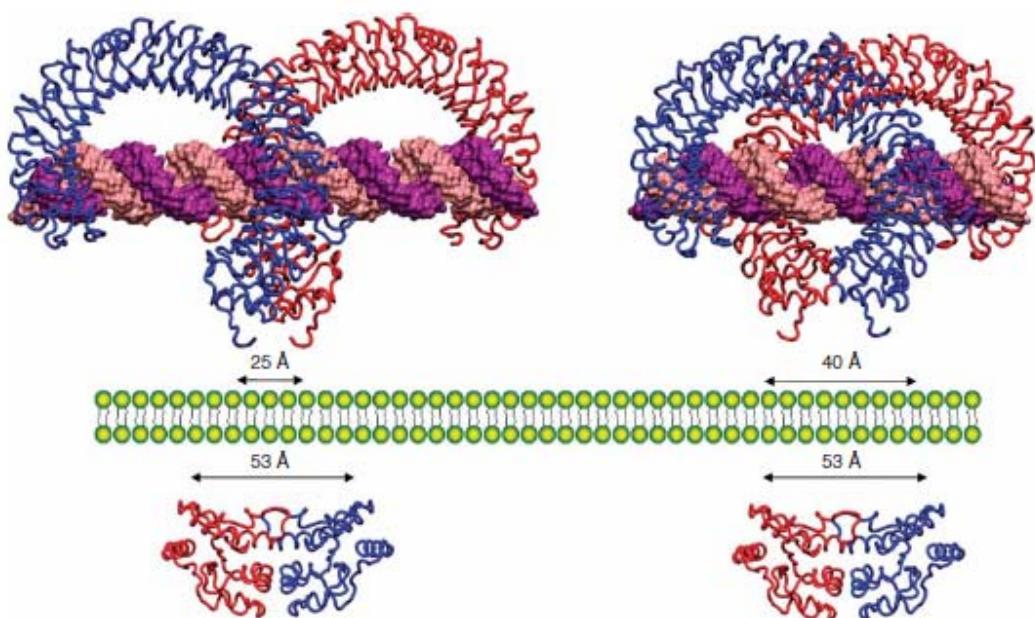
Na podlagi kristalne strukture kompleksa dvRNK in luminalne domene TLR3 ter znanih vezavnih mest tako na N- kot tudi na C-terminalni regiji smo predpostavili možni model vezave liganda in TLR3 (slika 6).



Slika 6: Prileganje A- in B-konformacije v vezavna mesta ECD (Pirher in sod, 2008: 762).

Najmanjši signalizacijski kompleks je sestavljen iz dvRNK in dimera receptorjev TLR3 (Leonard in sod., 2008). Na sliki 7 sta prikazana dva modela signalizacijskega kompleksa, ki se razlikujeta po dolžini liganda. V obeh primerih sta dimera enako prostorsko urejena, le zamiki luminalnih domen glede na dvRNK so različni. V primeru daljših fragmentov (46 bp) sta C-terminalni regiji druga od druge oddaljeni 25 \AA . Predvidevajo, da je ta kompleks bolj

stabilen, saj vodi v večji interferonski odziv. Na desni strani je prikazan model, kjer je dsRNA dolga od 21 do 30 bp. V tem primeru se ECD domeni pomakneta bliže skupaj, razdalja med C-terminalnima koncema pa se poveča na 40 Å. Takšni kompleksi so manj stabilni in zaradi tega je aktivacija TLR3 signalne poti šibkejša (Pirher in sod., 2008).



Slika 7: Model kompleksa TLR3 dimera in različno dolgih fragmentov dsRNA (Pirher in sod, 2008: 762). Različna postavitev vpliva na medsebojno oddaljenost dveh C terminalnih delov. Pri obeh postavitvah pa pride do enake oddaljenosti domen TIR na citosolni strani, ki je potrebna za začetek signalizacije.

2.2.4 RECEPTOR TLR9

TLR9 prepoznavata značilne GC dinukleotide v bakterijski DNA, ki jih imenujemo tudi CpG (citozin fosfat gvanin) motivi. Ti motivi niso metilirani kot je to značilno za DNK gostitelja (Matsumoto in sod., 2008).

Receptor TLR9 je v nestimuliranih makrofagih, dendritičnih in transficiranih HEK293 celicah v endoplazemskem retiklu. S pomočjo označenega CpG so pokazali, da je CpG DNK po

endocitozi v zgodnjih endosomih, ki se sčasoma od postopoma premaknejo proti sredini celice (Latz in sod., 2004).

Ob stimulaciji s CpG DNK se TLR9 iz endoplazemskega retikla (ER) premakne v zgodnje endosome, kjer pride v stik s CpG DNK. V endosomih se veže na TLR9 kar privede do konformacijske spremembe receptorja. To povzroči aktivacijo MyD88 in signalizacijo preko MAP kinaz, IRF in NF- κ B. Na koncu pride do nastanka citokinov in izražanja površinskih kostimulatornih molekul (npr. CD86). Raziskave kažejo, da se ta premik zgodi direktno ob povezavi membrane ER in fagosoma in ne preko golgijevega aparata (Latz in sod., 2004; Asagiri in sod., 2008).

2.3 VPLIV DODATNIH MOLEKUL IN MEDSEBOJNIH VPLIVOV RECEPTORJEV NA SIGNALIZACIJO PREKO RECEPTORJEV TLR3 IN TLR9

Pri receptorjih TLR4, TLR2 in TLR1 so že poznane medsebojne interakcije med receptorji in dodatne molekule, ki so nujno potrebne za odziv receptorja. Študije vpliva na receptorje nakazujejo, da za prepoznavo tudi TLR9 potrebuje dodatne molekule, tako kot TLR4 potrebuje MD-2, LPB (ang. Lipid Binding protein, lipid vezavni protein) in CD14 (Matsumoto in sod., 2008).

Vplivi drugih molekul na signaizacijo preko receptorjev TLR3 in TLR9 so slabše poznani.

Študije so pokazale, da TLR9 lahko prepozna lastno DNA, če je ta vezana na DNA vezavne proteine, kot so protitelesa proti DNA ali protimikrobní peptid LL-37 kar lahko vodi do avtoimunskih bolezni kot sta sistemski eritematozni lupus ali luskavica. Tudi HMGB-1 (ang. high mobility group box 1) protein, ki se veže na kromatin ter se sprošča iz nekrotičnih celic, ojača odziv preko TLR9 (Matsumoto in sod., 2008).

2.3.1 PROTEAZE IN KATEPSINI

Proteaze oz. peptidaze razvrščamo glede na njihov mehanizem katalize na aspartatne, cisteinske, glutaminske, treoninske, serinske proteaze in metaloproteaze. Delimo jih na endopeptidaze, ki cepijo notranje peptidne vezi in eksopeptidaze, ki cepijo vezi blizu konca polipeptidne verige. Cisteinske proteaze delimo še na tri družine – papainsko, kaspazno in kalpainsko. V papainsko družino spada večina katepsinov (Chwieralski in sod., 2006).

Večino sesalskih lizosomskih proteaz poznamo kot katepsine (ang cathepsins), vendar niso vsi katepsini cisteinske proteaze. Pri človeku poznamo 11 katepsinov in sicer B, C, F, H, K, L, O,

S, V, X, in W. Katepsini so v endosomih in lizosomih in ne v citoplazmi, zato je še toliko bolj verjetno, da imajo pomembno vlogo pri signalizaciji preko znotrajceličnih TLR receptorjev (Matsumoto in sod., 2008).

Proteaze, ki so v endosomih in lizosomih so povezane s procesiranjem zunajceličnega lastnega ali tujega antigena, ki se potem predstavi s poglavitnim histokompatibilnim kompleksom razreda II (PHK II, ang. major histocompatibility complex class II – MHC II) na površini antigen predstavljalajočih celic. Katepsini (tisti, ki spadajo med cisteinske proteaze) imajo v tem proteolitičnem sistemu pomembno vlogo (Vozelj, 2000; Zavašnik-Bergant in Turk, 2006).

Zunajcelične antigene preko endocitoze ali fagocitoze prevzamejo antigen predstavljalajoče celice (APC). APC potem prestavijo na kompleks PHK II vezane peptide CD4⁺ T celicam pomagalkam. Proteaze sodelujejo pri proteolizi proteinov na peptide ter razgradnji invariantne verige na PHK II, ki omogoči vezavo peptidov na kompleks. Po vezavi peptida se PHK II prenesejo na celično površino (Zavašnik-Bergant in Turk, 2006; Vozelj, 2000).

Cisteinski katepsini so majhni monomerni proteini. Pomembno vlogo igrajo pri aktivaciji proteinov in hormonov, preoblikovanju izvenceličnega matriksa ter apoptozi. Da ne bi prišlo do nekontrolirane aktivnosti, je njihova sinteza regulirana na transkripciskem in posttranslacijskem nivoju. Vsi katepsini nastanejo kot neaktivni proencimi. Za aktivacijo potrebujetejo proteolitsko cepitev. V specifičnih razmerah, kot je nizek pH, je ta avtokatalitska. Ko so že aktivni, na izgubo aktivnosti vplivajo degradacija, oksidacija cisteina v aktivnem mestu in endogeni inhibitorji, kot so cistatini in stefini. Ti se vežejo na tarčni encim in preprečijo hidrolizo substrata (Zavašnik-Bergant in Turk, 2006).

Katepsini nastajajo kot neaktivni proencimi, ki se v Golgijevem aparatu glikozilirajo. Vezava na manoza-6-fosfat receptorje jih usmeri na endosomalne vezikle, kjer se aktivirajo. Znano je tudi, da se katepsini lahko sprostijo iz lizosomov v citoplazmo, kjer lahko katalizirajo cepitev substrata. E-64 je ireverzibilni inhibitor teh proteaz (Chwieralski in sod., 2006).

V poskusih smo uporabljali tri različne katepsine.

- **Katepsin S**

Katepsin S je glavni katepsin, ki nastopa pri procesiranju antigena za predstavitev s PHK II. Prisoten je predvsem v celicah limfatičnega tkiva in alveolarnih makrofagih. Zaradi aktivnosti v širokem pH spektru je aktiven v celotni endocitotski poti. *In vivo* aktivnost katepsina S regulira cistatin C. Katepsin S je tudi tarča za zdravljenje različnih imunskih bolezni kot so revmatoidni artritis in bronhialna astma. Zaradi aktivnosti pri nevtralnem pH je aktiven tudi v zunajceličnem prostoru, kjer razgrajuje elastin. Izraža se v aterosklerotičnih tkivih. Znotraj celice sodeluje pri predstavljanju antigenov, v zunajceličnem prostoru pa lahko poškoduje tkiva (Zavašnik-Bergant in Turk, 2006).

- **Katepsin L**

Katepsin L sodeluje pri odstranitvi invariantne verige iz PHK II, kar omogoča vezavo razgrajenega antiga na molekulo PHK II (Zavašnik-Bergant in Turk, 2006).

- **Katepsin K**

Katepsin K se izraža predvsem v osteoklastih, kjer sodeluje pri oblikovanju kosti in razgradnji kolagena, elastina in osteonektina. Stabilen je od pH 5 do pH 8. Pomembno vlogo igra pri osteoporosi in revmatoidnem artritisu. Zdravljenje teh bolezni poteka z inhibitorji teh encimov (Zavašnik-Bergant in Turk, 2006).

2.3.1.1 Katepsini in apotoza

Apotoza je najpogosteji način odmiranja celic imunskega sistema in regulacije populacije. Proces je reguliran preko dveh različnih poti. Za notranjo (intrinzična) pot je značilno sproščanje aktivatorjev kaspaz (npr. citokrom C) iz mitohondrijev. Zunanja pot (ekstrinzična) se aktivira preko vezave liganda FAS na receptor smrti (receptor FAS) na plazemski membrani. To vodi do aktivacije kaspaz v citoplazmi. Apoptotične celice se skrčijo, membrana postane mehurčasta in DNK se fragmentira (Chwieralski in sod., 2006).

V regulacijo apoptoze so lahko vključeni tudi katepsini. V fizioloških razmerah so te proteaze znotraj endosomov. Sprostijo se ob poškodbi endosomov, ki je lahko posledica mehanske poškodbe, sprostitev reaktivnih kisikovih spojin iz mitohondrijev ali posledica delovanja lizosomotropnih molekul, ki naredijo membrane lizosomov prepustne. Taka molekula je na primer sfingozin. Sprostitev katepsinov iz lizosomov ne prizadene integritete organela in pH vrednosti v lumnu endosoma (Chwieralski in sod., 2006).

2.3.2 INHIBITORJI PROTEAZ

2.3.2.1 Cistatin F

Med naravne inhibitorje cisteinskih proteaz spadajo cistatini, tirofini, nekateri serpini in stefini. Cistatini predstavljajo veliko skupino evolucijsko sorodnih proteinov, ki delujejo kot inhibitorji cisteinskih proteaz papainske družine kot so katepsini B, H, L, S. Med cistatine tipa 1 uvrščamo stefina A in B. Cistatini so večinoma znotraj celice, signalni peptid jih usmeri v zunajcelični prostor.

Cistatin F se izraža v različnih tkivih, predvsem pa v celicah in tkivih imunskega sistema (timus, vranica, monociti, DC, T celice, NK celice). Sestavljen je iz 126 AK. Preprotein ima še 19 AK dolg signalni peptid in podaljšek iz 6 AK na N-terminalnem delu. Iz celice se sprosti

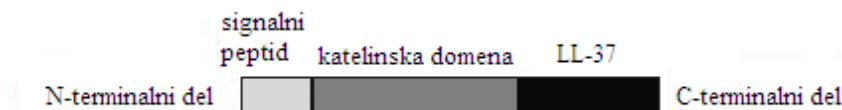
kot neaktivnen dimer, povezan z disulfidno vezjo. Neaktivnen ostane, dokler ne pride do redukcije vezi in sprostiteve monomernih oblik. Za inhibicijo je potrebna vezava na proteazo. Cistatin F močno inhibira katepsine F, K, L, in V. Katepsina S in H sta manj občutljiva, medtem ko katepsinov B in C ne inhibira (Kopitar-Jerala, 2006; Hamilton in sod., 2008).

2.3.2.2 E-64

E-64 (L-trans-epoksisukcinil-leucilamido(4-guanidino) butan (ang. L-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane) je ireverzibilni inhibitor cisteinskih proteaz. Na cisteinske ostanke drugih proteinov ne vpliva. Deluje tako, da reagira s tiolno skupino v aktivnem centru in tvori tioeter. Vnos v celico je enostaven, saj prehaja preko membrane (Barrett in sod., 1982).

2.3.3 PROTIMIKROBNI PEPTIDI IN LL-37

Človeški nevtrofilci vsebujejo dva tipa protimikrobnih peptidov - defenzine in LL-37. Defenzini so v nevtrofilcih v primarnih (azurofilnih) granulah. Človeški katelicidin hCAP-18, ki je prekurzor LL-37 pa najdemo v sekundarnih granulah. Izdelujejo ga tudi makrofagi in limfociti. Peptid LL-37 je bil učinkovit proti bakterijam kot so *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus* (Turner in sod., 1998).



Slika 8: Shema katelicidina hCAP-18.

Prekurzor peptida LL-37 je propeptid hCAP-18 in ga uvrščamo v družino katelicidinov. Ob napadu patogenih mikroorganizmov nevtrofilci sprostijo vsebino svojih granul. Proteini imajo

visoko ohranljeno zaporedje na N terminalnem delu. Ta del se imenuje katelinska domena. Biološko aktivna domena katelicidina oziroma LL-37 je na C terminalnem delu in je pozitivno nabita (kationska skupina). Aktiven LL-37 (iz 37 AK) nastane šele v zunajceličnem prostoru po cepitvi s proteinazo-3. Prekurzor hCAP-18 nastaja tudi epitelnih celicah. Ekspresija je odvisna od prisotnosti vnetnih citokinov (npr. IL-8) ali mikrobnih komponent (Sørensen in sod., 2001; Bowdish in sod., 2005).

2.3.4 VPLIV KATEPSINOV NA SIGNALIZACIJO

Pri raziskavah vpliva na signalizacijo CpG ODN preko TLR9 v celicah Ba/F3 (mišje B celice iz periferne krvi) so ugotovili, da se odziv na ligand ob transfekciji s posameznimi katepsini L, B, S in F poveča. Mutante katepsinov z mutacijo v aktivnem mestu tega vpliva nimajo. Za katepsina B in L so pokazali, da v primeru dodatka inhibitorja katepsinov ni prišlo do razgradnje proteina IRAK-1. Podobno so dokazali tudi na vraničnih B celicah, ki so jih tretirali z ligandi za TLR9 in TLR3. Opazili so, da ob prisotnosti inhibitorjev katepsinov ni prišlo do izražanja CD86 (ang. Cluster of Differentiation 86), ki je kostimulatorni signal za aktivacijo T celic (Matsumoto in sod., 2008).

Katepsin K se izraža tudi v dendritičnih celicah, a ne sodeluje pri predstavljanju antigenov tako kot katepsina L in S. Dokazali pa so, da je v primeru inhibicije katepsina K z inhibitorjem NC-2300 prišlo do zmanjšanega izražanja citokinov (interlevkina-12 in interlevkina-23), če so dendritične celice stimulirali CpG ODN. Ti rezultati kažejo, da katepsin K igra pomembno vlogo pri signalizaciji preko receptorja TLR9 (Asagiri in sod., 2008).

Pri DC iz kostnega mozga mišk z okvaro katepsina K, je ob stimulaciji s CpG DNK izražanje mRNK interlevkina-12 precej nižje kakor pri celicah divjega tipa. Podoben poskus so naredili tudi s poli(I:C). Razlika v izražanju mRNK INF-β med divjim tipom in v okvarjenih celicah je bila majhna. Izražanje mRNK INF-β se je zmanjšalo v primeru dodatka E-64. To kaže na to, da katepsin K ni nepogrešljiv za signalizacijo preko receptorja TLR3, ter da so v signaliziranju vpletene tudi druge proteaze (Asagiri in sod., 2008).

2.3.5 VPLIV LL-37 NA SIGNALIZACIJO PREKO TLR

Plazmacitoidne dendritične celice (pDCs) so populacija dendritičnih celic, ki so specializirane za zaznavanje virusnih in mikrobnih nukleinskih kislin v endosomih preko receptorjev TLR7 in 9. Te celice običajno ne zaznavajo lastne DNA, saj so lastne molekule prostorsko ločene, vsebujejo manj CpG motivov in so bolj metilirane. Zaznavanje lastne DNA je značilno za avtoimunska obolenja. Tako obolenje je na primer luskavica (ang. psoriasis). Do nastanka lahko pride zaradi fizične poškodbe kože. Na tem mestu pride do sprostitve lastne DNK iz poškodovanih celic v okolico. Ugotovili so, da se na obolelih delih kože v povečani meri izraža peptid LL-37. Na teh delih zagotavlja obrambo pred širokim spektrom okužb in delujejo kot naravni antibiotiki. Peptid LL-37 pa ima tudi sposobnost vezave nukleinskih kislin. Nanj se lahko veže sproščena lastna DNK. Agregati peptida in DNK, ki nastanejo zaradi elektrostatskih privlakov, z endocitozo pridejo v zgodnje endosome, kjer sprožijo izražanje interferonov tipa 1 (Lande in sod., 2007).

2.3.6 SENZBILIZACIJA

Znano je, da prihaja pri signalizaciji preko receptorjev TLR do vpliva stimuliranega receptorja na lokalizacijo ali izražanje sorodnega receptorja. Na tak način se poveča občutljivost celic imunskega odziva na ligande sorodnih receptorjev, obenem pa predstavlja nevarnost za razvoj pretiranega odziva (Pestka in Zhou, 2006).

Ligandi receptorjev TLR se zaradi učinkov na imunski sistem uporablajo kot adjuvansi, ki ojačajo odgovor citotoksičnih T limfocitov na različne tipe cepiv proti raku (Celis, 2007).

Bakterijski lipoprotein je ligand za receptor TLR2. LPS, INF- γ in TNF- α povečajo izražanje TLR2 v žilnih epitelijskih celicah. Vplivajo pa tudi na ekspresijo receptorja TLR4. Receptorja torej delujeta sinergistično in preko povratne zanke lahko vodita v prekomern odziv (Faure in sod., 2001). Aktivacija TLR4 z LPS povzroči izražanje večje količine receptorja TLR2 (Lin in sod., 2000). Občutljivost na LPS se poveča tudi ob virusni okužbi ali ob simulaciji virusne okužbe z dodatkom poli(I:C). Miške, okužene z virusom, so bile bolj občutljive na LPS in na endotoksinski šok (Nansen in Thomsen, 2001).

Glede na to, da sta receptorja TLR3 in TLR9 sorodna, da sta v istih celičnih razdelkih in da je podoben tudi prehod med ER in endosomi, smo predvidevali, da bi stimulacija enega receptorja lahko vplivala tudi na premik drugega receptorja v endosome.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 KEMIKALIJE

Preglednica 1: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti, uporabljeni v diplomskem delu.

Proizvajalec	Kemikalije
Amersham	nitrocelulozna membrana Hybond ECL – 0,45 µm, ECL reagent
BioWhittaker	FBS
Coley Pharmaceutical Group	ODN 10104
Fermentas	DNK-standardi: Gene Ruler DNA Ladder (Low Range), lambda D NK, proteinski standard: Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder
Fluka	Ponceau-S, SDS, DMSO
Ilford	razvijalec in fiksir
Invitrogen	DMEM + GlutaMAX™-I, D NK-polimeraza AccuPrime Pfx, 10-kratni AccuPrime Pfx pomnoževalni pufer, Opti-MEM I medij brez seruma (1-kratni), transfekcijski reagent Lipofectamine 2000, coelenterazine, restrikcijski pufer REact 2, penicilin/streptomycin, Alexa Fluor 633® hydrazide, Transferrin – Alexa Fluor ® 633 konjugat, Transferrin – Alexa Fluor ® 546 konjugat, Lysotracker® Red, 5-kratni pufer za hitro ligacijo blasticidin S (10 mg/ml), Fast-Media Blas agar, poli(I:C) - (Poly(cytidylic-inosinic) acid)
InvivoGen	film in kaseta za filme(Kodak X-omat AR Film XAR-5, Kodak X-omat LS Film, Kodak BioMax Cassette)
Kodak	Triton X-100
LKB BROMMA	etanol, metanol, izopropanol, NaCl, NaOH, ocetna kislina, bakteriološki agar
Merck	restrikcijski encimi (<i>Age</i> I, <i>Bam</i> HI <i>Hind</i> III, <i>Xba</i> I), D NK-ligaza T4
New England Biolabs	komercialno dostopni kompleti za izolacijo plazmidne D NK z nizko vsebnostjo endotoksina UltraMobius Plasmid Kit 200, transfekcijski reagent GeneJuice
Novagen	komercialno dostopni kompleti za čiščenje D NK (QiaQuick PCR Purification Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit, MinElute Gel Extraction Kit)
Qiagen	začetni oligonukleotidi
Operon	

se nadaljuje

Pohar J. Vloga proteolize v signalizaciji dvoverižne RNK preko Toll-podobnega receptorja 3.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2008

nadaljevanje Preglednica 1: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti, uporabljeni v diplomskem delu.

Proizvajalec	Kemikalije
Pierce	kemiluminiscentni substrat Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate
Promega	2-kratni hitri ligacijski pufer, 10-kratni restrikcijski pufer Multicore, 5-kratni lizni pufer, luciferin
Roche	koktail proteaznih inhibitorjev v obliki tabletk (Complete Mini)
Sigma	komercialno dostopni komplet za izolacijo plazmidne DNK (GenElute Plasmid Miniprep Kit), akrilamid, N,N'-metilen-bis-akrilamid, agarosa, bromfenolmodro, gojišče LB po Millerju, TEMED, EDTA, EGTA, ampicilin, amonijev persulfat, Tris, etidijev bromid, raztopina Tripsin EDTA (1-kratna), dNTP, Tween 20, DOC, Na ₂ HPO ₄ , SDS, Na ₃ VO ₄ , glicin, NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O, glukoza, glicerol, β-merkaptoetanol, , NaIO ₄ , NaOAc, DEPC, Bicinchoninic Acid Solution, bakrov (III) sulfat pentahidrat 4- odstotna raztopina (v/v), E-64
Spectrum Laboratories	Spectra/Por3 dializna membrana
Tropix	I-BLOCK
W. M. Keck	peptid LL-37
Biotechnology Resource Center	free- LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES-cooh 4494.34 g/mol 113,8 mg

3.1.2 UPORABLJENE RAZTOPINE, PUFRI IN STANDARDI

Preglednica 2: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri detekciji proteinov.

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
Lizni pufer (RIPA)	50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 0,5 % DOC, 1X CPI. Najprej naredimo dvakratni pufer (5 ml) in ga redčimo s 5 ml destilirane vode, v kateri smo raztopili tabletko s proteaznimi inhibitorji (Roche).
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-merkaptoetanol, 0,8 ml 1-odstotnega bromfenolmodrega, 1,2 ml MQ

se nadaljuje

Pohar J. Vloga proteolize v signalizaciji dvoverižne RNK preko Toll-podobnega receptorja 3.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2008

nadaljevanje Preglednica 2: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri detekciji proteinov.

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
10-odstotni ločitveni gel	5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 8 ml MQ, 6,6 ml 30-odstotnega akrilamid/bisakrilamida, 200 µl 10-odstotnega SDS, 100 µl 10-odstotnega APS, 10 µl TEMED (navedeno za 2 gela)
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/bisakrilamida, 50 µl 10-odstotnega SDS, 25 µl 10-odstotnega APS, 5 µl TEMED (navedeno za dva gela)
10-kratni elektroforezni pufer z SDS	30 g Tris, 10 g SDS, 144 g glicina, dopolnimo do 1 l z dH ₂ O. Pred elektroforezo pufer 10-krat redčimo z dH ₂ O.
Pufer za mokri prenos proteinov na membrano pH 8,3	3,03 g Tris, (25mM) 14,4 g glicina (192 mM), 200 ml (20% v/v) metanola, dopolnimo z dH ₂ O do 1 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	1 X PBS (sestava kot pri raztopini za spiranje), 0,01 % Tween 20, 0,2 % I-BLOCK
10-kratna raztopina Ponceau	2 % (m/v) raztopina Ponceau-S, 30 % (m/v) CCl ₃ COOH, 30 % (m/v) sulfosalicilna kislina
10-kratni PBS	0,58 M Na ₂ HPO ₄ , 0,17M NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O, 0,68 M NaCl
Page Ruler TM Plus Prestained Protein Ladder	vsebuje proteine velikosti 250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa, 11 kDa

Preglednica 3: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri izdelavi DNK-konstruktov, pri merjenju luciferažne aktivnosti ter pri delu v celičnem laboratoriju.

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 uravnamo na 8.
6-kratni nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	0,25 % bromfenolmodro, 0,25 % ksilencianol, 40 % (w/v) glukoze v dH ₂ O.
Pufer 1 Mini Prep	50 mM glukoza, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)
Pufer 2 Mini Prep	0,2 M NaOH, 1 % SDS

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 3: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri izdelavi DNK-konstruktov, pri merjenju luciferazne aktivnosti ter pri delu v celičnem laboratoriju.

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
pufer 3 Mini Prep	5 M kalijev acetat, CH_3COOH
pufer TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
zmes dNTP	1,25 mM ATP, 1,25 mM CTP, 1,25 mM GTP, 1,25 mM TTP
standard λ EcoRI/HindIII	vsebuje DNK velikosti 21.226 bp, 5.148 bp, 4.973 bp, 2.027 bp, 1.907 bp, 1.584 bp, 1.375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp
LUC-pufer (pufer za merjenje luciferazne aktivnosti)	LUC-pufer: 2,38 g HEPES (16,67mM), 0,38 g MgCl_2 (3,33mM), 0,06 g EGTA (0,08mM)-Na raztopiš v 100 ml dH ₂ O, uravnaš pH na 7,8 in dodaš še 0,08 g NaF. (1,67mM) Poleg 2,6 ml LUC pufra dodamo še DDT (16,67mM), ATP (0,44mM), coA (0,23mM) in MQ do 13 ml. Luciferin (0,39mM) raztopimo v DMSO in ga dodamo pufru. V oklepajih so navedene končne koncentracije sestavin v raztopini, ki smo jih uporabljali pri merjenju.
RENILLA-pufer (pufer za merjenje luciferazne aktivnosti)	2,6 ml 5-kratnega Renilla-pufra (3,346 g Na pirofosfat (7,50mM), 6,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (50,00 mM), 14,5 g NaCl (250,00 mM), 1,822 g CDTA (5,0mM), 5 ml metanol (0,01 l/l), pH uravnamo na 5,0), MQ do 13 ml. Coelenterazin (0,001mM) raztopimo v metanolu in ga dodamo pufru. V oklepajih so navedene končne koncentracije sestavin v raztopini, ki smo jih uporabljali pri merjenju.
10-kratni PBS (za celični laboratorij)	100 g NaCl, 2,5 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 , 2,5 g KH_2PO_4 , dodamo MQ do 1 l, pH uravnamo na 7,4.
0.5 M NaOAc	4,102 g NaOAc raztopimo v destilirani vodi, z ocetno kislino uravnamo pH na 5.5 ter dopolnimo z vodo do 100 mL.
oksidacijska raztopina	42.78 mg NaIO ₄ , 10 mL 0.1 M NaOAc

3.1.3 LABORATORIJSKA OPREMA

Preglednica 4: 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 DNK
BioTek	spektrofotometer mikrotiterskih plošč PowerWave XS in pripadajoč računalniški program KC Junior
Blau Brand	Bürker-Türkova števna komora
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture
Berthold Technologies	Mithras LB 940 - optični čitalnik mikrotitrskih plošč z injektorjem in pripadajoči računalniški program MikroWin 2000
Chemass	spektrofotometer in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
Corbett Research	Gradient Palm-Cycler
Eppendorf	avtomatska pipeta 0,1–2,5 µl, namizna centrifuga MiniSpin, centrifuga 5415R 5 ml, 1 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl pipete
Gilson	centrifuga Universal 32R
Hettich	komorice za mikroskopiranje z 8 luknjicami: µ-Slide 8 well
Ibidi	parni sterilizator A-500/700
Kambič	konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 Leica Microsystems, z laserskimi črtami 405, 458, 476, 488, 514, 543, 633 in pripadajoč računalniški program LAS AF 1.8.0. Leica Microsystems
Moulinex	mikrovalovna pečica SYBIO
Sartorius	tehnicka Analytic 1712 MP8
Savant	vakuumska centrifuga SpeedVac
Tehnica Železnik	tehnicka ET-1111
Tekmar	sonikator (Tekmar Sonic Disruptor)
Thermo Scientific	centrifuga Sorvall RC5C Plus, Nano Drop 1000 in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov

3.1.4 UPORABLJENA PROTITELESA

Preglednica 5: Protitelesa, uporabljena v diplomskem delu.

primarna protitelesa proti TLR3	mišja monoklonska protitelesa proti TLR3 (Imgenex)
primarna protitelesa proti zelenemu	zajčja poliklonska protitelesa proti zelenemu
fluorescentnemu proteinu (GFP)	fluorescentnemu proteinu - GFP (Invitrogen)
poliklonska sekundarna protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	kozja poliklonska protitelesa proti mišjim protitelesom
poliklonska sekundarna protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	kozja poliklonska protitelesa proti zajčjim protitelesom IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Abcam)

3.1.5 UPORABLJENI PLAZMIDI

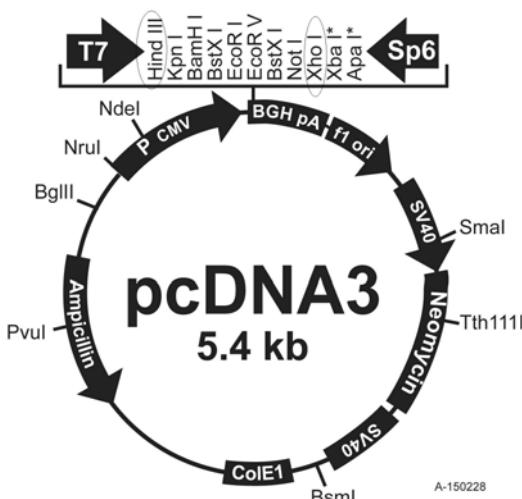
Preglednica 6: Plazmidi, uporabljeni v diplomskem delu.

Vir	Plazmid
Hiscott - darilo	pIFN β -Fluc- sesalčji vektor z od IFN- β odvisnim promotorjem, sledi mutacija za kresničkino luciferazo
pripravljen za potrebe naloge	phTLR3-mCer v pCDNA3
pridobljeno preko baze AddGene (dr. Doug Golenbock)	phTLR9-YFP v pcDNA3
InvivoGen	pUNO-hTLR3 z zapisom za človeški receptor TLR3 in rezistenco na antibiotik blasticidin, pUNO-hTLR9-HA z zapisom za človeški receptor TLR9 in rezistenco na antibiotik blasticidin
Invitrogen	pcDNA3
dr. David Piston - darilo	mCerulean-C1
OriGen	pCAMP z zapisom za človeški katelicidin protimikrobnih peptidov, pCST7 z zapisom za človeški cistatin F, pCTSL1 z zapisom za človeški katepsin L1, pCTSS z zapisom za človeški katepsin S, pCTSK z zapisom za človeški katepsin K. Vsi plazmidi imajo rezistenco na ampicilin. Osnovna vektorja, kamor so vstavljeni cDNA kloni sta pCMV6-XL4 in pCMV6-XL5.
Promega	phRL-TK (<i>Renilla</i> luciferazni poročevalni vektor)

Za izražanje proteinov v celicah smo uporabili različne plazmidne sisteme, ki pa so imeli nekaj skupnih značilnosti: ORI (ang. Origin of Replication) mesto za pomnoževanje plazmida v *E.coli*, determinanto za odpornost proti antibiotiku, ki omogoča selekcijo bakterijskih transformant, promotor za začetek transkripcije v človeških celicah in poli(A) signal.

- **pcDNA3**

Vektor vsebuje zapis za β -laktamazo, kar omogoča selekcijo bakterij v gojišču z ampicilinom. Prav tako nosi pcDNA3 zapis za promotor citomegalovirusa (na sliki 9 označen kot P CMV), ki omogoča konstitutivno izražanje gena za njim. V tem vektorju smo sestavili tudi konstrukt hTLR3-mCer.

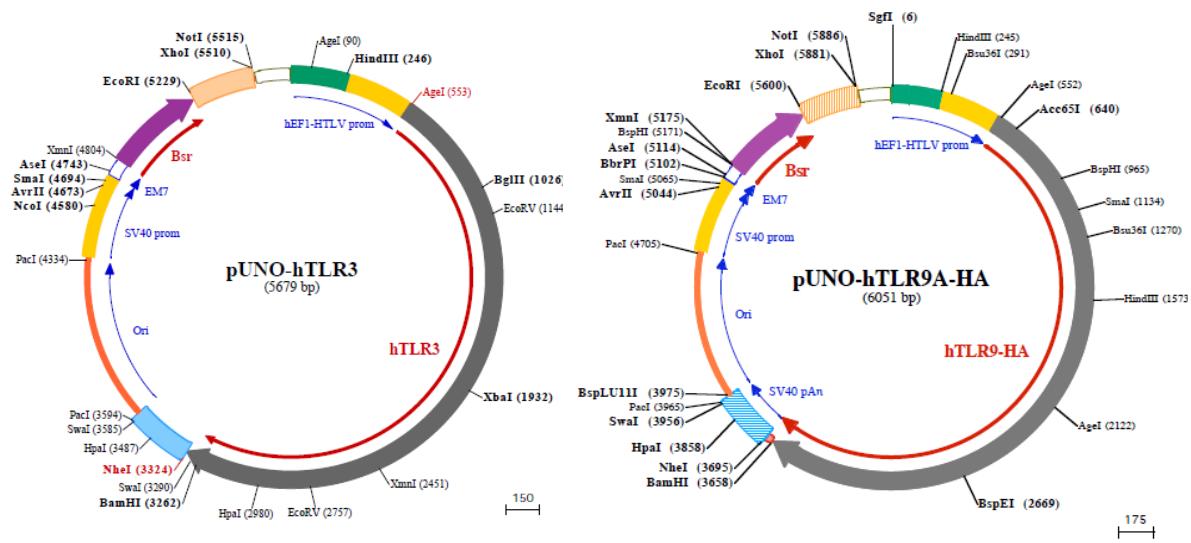


Slika 9: Shema vektorja pcDNA3. Na sliki sta obkroženi tudi restriktijski mesti, s pomočjo katerih smo vektor linearizirali za potrebe sestavljanja konstrukta hTLR3-mCer.

- **pUNO-hTLR3 in pUNO-hTLR9-HA**

Plazmida pUNO-hTLR3 in pUNO-hTLR9-HA (slika 10) imata v zapisu gen *bsr* iz *Bacillus cereus*, ki kodira deaminazo za odpornost proti antibiotiku blasticidinu S. Ekspresija insertov

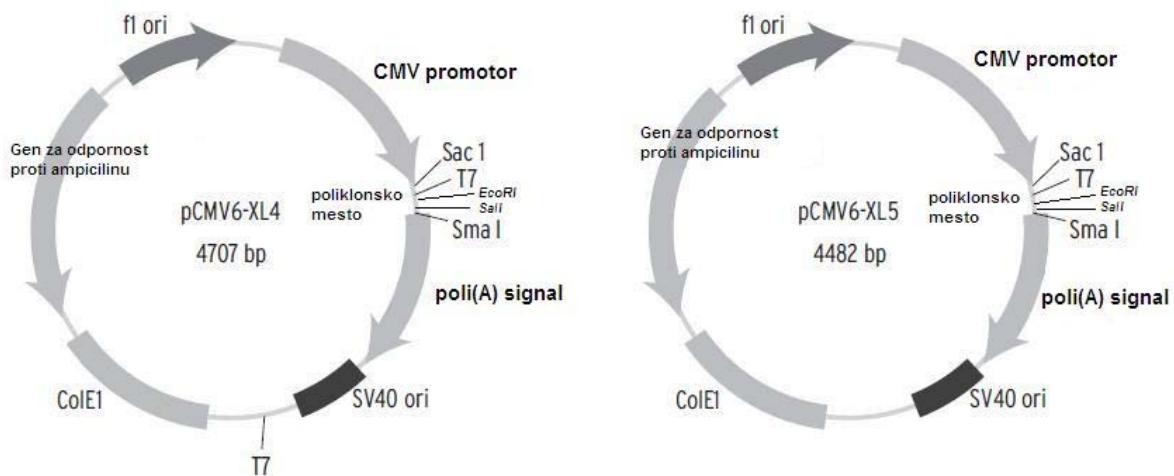
hTLR3 in hTLR9-HA je pod kontrolo promotorja EF-1/HTVL. EF-1 je elongacijski faktor, ki je eden izmed visoko izraženih proteinov v evkariontskih celicah. EF-1 promotor ima višjo aktivnost in trajnejšo ekspresijo *in vivo* kot virusni promotorji. Drug del promotorja predstavlja zapis U5 sekvence človeškega virusa za T-celično levkemijo (tj. HTVL, ang. Human T-Cell Leukemia Virus). Ta del promotorja poveča stabilnost DNA in RNA.



Slika 10: Shema plazmidov pUNO-hTLR3 in pUNO-hTLR9-HA.

- pCMV6-XL4 in pCMV6-XL5

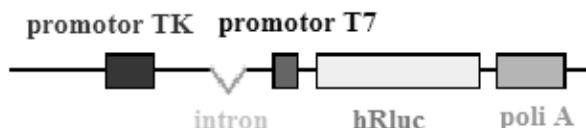
Na sliki 11 sta predstavljena vektorja, v katera so vstavljeni cDNA inserti z zapisi za človeške katepsine L1, S in K (CTSL1, CTSS, CTSK), katelicidin protimikrobní peptid hCAP-18 (CAMP) in cistatin F (CST7). CTS1, CAMP in CTSS so vstavljeni v vektor pCMV6-XL4, CTSS in CTSK pa v v vektor pCMV6-XL. Insert cDNA je vstavljen med restriktijski mesti *Eco*RI in *Sal*I v poliklonskem mestu. Po vstavljanju se mesto *Sal*I ne ohrani. Izražanje je pod kontrolo CMV promotorja. Insertu sledi poli(A) signal človeškega rastnega faktorja. SV40 promotor zagotavlja podvojevanje v sesalskih celicah. Na plazmidih je tudi gen za odpornost proti ampicilinu.



Slika 11: Shema vektorjev, v katere so vstavljeni cDNA inserti z zapisi za človeške katepsine L1, S in K (CTSL1, CTSS, CTSK), katelicidin protimikrobnih peptid (CAMP) in cistatin F (CST7).

• pHRL-TK

Delna zgradba plazmida pHRL-TK je prikazana na sliki 12. Gen *hRluc* kodira luciferazo, ki izvira iz koralnjaka *Renilla reniformis*. Izražanje gena za luciferazo je pod vplivom konstitutivno aktivnega promotorja timidin kinaze herpes simpleks virusa (HSV-TK). Plazmid smo uporabljali pri dvojnem luciferaznem testu.



Slika 12: Shematski prikaz dela plazmida pHRL-TK. Plazmid ima zapis za konstitutivno izražanje Renilla luciferaze v sesalčjih celicah.

- **IFN- β -FLUC**

Za od INF- β (interferon) inducibilnim promotorjem je zapis za luciferazo iz kresničke (Fluc). Protein se začne izražati, ko je aktivirana signalna pot preko TLR3. Plazmid smo uporabljali pri dvojnem luciferaznem testu.

- **phTLR3-mCer in phTLR9-YFP**

Plazmida, ki sta izražala s fluorescentnima proteinoma (mCerulean in rumeni fluorescentni protein – YFP) označena človeška TLR receptorja, smo uporabljali pri mikroskopiranju. Oba konstrukta sta v vektorju pCDNA3.

- **pmCerulean-C1**

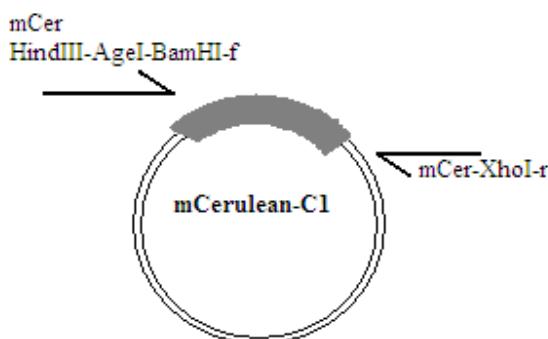
Plazmid smo uporabljali za pomnoževanje zapisa za fluorescentni protein mCerulean za izdelavo konstrukta hTLR3-mCer ter za kotransfekcijo pri preverjanju proteinske sinteze. Gen je pod kontrolo konstitutivnega promotorja CMV. Insertu sledi poli(A) signal človeškega rasnega faktorja. SV40 promotor zagotavlja podvojevanje v sesalskih celicah. Na plazmidih je tudi gen za odpornost proti kanamicinu in neomicinu.

3.1.6 OLIGONUKLEOTIDI ZA VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO

Preglednica 7: Oligonukleotidi, uporabljeni v diplomskem delu.

Oznaka oligonukleotida	Kratka oznaka oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje
mCer HindIII-	P870	5' - TCCCAAGCTTACCGGTGCCGCGGATCCAAAAACTCGGTA
AgeI-BamHI-f		ATATGGTGAGCAAGGGCGAG -3'
mCer-XhoI-r	P871	5' - ACCGCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCC -3'

Začetna nukleotida smo uporabili za pomnoževanje gena za fluorescentni protein mCerulean iz plazmida pmCerulean-C1. Z oligonukleotidnimi začetniki smo na 5' konec uvedli *HindIII*, *AgeI* in *BamHI*, na 3' konec pa *XhoI* restriktionsko mesto. Ta produkt smo nato uporabili pri sestavljanju konstrukta hTLR3-mCer. Pomnoževanje je potekalo s polimerazo AccuPrime *Pfx*. Sestava reakcije in pogoji so navedeni v preglednicah 14 in 15. Čas pomnoževanja je bil 45 sekund. Pričakovana velikost fragmenta po reakciji je bila 720 bp.



Slika 13: Shema načrtovanja pomnoževanja gena za mCerulean. Začetni oligonukleotidi so označeni s polovičnimi puščicami. V imenu začetnega nukleotida so zajeta tudi restriktionska mesta, ki smo jih uvedli.

3.1.7 ORGANIZMI

3.1.7.1 Bakterijski sevi

Preglednica 8: Uporabljen sev bakterije *Escherichia coli*.

Sev	Genotip	Vir
DH5 α	F $^-$ supE44, $\Delta lacU169 (\phi 80 lacZ\Delta M15) hsdR17$ $recA1 endA1 gyrA96, thi-1, relA1$	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana

3.1.7.2 Celične kulture

Preglednica 9: Uporabljene celične kulture.

Celična kultura	Vir
HEK293	Carsten Kirschning (Tehnična Univerza München)
HEK293T	Jerrol Weiss (Univerza Iowa)

Celične kulture HEK293 so enostavne za gojenje in transfekcijo. Uporabljajo se za raziskovanje signalnih poti receptorjev TLR saj ne izražajo receptorjev. Celice imajo celotno znotrajcelično signalno pot, zato jih je mogoče po transfekciji z zapisom za posamezne receptorje selektivno aktivirati.

3.1.8 GOJIŠČA

3.1.8.1 Gojenje *E. coli*

Za gojenje bakterije *E. coli* smo uporabljali gojišče Luria-Bertani (LB). Za selekcijo uspešno transformiranih bakterij smo uporabljali antibiotik ampicilin ali blasticidin.

Preglednica 10: Tekoče gojišče LB za bakterije.

Kemikalija	Količina
gojišče LB po Millerju	25 g/l

- Tekoče gojišče LB smo pripravili tako, da smo gojišče LB raztopili v destilirani vodi in ga v primerni steklovini sterilizirali. Pred inokulacijo smo po potrebi v gojišče dodali še antibiotik ampicilin v končni koncentraciji 50 µg/ml ali blasticidin v končni koncentraciji 100 µg/ml. Nacepljeno gojišče smo 16 ur inkubirali na stresalniku pri 37 °C ter 180 vrt./min.

Preglednica 11: Trdno gojišče LB za bakterije.

Kemikalija	Količina
gojišče LB po Millerju	25 g/l
Agar	15 g/l

- Trdno gojišče LB smo pripravili podobno kot tekoče gojišče, dodali smo mu še agar v končni koncentraciji 1,5 %. Po sterilizaciji smo ohlajenemu gojišču (približno 50 °C) dodali ampicilin v končni koncentraciji 50 µg/ml in ga razlili v sterilne plastične petrijevke. Uporabili smo jih takoj, ko so se strdile, ali pa jih sterilne do uporabe shranili pri 4 °C. Trdno gojišče smo nacepili s tekočo kulturo vcepka in ga razmazali po plošči s sterilno spatulo. Nacepljene plošče smo inkubirali 16 ur pri 37 °C.
- Za izdelavo trdnega gojišča z blasticidinom, smo uporabili že pripravljeno gojišče Fast-Media Blas agar (Invivogen), ki vsebuje LB gojišče, agar ter antibiotik. Za pripravo gojišča iz ene vrečke smo v borosilikatni steklenici (500 ml) najprej sterilizirali 200 ml destilirane vode. Ko se je voda ohladila, smo v steklenico pretresli vsebino ene vrečke medija in premešali. Steklenico smo nato segreli v mikrovalovni pečici, da se je gojišče zbistrilo. Ohlajeno gojišče smo razlili v sterilne plastične petrijevke. Uporabili smo jih takoj, ko so se strdile, ali pa jih sterilne do shranili pri 4 °C. Uporaba, inokulacija in inkubacija so enake kot pri trdnem gojišču LB.

3.2 METODE

3.2.1 STERILIZACIJA RAZTOPIN, GOJIŠČ IN STEKLOVINE

Ves potreben material za gojenje celičnih kultur in bakterije *E. coli* smo predhodno sterilizirali po standardnih postopkih:

- sterilizacija v avtoklavu z vlažno toploto, 20 minut pri 121°C in $1,2 \cdot 10^5 \text{ Pa}$,
- temperaturno občutljive snovi smo sterilizirali s filtriranjem, preko filtra s premerom por $0,2 \mu\text{m}$.

3.2.2 OSNOVNE METODE MOLEKULARNEGA KLONIRANJA

Večina uporabljenih metod, je opisanih v priročnikih s tega področja (Ausubel in sod., 2002; Sambrook in sod., 1989). Podrobno so v nadaljevanju opisane najpomembnejše.

3.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Vse PCR reakcije smo izvedli v volumnu $50 \mu\text{l}$. Uporabljali smo DNK-polimerazo AccuPrime *Pfx*. Vsebina reakcijske mešanice ter temperaturni program pomnoževanja sta opisana v preglednicah 12 in 13.

Preglednica 12: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNK-polimerazo AccuPrime *Pfx*.

Komponenta	Založna koncentracija	Koncentracija v PCR-epici	V
matrična DNK	10 ng/ μl	0,1 ng/ μl	1 μl
začetni oligonukleotid 1	20 pmol/ μl	0,4 pmol/ μl	1 μl
začetni oligonukleotid 2	20 pmol/ μl	0,4 pmol/ μl	1 μl
10-kratni pomnoževalni pufer za polimerazo AccuPrime <i>Pfx</i>	10 X	1 X	5 μl
polimeraza AccuPrime <i>Pfx</i>	2,5 U/ μl	0,05 U/ μl	1 μl
MQ			41 μl
Končni volumen			50 μl

Preglednica 13: Temperaturni program PCR pri uporabi DNK-polimeraze AccuPrime *Pfx*.

Stopnja		Temperatura	Čas
1.	začetna denaturacija	95 °C	2 min
2. 30 ciklov	denaturacija	95 °C	15 s
	prileganje	55 °C	30 s
	podaljševanje	68 °C	1 min za 1kb
3.	zaključno podaljševanje	68 °C	7 min
4.	zaključek reakcije	4 °C	neskončno

Temperaturo prileganja (T_m , ang. melting temperature) smo ocenili s spodnjo enačbo, ki velja le za zelo kratke kose DNK:

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

* G, C, A, T pomenijo število nukleotidov določene baze v začetnem oligonukletidu.

Po končani reakciji smo rezultate preverili z agarozno elektroforezo.

3.2.2.2 Elektroforeza DNK na agaroznem gelu

Za analizo pridobljenih vzorcev DNK smo uporabili agarozne gele. Koncentracija agaroze v gelu je bila odvisna od velikosti pričakovanih fragmentov. Običajno smo uporabili 1,2-odstotni (m/v) gel, za ločevanje velikih fragmentov pa redkejšega. Ustrezno količino agaroze smo raztopili v 100 ml 1-kratnega pufra TAE s segrevanjem v mikrovalovni pečici, ohladili na 60 °C, dodali 2 µl EtBr (10 g/l) ter vlili v pripravljeno kadičko za elektroforezo. Ko se je gel strdil, smo v žepke nanesli vzorce DNK:

- PCR-produkтом in restriktionskim mešanicam smo dodali 1/6 končnega volumena 6-kratnega nanašalnega pufra za agarozno elektroforezo. Poleg vzorcev smo na gel dodali še velikostni standard.

- Vzorcem, katerim smo preverjali koncentracijo, smo dodali 1-kratni nanašalni pufer za agarozno elektroforezo. Poleg vzorcev smo na gel nanesli še mešanice 1-kratnega nanašalnega pufra za agarozno elektroforezo in znane koncentracije ($10 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $20 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ in $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$) DNK-bakteriofaga lambda. Tako smo lahko ocenili približno koncentracijo DNK v naših vzorcih.

Elektroforeza je potekala v 1-kratnem pufru TAE pri konstantni napetosti 100 V. Gel smo nato osvetlili z UV-svetlogo in fotografirali.

3.2.2.3 Čiščenje pomnožkov PCR po verižni reakciji s polimerazo

Del pomnožka PCR smo po verižni reakciji s polimerazo preverili z agarozno elektroforezo, ostalo pa smo očistili s komercialno dostopnim kompletom QiaQuick Nucleotide Removal Kit. Postopek čiščenja je potekal po navodilih proizvajalca; temelji na selektivni adsorbiciji pomnožka PCR na kolono, nečistoče kot so polimeraza, začetni oligonukleotidi itd., pa speremo. Na koncu sledi še izpiranje vezane DNK z MQ v sterilno mikrocentrifugirko.

3.2.2.4 Izolacija fragmentov DNK iz agaroznih gelov

Za izolacijo fragmentov DNK iz agaroznih gelov smo uporabili komercialno dostopen komplet MinElute Gel Extraction Kit. Gel smo prenesli na površino, pod katero je UV žarnica in presvetlili gel. Želeni fragment smo s skalpelom izrezali iz agaroznega gela in ga prenesli v mikrocentrifugirko. Izolacijo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Najprej je potrebno raztopiti agarozni gel in mešanico nato spustiti preko kolone, na katero se vežejo nukleinske kisline. Po vezavi DNK sledi spiranje nečistoč in na koncu izpiranje vezane DNK z MQ v sterilno mikrocentrifugirko.

3.2.2.5 Cepitev DNK z restrikcijskimi encimi

Cepitve DNK z restrikcijskimi endonukleazami smo uporabili pri pripravi fragmentov, ki smo jih namnožili z verižno reakcijo s polimerazo, pri pripravi linearnih plazmidnih vektorjev in pri rezanju fragmentov iz vektorjev.

Restrikcijske zmesi so vsebovale:

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

Restrikcijsko zmes smo inkubirali 2 uri pri 37 °C. Po restrikciji smo restrikcijsko mešanico zmrznili in tako ustavili reakcijo, ali pa smo jo takoj nanesli na agarozni gel, iz katerega smo nato izrezali in očistili izbrani fragment.

PCR produkt mCerulean smo rezali hkrati z dvema restrikcijskima encimoma *Hind*III (reže na mestu A/AGCTT) in z *Xba*I (reže na mestu T/CTAGA) hkrati, zato smo uporabili pufer REact 2. Aktivnost obeh encimov je v tem pufru enako dobra. Ta dva encima smo uporabili tudi pri odpiranju vektorja pCDNA3 v poliklonskem mestu.

Vektor pUNO-hTLR3 smo rezali z *Age*I, *Bam*HI in *Nco*I tako, da je izpadel 2709 bp dolg fragment z zapisom za človeški receptor TLR3. Encim *Nco*I smo uporabili, ker bi z rezanjem z *Age*I in *Bam*HI dobili 3 fragmente velike 463 bp, 2503 bp in 2709 bp. Slednja dva je na gelu težko ločiti, zato smo poiskali še eno restrikcijsko mesto, ki reže v fragmentu dolgem 2503 bp. Za rezanje smo uporabili pufer Multicore, v katerem *Bam*HI reže slabše, zato smo ga dodali dvakratno količino encima *Age*I. Encim *Nco*I v tem pufru reže enako dobro kot *Age*I. Produkte restrikcije smo preverili na agaroznem gelu.

Rezan PCR produkt mCerulean smo ligirali v odprt vektor pcDNA3. Na novo pridobljeni vektor mCerulean-pcDNA3 smo ponovno odprli, tokrat z restriktionskima encimoma z *AgeI* in *BamHI*. Odprt vektor smo izrezali iz gela, očistili ter nastavili ligacijo z očiščenim fragmentom hTLR3 rezanim z *AgeI* in *BamHI*.

Po transformaciji smo izolirali plazmid. Sledila je kontrolna restrikcija (z encimoma *AgeI* in *BamHI*), s katero smo preverili, ali se je gen za človeški TLR3 res vstavil v rezan vektor. V primeru uspešne ligacije je iz vektorja izpadel 2709 bp dolg fragment.

3.2.2.6 Ligacija

Ključni korak pri genskem kloniranju je vstavljanje gena v plazmidni vektor. Produkte PCR smo pripravili kot restriktionske fragmente z dvema različnima restriktazama, ki režeta vsaka na drugi strani gena in ustvarita značilne lepljive konce. Ti lepljivi konci se potem med ligacijo združijo s komplementarnimi konci plazmidnega vektorja, ki je bil lineariziran z enakima encimoma. Za uspešno ligacijo je pomembno ustrezeno molarno razmerje med vektorjem in insertom (fragmentom). Potrebno maso fragmenta izračunamo po spodnji enačbi, kjer upoštevamo molarno razmerje fragment : vektor = 3 : 1 ter njuno dolžino (v bp). Za maso vektorske DNA smo večinoma izbrali 100ng.

$$\text{masa (fragment)} = \frac{\text{masa(vektor)} \times \text{dolžina(fragment)}}{\text{dolžina(vektor)}} \times 3 \quad \dots (2)$$

Ligacijske mešanice so vsebovale:

- izračunano količino fragmenta,
- izbrano količino vektorske DNK (običajno 100 ng),
- 1 µl DNK-ligaze T4 (400 U/µl),
- 4 µl 5-kratnega hitrega ligaznega pufra,
- sterilno MQ do končnega volumena 20 µl.

Ligacija je potekala 30 minut pri sobni temperaturi. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 30 µl MQ, nato pa smo mešanico zamrznili.

3.2.2.7 Kemijska transformacija kompetentnih celic *E. coli DH5α*

Za vnos plazmida oziroma rekombinantnega plazmidsa v bakterijske celice *E. coli DH5α* smo uporabili metodo s topotnim šokom. Kompetentne bakterijske celice (shranjene pri -84 °C) smo odtalili na ledu, jim dodali 25 µl ligacijske mešanice oziroma izbrano količino plazmidne DNK (običajno 10 ng) ter inkubirali na ledu 25 do 30 minut. Sledil je topotni šok z inkubacijo 4 minute pri 42 °C. Mikrocentrifugirko s transformacijsko zmesjo smo nato vrnili na led za 2 minuti. Potem 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 minute pri 7.000 vrt./min, usedljino celic smo nato resuspendirali v manjšem volumnu supernatanta in jo razmazali na trdno gojišče LB z ustreznim antibiotikom in inkubirali 16-18 ur pri 37 °C.

3.2.2.8 Izolacija plazmidne DNK

3.2.2.8.1 Izolacija plazmidne DNK v manjših količinah – mini prep

Izbrane kolonije smo s plošče LB z ustreznim antibiotikom precepili v stekleničke z 10 ml tekočega gojišča LB, mu dodali antibiotik in stresali 16-18 ur pri 37 °C in 150 vrt./min. Nato smo 1,5 ml kulture odpipetirali v sterilne mikrocentrifugirke in centrifugirali 30 sekund pri 10.000 vrt./min, odstranili supernatant ter pelet resuspendirali v 100 µl pufra 1. Nato smo celice lizirali z 200 µl pufra 2, petkrat obrnili mikrocentrifugirko in 1 minuto inkubirali na ledu. Pufer 2 smo nevtralizirali s 150 µl pufra 3, premešali na vibracijskem mešalu z narobe obrnjenimi mikrocentrifugirkami in 5 minut inkubirali na ledu. Mešanico smo centrifugirali 5 minut pri 10.000 vrt./min in nato supernatant s plazmidno DNK prenesli v sveže mikrocentrifugirke. DNK smo iz supernatanta oborili z dodatkom 2-kratnega volumna absolutnega etanola, ohlajenega na -20 °C. Po dveh minutah inkubacije pri sobni temperaturi

smo oborjeno DNK zbrali s centrifugiranjem pri 10.000 vrt./min 5 minut in usedlino sprali z 0,5 ml na -20 °C ohlajenega 70-odstotnega etanola in ponovno centrifugirali 5 minut pri 10.000 vrt./min. Supernatant smo odstranili, oborino pa posušili in jo nato raztopili v 20 µl pufra TE, ki smo mu dodali RNazo. Tako izolirano DNK smo uporabljali le za kontrolne restrikcije, saj je za večino ostalih postopkov premalo čista.

3.2.2.8.2 Izolacija plazmidne DNK s komercialno dostopnim kompletom

Za pridobivanje čistejše plazmidne DNK smo uporabili komercialno dostopen komplet GenElute Plasmid Miniprep Kit. Izolacijo plazmidne DNK smo izvedli po navodilih proizvajalca iz 6 ml kulture namnožene v steklenički z 10 ml gojišča. Princip izolacije je alkalna liza celic ter vezava plazmidne DNK na kolono. Sledi spiranje nečistoč. Na koncu DNK speremo s kolone s 50 µl sterilne MQ. Na ta način smo pridobili čistejšo plazmidno DNK v višjih koncentracijah (približno od 200-400 ng/µl), ki smo jo uporabljali za restrikcije, transformacije in določanje nukleotidnega zaporedja.

3.2.2.8.3 Izolacija plazmidne DNK, ki ne vsebuje endotoksina

Zaradi narave naših eksperimentov DNK, ki jo transficiramo v človeško celično kulturo HEK293 ali HEK293T, ne sme vsebovati endotoksina (lipopolisaharida). V ta namen smo plazmidno DNK izolirali s komercialno dostopnim kompletom UltraMobius™ 200 Plasmid Kit (Novagen). Izolacija je potekala po navodilih proizvajalca; temelji na alkalni lizi bakterijskih celic, sledi odstranjevanje endotoksina z dodatkom posebnega pufra. Mešanico nato centrifugiramo. Endotoksin ostane v peletu, s supernatantom pa nadaljujemo izolacijo. Plazmidno DNK potem vežemo na kolono, sledi izpiranje nečistoč, na koncu pa DNK speremo s kolone v sterilno mikrocentrifugirko s posebnim pufrom. DNK nato še oborimo. Najprej dodamo ustrezno količino izopropanola in centrifugiramo. Peletu dodamo ustrezno količino 70% etanola (sobne temperature) in zopet centrifugiramo. Pelet po odstranitvi etanola

osušimo in resuspendiramo v TE pufru brez endotoksina, ki je priložen kitu. Koncentracija tako izolirane DNK je višja (300-800 ng/ μ l).

3.2.2.8.4 Določanje koncentracije nukleinskih kislin

Pri eksperimentih v celičnem laboratoriju s človeškimi celicami je potrebna velika natančnost tudi pri vnašanju količin plazmidov. Določanje koncentracije plazmidne DNK s koncentracijskimi standardi na agroznem gelu ni ustrezna. Koncentracijo plazmidne DNK smo zato določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 260 in 280 nm. Meritev smo izvedli na spektrofotometru NanoDrop 1000, ki pomeri signal pri dveh valovnih dolžinah in sicer pri 260 in 280 nm. Razmerje A₂₆₀ : A₂₈₀ = 1,7–1,9 pove, da so pripravljeni vzorci čisti, brez proteinskih primesi, fenola ali RNK.

3.2.2.9 Določanje nukleotidnega zaporedja

Zadnja stopnja priprave konstruktov je bila določitev njihovega nukleotidnega zaporedja. Plazmid z vstavljenim želenim genskim konstruktom smo izolirali z GenElute Plasmid Miniprep Kit. Izolirano plazmidno DNK smo v zahtevanih količinah poslali podjetju MWG-BIOTECH v Nemčiji, ki je določilo nukleotidno zaporedje. Zraven smo poslali tudi ustrezne oligonukleotide za določanje nukleotidnega zaporedja, v kolikor jih ni bilo v bazi podjetja. Dobljene rezultate smo analizirali s programoma Gene Runner.version 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.

3.2.3 DELO V CELIČNEM LABORATORIJU

3.2.3.1 Odmrzovanje celic

Celične kulture so shranjene v krioampulah z navojem pri $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ v posodi s tekočim dušikom. Celice so suspendirane v govejem serumu z 10% dimetilsulfoksidom (DMSO), ki služi kot krioprotектант, za celice pa je toksičen, zato je potrebno odmrzovanje izvesti čim hitreje. Takoj, ko so celice odmrznile, smo suspenzijo prenesli v 15 mL plastične sterilne centrifugirke, dodali 5 mL gojišča DMEM z 10% FBS, dobro premešali in centrifugirali 5 minut pri 1200 rpm. Supernant smo odstranili in ostale celice resuspendirali v 10 mL svežega gojišča. Celično suspenzijo smo nato prenesli v plastično gojitveno posodo in dali v inkubator.

3.2.3.2 Gojenje človeških celičnih kultur HEK293 in HEK293T

Človeške celične kulture HEK293 in HEK293T smo gojili v inkubatorju pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 5 % CO_2 v posodicah, kjer so se celice lahko pritrdile na dno in rasle v monosloju. Hranila in rastne faktorje smo jih dodali v obliki gojišča DMEM z 10 % FBS. Gojišče smo redno menjali na tri do štiri dni. Ob zadostni gostoti smo jih presadili ali zredčili. V ta namen smo jih najprej dvakrat sprali s 5 ml sterilnega pufra PBS nato pa prelili s 3 ml tripsina z EDTA in počakali, da so se odlepile od podlage. Tripsin smo nevtralizirali z dodatkom 10 ml medija DMEM z 10 % FBS. Suspenzijo celic smo centrifugirali v sterilni plastični centrifugirki 5 minut pri 1.200 vrt./min pri sobni temperaturi. Medtem smo gojitveno posodico sprali s pufrom PBS. Po centrifugiranju smo celicam odsesali supernatant, in odstranili tripsin ter jih nežno resuspendirali v svežem mediju DMEM z 10 % FBS. Od 10-50% suspenzije smo vrnili v posodico, kjer so se celice ponovno pritrdile in rasle. Količina je bila odvisna od tega, v kolikem času smo celice potrebovali za naslednji eksperiment. Preostanek celic smo zavrgli ali pa smo jih prešteli s pomočjo Bürker-Türkove števne komore in jih nato ustrezno število nacepili na mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami primerno za gojenje celičnih kultur (ang. 96-

well plate) ali na ploščo s 6 luknjami primerno za gojenje celičnih kultur (ang. 6-well plate). Za potrebe mikroskopiranja smo celice nacepili na posebno komorico z osmimi luknjicami (Ibidi).

3.2.3.3 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293 in HEK293T

Transfekcijo celic HEK293 in HEK293T s plazmidno DNK, ki ne vsebuje endotoksina, smo izvedli s transfekcijskimi reagenti po navodilih proizvajalca. Običajno smo jo izvedli tako, da smo dan pred transfekcijo celice nacepili na ustrezeno ploščo. Celice smo nato en dan inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂, da so dosegle ustrezeno gostoto, ki je bila zahtevana v navodilih za transfekcijo. Za transfekcijo smo uporabljali dva reagenta in sicer Lipofectamine 2000 in GeneJuice. Pri transfekciji z Lipofectamine 2000 smo najprej redčili ustrezeno količino plazmidne DNK v mediju OptiMEM. Ravno tako smo v OptiMEM-u redčili transfekcijski reagent Lipofectamine 2000. Mešanico OptiMEM-a in transfekcijskega reagenta smo 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi nato smo ji dodali mešanico DNK in OptiMEM. Vse skupaj smo inkubirali 20 minut na sobni temperaturi, da so nastali transfekcijski kompleksi. Transfekcijsko mešanico smo dodali celicam in jih inkubirali do naslednjega dne, ko smo celice stimulirali. Pri transfekciji z reagentom GeneJuice smo v medij OptiMEM najprej dodali ustrezeno količino reagenta, dobro premešali in inkubirali na sobni temperaturi 5 minut. Nato smo dodali še plazmidno DNK, nežno premešali in inkubirali 10-15 minut na sobni temperaturi. Mešanico smo potem dodali celicam in plošče inkubirali 24 do 48 ur. Reagent GeneJuice je za celice manj toksičen kot Lipofectamine 2000, zato lahko v luknjice nacepimo manj celic.

Celice HEK293 ali HEK293T smo uporabljali pri eksperimentih treh različnih tipov.

- **Merjenje luciferazne aktivnosti.** Dan pred transfekcijo smo celice HEK293 nacepili na ploščo s 96 luknjami, in sicer v vsako luknjo $6 \cdot 10^4$ celic (volumen suspenzije v posamezni luknji je bil 100 µl). Celice smo vedno transficirali s plazmidi, ki so

vsebovali zapis za receptor hTLR3 (ali pCDNA3 za negativno kontrolo), inducibilno Fluc (gen za kresničkino luciferazo – Fluc – je za inducibilnim INF-β odvisnim promotorjem), konstitutivno Rluc (gen za *Renilla* luciferazo – Rluc – je za konstitutivnim promotorjem, torej se izraža ves čas). Obenem smo transficirali še s plazmidi z zapisi za encime človeški cistatin F, človeški katepsin L1, človeški za katepsin S, človeški katepsin K ter zapisom za človeški katelicidin protimikrobni peptid, katerih vpliv smo želeli preveriti. Količino teh plazmidov smo spreminjali. Posamezno različico poskusa smo vedno izvedli v vsaj treh ponovitvah. Pred eksperimenti s človeškimi celicami smo najprej morali potrebne plazmide za katepsine, inhibitor CST7 in hCAP-18 izolirati brez endotoksina ter spektrofotometrično določiti njihove koncentracije in čistost. Vsi plazmidi so bili zadosti čisti za nadaljnjo uporabo.

Preglednica 14: Količine plazmidov, s katerimi smo vedno transficirali celice v eni luknjici za merjenje luciferazne aktivnosti.

Masa plazmida v eni luknjici (ng)	Plazmid
20	pUNO-hTLR3 ali pCDNA3
40	pFluc
5	pRluc

Preglednica 15: Količine plazmidov za transfekcijo pri ugotavljanju vpliva stimulacije z različnimi stimulacijskimi mešanicami na signalizacijo preko receptorja hTLR3.

Poimenovanje transfeckcijske mešanice	Količina transficirane DNK (ng)
pcDNA3	20 ng pcDNA3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc
hTLR3	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc

Preglednica 16: Količine plazmidov za transfekcijo pri ugotavljanju vpliva različnih količin katepsinov (L1, S, K) na signalizacijo poli(I:C) preko hTLR3.

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Količina transficirane DNK (ng)
pcDNA3	20 ng pcDNA3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc,
hTLR3	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc,
hTLR3 + L1 (20ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 20 ng pCTSL1
hTLR3 + L1 (40ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 40 ng pCTSL1
hTLR3 + L1 (80ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 80 ng pCTSL1
hTLR3 + S (20ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 20 ng pCTSS
hTLR3 + S (40ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 40 ng pCTSS
hTLR3 + S (80ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 80 ng pCTSS
hTLR3 + K (20ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 20 ng pCTSK
hTLR3 + K (40ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 40 ng pCTSK
hTLR3 + K (80ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 80 ng pCTSK
hTLR3 + L1 (0,1 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 0,1 ng pCTSL1
hTLR3 + L1 (0,5 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 0,5 ng pCTSL1
hTLR3 + L1 (1 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 1 ng pCTSL1
hTLR3 + S (0,1 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 0,1 ng pCTSS
hTLR3 + S (0,5 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 0,5 ng pCTSS
hTLR3 + S (1 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 1 ng pCTSS
hTLR3 + K (0,1 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 0,1 ng pCTSK
hTLR3 + K (0,5 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 0,5 ng pCTSK
hTLR3 + K (1 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 1 ng pCTSK

Poskus, s katerim smo ugotavljali vpliv koncentracije katepsinov na signalizacijo poli(I:C) preko hTLR3, smo izvedli v dveh delih. Najprej smo testirali tri večje količine katepsinov (20 ng, 40 ng in 80 ng). Na podlagi dobljenih rezultatov (slika 32) smo se odločili, da bomo testirali še tri manjše količine (0,1 ng, 0,5 ng in 1 ng). Razmejitev med poskusi je v preglednici 16 ločena z vodoravno črto.

Preglednica 17: Količine plazmidov za transfekcijo pri ugotavljanju vpliva inhibitorja cistatina 7 na signalizacijo poli(I:C) preko hTLR3.

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Količina transficirane DNK (ng)
pcDNA3	20 ng pcDNA3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc,
hTLR3	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc,
hTLR3 + CST7 (40 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 40 ng p CST7
hTLR3 + CST7 (80 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 80 ng p CST7

Preglednica 18: Količine plazmidov za transfekcijo pri ugotavljanju vpliva proteina hCAP-18 (človeški katelicidin) na signalizacijo poli(I:C) preko hTLR3.

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Količina transficirane DNK (ng)
pcDNA3	20 ng pcDNA3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc,
hTLR3	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc,
hTLR3 + CAMP (40 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 40 ng p CAMP
hTLR3 + CAMP (80 ng)	20 ng pUNO-hTLR3, 40ng Fluc, 5 ng Rluc, 80 ng p CAMP

- Določevanje sinteze proteinov.** Z namenom, da bi neposredno dokazali sintezo konstruktorjev, smo dan pred transfekcijo celice HEK293T nacepili na ploščo s 6 luknjami in sicer $2,5 \cdot 10^5$ celic v posamezno luknjo (volumen suspenzije v posamezni luknji je bil 2 ml). Celice smo naslednji dan transficirali s plazmidom z zapisom za hTLR3 in plazmidom, ki je vseboval želeni encim. Za kontrolo uspešnosti transfekcije in količine nanosa pri SDS Page elektroforezi, smo ob transfekciji dodali še plazmid z zapisom za mCerulean pod konstitutivnim promotorjem. Za transfekcijo smo uporabili transfekcijski reagent GeneJuice.

Preglednica 19: Količine plazmidov, s katerimi smo transficirali celice za ugotavljanje proteinske sinteze.

Plazmid	Količina transficiranega plazmida (ng)
pTLR3 ali pCDNA3	2000
pmCerulean-C1	5
pCTSL1, pCTSS, pCTSK	200
pCAMP	200
pCST7	200

*Opomba: Količine plazmidov pTLR3, pcDNA3 in pmCerulean-C1, so bile določene eksperimentalno. Količine plazmidov za katepsine, hCAP-18 in inhibitor so bile preračunane glede na površino luknjic iz količin uporabljenih pri luciferaznem testu.

- **Mikroskopiranje.** Celice HEK293T smo nacepili na komorico za mikroskopiranje z osmimi luknjicami in sicer $2,5 \cdot 10^4$ celic v posamezno luknjico (volumen suspenzije v posamezni luknji je bil 200 µl). Za preverjanje premika receptorjev v endosome smo celice transficirali s plazmidi phTLR3-mCer (300 ng), phTLR3 (150 ng), phTLR9-HA (200 ng) ali phTLR9-YFP (200 ng). Za preverjanje kolokalizacije receptorja TLR3 in poli(I:C) v endosomih, smo celice transficirali z phTLR3-mCer in jih pustili rasti 48 ur. V 48 urah se protein mCerulean začne izražati, ter primerno dozori.

3.2.3.4 Stimulacija transficiranih celic HEK293 in HEK293T

Tako kot se je razlikoval način transfekcije za posamezne eksperimente, tako se je razlikoval tudi način stimulacije.

- **Merjenje luciferazne aktivnosti.** Dan po transfekciji smo celicam najprej zamenjali gojišče, da smo odstranili transfekcijski reagent. Nato smo jih stimulirali s poli(I:C) v koncentraciji 10 µg/ml. Ob stimulaciji smo poli(I:C) dodali še različne dodatke, katerih vpliv smo želeli preveriti. Inhibitorja E-64 smo dodali od 20-50 µM, sintetičnega protimikrobnega peptida LL37 pa smo dodali 50 µg/ml (torej 5-krat več kot poli(I:C)). Mešanico LL-37 in poli(I:C) smo pred stimulacijo inkubirali 30 minut na sobni

temperaturi, da so nastali kompleksi med nukleinsko kislino in peptidom. Stimulacijske mešanice smo pripravili tako, da smo v enkratnem PBS redčili ustrezne reagente in dodali gojišče DMEM + 10% FBS. Celicam smo odsesali gojišče ter dodali 100 µl svežega gojišča s stimulacijsko mešanicou.

- **Določevanje sinteze proteinov.** 24 ur po transfekciji smo celicam dodali še poli(I:C) v končni koncentraciji 10 µg/ml, da bi preverili, če ob stimulaciji pride tudi do višjega izražanja receptorja TLR3. Celice smo inkubirali še 24 ur in jih nato lizirali.
- **Mikroskopiranje.** Za preverjanje premika receptorjev v endosome smo dan po transfekciji celicam zamenjali gojišče in celice stimulirali s poli(I:C) v končni koncentraciji 10 µg/ml oziroma CpG ODN 10104 v končni koncentraciji 22,2 µg/ml. Ob stimulaciji smo dodali še transferin Alexa Fluor 633 (Invitrogen). Po 24 urah smo celice opazovali pod mikroskopom. Za preverjanje kolokalizacije hTLR3-mCer v endosomih skupaj s poli(I:C) smo celice po transfekciji pustili rasti 48 ur. Na dan mikroskopiranja smo celicam dodali z Alexa Fluor 633 hidrazidom označeno poli(I:C) (8 µg/ml) ali z Alexa Fluor 633 hidrazidom označeno poli(I:C) (8 µg/ml) ob dodatku LL-37 (40 µg/ml). V gojišče smo dodali še transferin Alexa Fluor 546 konjugat. Celice smo potem inkubirali še 3 do 5 ur in jih nato opazovali pod mikroskopom.

3.2.3.5 Liza transficiranih celic HEK293 in HEK293T

Celicam, katerim smo želeli meriti luciferazno aktivnost, smo 24 ur po stimulaciji odstranili medij in jih lizirali z ustreznim liznim pufrom (Promega) in jih zamrznili na -20°C.

V primeru spremeljanja proteinske sinteze smo celice 48 ur po transfekciji lizirali z liznim pufrom RIPA z dodanimi inhibitorji proteaz. Iz luknjic na plošči s šestimi luknjicami smo odstranili gojišče in dodali 1 ml enkratnega PBS in celice z aktivnim spiranjem sprali s površine ter jih prenesli v sterilne mikrocentrifugirke. Celice smo nato centrifugirali v ohlajeni

(4 °C) centrifugi pri 1200 vrt./min za 5 minut, odstranili supernatant in celicam dodali 100 µl pufra RIPA. Celice smo še 30 minut inkubirali na ledu in jih nato zamrznili na -20 °C do uporabe. Receptor TLR3 je velik membranski protein, zato smo morali lizate celic še sonicirati, da se je v supernatant iz membran, ki sicer predstavljajo netopen del lizata, izločilo čim več proteina. Mikrocentrifugirke s celicami smo vpeli v nosilec, ga postavili v z ledom ohlajeno vodno kopel, v to pa potopili sondu. Vzorce smo sonicirali trikrat po 10 min pri 50-odstotni amplitudi sonde. Lizate smo nato centrifugirali pri 13400 vrt/min za 45 minut. Nato smo odvzeli supernatant, ga prenesli v novo mikrocentrifugirko ter peletu dodali 50 µl svežega RIPA pufra. Lizat smo ponovno sonicirali, centrifugirali ter supernatante združili.

3.2.4 MERJENJE LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI

Tik pred merjenjem luciferazne aktivnosti z dvojnim luciferaznim testom smo pripravili pufra za merjenje luciferazne aktivnosti. Odmrznjeno ploščo smo vstavili v luminometer Mithras LB 940, ustrezena injektorja pa smo potopili v pufra. Pri dvojnem luciferaznem testu luminometer najprej pomeri aktivnost kresničkine luciferaze (Fluc), nato pa še aktivnost *Renilla* luciferaze (Rluc). Oba encima imata različna substrata, zato lahko njuno aktivnost ločeno merimo v istem vzorcu. Aktivnost Rluc nam pove delež transficiranih celic, saj se *Renilla* luciferaza ves čas izraža in nam tako prikazuje delež celic, ki so sprejele plazmid z zapisom za Rluc, medtem ko nam aktivnost Fluc (Fluc pod INF-β odvisnim promotorjem) kaže aktivacijo TLR3/TRIF signalne poti ob stimulaciji s poli(I:C). Razmerje Fluc/Rluc (RLE – relativne luciferazne enote) nam torej pove normalizirano vrednost stimuliranih celic glede na transficirane celice. Podatke smo nato obdelali v programu Excel (Microsoft).

Statistične analize smo naredili v programu Excel (Microsoft) z orodjem za analizo podatkov t-Test: preizkus domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc (ang. t-Test: Two sample assuming unequal variances). Ob izboru niza podatkov med dvema meritvama, ki jih

hočemo primerjati in določitvi intervala zaupanja, program poda tabelo, v kateri so izračunane stopnja prostosti, t-statistika (t-vrednost) in kritična vrednost.

3.2.5 DOLOČANJE IZRAŽANJA PROTEINOV

Glede na to, da smo pri preverjanju vpliva na signalizacijo preko TLR3 delali s proteazami, smo želeli preveriti, če mogoče vplivajo na izražanje ali razgradnjo receptorja hTLR3. Razgradnja receptorja bi namreč pomenila tudi manjši odziv pri merjenju luciferazne aktivnosti.

Celice smo transficirali s plazmidom z zapisom za hTLR3 in plazmidom, ki je vseboval želeni encim (katepsini, cistain F, hCAP-18). Za kontrolo uspešnosti transfekcije in količine nanosa pri SDS PAGE elektroforezi, smo ob transfekciji dodali še plazmid z zapisom za mCerulean pod konstitutivnim promotorjem. S specifičnimi monoklonskimi protitelesi smo po prenosu proteinov na membrano zaznavali proteina hTLR3 ter mCerulean.

Poleg topne frakcije celičnega lizata transficiranih celic smo na SDS-gel nanesli tudi topno frakcijo celičnega lizata celic, ki niso bile transficirane z nobenim od plazmidov in so nam predstavljale negativno kontrolo. Z negativno kontrolo smo potrdili, da je prišlo do specifične vezave protiteles s proteinimi.

Preglednica 20: Kombinacij plazmidov za transfekcijo ter oznake pridobljenih lizatov.

Oznaka	Transfekcija s plazmidi
lizata	
A	pUNO-hTLR3 + pmCerulean-C1
B	pUNO-hTLR3 + pCTSL1 + pmCerulean-C1
C	pUNO-hTLR3 + pCTSS + pmCerulean-C1
D	pUNO-hTLR3 + pCTSK + pmCerulean-C1
E	brez transfekcije (negativna kontrola)
F	pUNO-hTLR3 + pCAMP + pmCerulean-C1
G	pUNO-hTLR3 + pCST7 + pmCerulean-C1

3.2.5.1 Merjenje koncentracije proteinov – BCA test

Preden smo vzorce nanesli na poliakrilamidno gelsko elektroforezo, smo jim morali še pomeriti koncentracijo proteinov. Vse vzorce smo nato pripravili tako, da smo na gel nanesli enake količine celokupnega proteina v vzorcu, da smo lahko preverjali, če pride do razlik v izražanju proteinov. Kot dodatna kontrola nanosa nam je služila tudi že prej omenjena kotransfekcija s pmCeruleam-C1. Vzorce smo najprej 15-kart redčili z MQ. 30 µl tako pripravljenega vzorca smo v treh ponovitvah nanesli v luknjice na prozorni plošči s 96 luknjicami. Pripravili smo si tudi standardne raztopine BSA proteina od koncentracije 1 mg/ml do 0,02 mg/ml ter negativno kontrolo (MQ). V vse luknjice s standardi in vzorci smo dodali 200 ul BCA reagenta z CuSO₄. Raztopino smo pripravili iz 49 delov BCA raztopine ter enega dela raztopine CuSO₄. Ploščo smo inkubirali 30 minut na 37 °C. Absorbanco pri 562 nm smo pomerili na mikročitalcu BioTeck PowerWave XS. S pomočjo umeritvene krivulje smo nato določili koncentracije proteinov v vzorcih.

3.2.5.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS-PAGE)

Za elektroforezo smo uporabili vertikalni sistem Mini-Protean II (BioRad). Gele smo pripravili tako, da smo med dve stekelci, ločeni za 1,5 mm, najprej vlili 10-odstotni ločitveni gel (gostota gela je odvisna od velikosti proteinov, ki jih želimo zaznati), ga prelili s 100 µl izobutanola, nasičenega z vodo, in ga pustili 1 uro, da je polimeriziral. Nato smo odstranili izobutanol in na ločitveni gel vlili 4-odstotni vstopni gel, v katerega smo vstavili glavniček, s katerim smo naredili žepke za nanos vzorcev. Tudi vstopni gel smo pustili polimerizirati 1 uro. Gele smo nato takoj uporabili ali pa jih navlažili in shranili za največ 1 teden na 4 °C.

Vzorcem (supernatant liziranih in soniciranih celic) smo dodali 4-kratni reducirajoči vzorčni pufer z SDS in proteine denaturirali s segrevanjem 10 minut pri 100 °C. Nato smo vzorce nanesli na gel. Poleg vzorcev smo dodali še proteinski velikostni standard.

Elektroforeza je potekala v 1-kratnem elektroforeznem pufru SDS približno 1 uro pri konstantni napetosti 200 V. Elektroforezo smo ustavili, ko je barvilo bromfenolmodro iz nanašalnega pufra doseglo spodnji rob ločitvenega gela. Po končani elektroforezi smo odstranili vstopni gel, ločitveni gel pa uporabili v prenosu western.

3.2.5.3 Prenos western

Po elektroforezni ločbi smo poliakrilamidni gel sprali z MQ in ga (med sestavljanjem aparature za prenos western) namakali v pufru za mokri prenos. Nitrocelulozno membrano (z 0,45 µm velikimi porami) in filtrirne papirje, enake velikosti, kot membrana, smo najprej namočili v pufer za mokri prenos, nato pa smo jih nalagali eno na drugo (najprej filter papir, nato nitrocelulozna membrana, poliakrilamidni gel in filter papir). Nitrocelulozna membrana mora biti obrnjena proti anodi, da se proteini prenesejo iz gela na membrano. Prenos je potekal 2 uri pri konstantnem toku 350 mA. Po končanem prenosu smo membrano sprali z MQ in jo pobarvali z barvilo Ponceau-S, ki se veže na proteine, da bi se prepričali, če je prenos uspel. Kontrola uspešnega prenosa je tudi prenos obarvanega standarda iz gela na membrano. Ob dobrem prenosu, standarda na gelu ne opazimo več, na membrani pa opazimo obarvane lise. Barvanje v 13 ml barvila Ponceau-S je potekalo 5 minut. Ko so bili proteini obarvani, smo ozadje najprej razbarvali z MQ. Barvilo smo nato sprali z enkratnim PBS. (3 x 5 minut). Membrano smo potem pri 4 °C čez noč inkubirali v pufru za blokiranje (1 X PBS, 0,01 % Tween 20, 0,2 % I-BLOCK). S tem smo blokirali nespecifična mesta na membrani, kamor bi se lahko vezala protitelesa. Po blokiranju smo nitrocelulozno membrano spirali s pufrom za spiranje (5 X 5 minut).

3.2.5.4 Imunodetekcija proteinov po prenosu western

Sprano nitrocelulozno membrano smo prerezali na pol, tako da je bil na zgornji polovici vezan protein TLR3, na spodnji pa mCer in obe polovici prenesli v svojo plastično vrečko. V vrečko z zgornjo polovico membrane smo dodali raztopino za blokiranje z 1 : 250 redčenimi mišjimi

monoklonskimi primarnimi protitelesi proti TLR3, v vrečko s spodnjo polovico membrane pa raztopino za blokiranje z 1 : 6000 redčenimi protitelesi proti proteinu GFP. Obe polovici smo inkubirali eno uro na sobni temperaturi in 50 vrt./min. Po inkubaciji smo membrani sprali s pufrom za spiranju (2 X 5 minut) in pripravil raztopini sekundarnih protiteles. Zgornjo polovico membrane smo v zavarjeni vrečki inkubirali z 1 : 4000 redčenimi kozjimi sekundarnimi protitelesi proti mišjim protitelesom, spodnjo polovico pa z 1: 6000 redčenimi kozjimi sekundarnimi protitelesi proti zajčjim protitelesom. Sekundarna protitelesa so konjugirana s hrenovo peroksidazo. Zavarjeno vrečko smo 45 minut stresali pri sobni temperaturi in 50 vrt./min. Sledilo je spiranje nevezanih protiteles (3 X 5 minut).

Detekcija poteka s substratom, ki vsebuje luminolin. Tega hrenova peroksidaza oksidira. Oksidiran luminol preide v vzbujeno stanje, pri prehodu v osnovno stanje pa se sprošča svetloba, ki jo zaznamo na filmu, položenem na membrano.

Po spiranju smo membrano položili na steklene plošče, na katero smo prehodno nakapljali reagent ECL. Reagent se pripravi tako, da v razmerju 1:1 zmešamo dve ločeni raztopini. Membrano smo inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi, nato odpivnali reagent in jo položili v hibridizacijsko vrečko ter zaprli v kaseto. V temnici smo na membrano položili film. Film smo membrani izpostavili za izbrano dolgo časa, da so se dobro videle lise z označenimi proteini. Film smo nato 3 minute razvijali v kadički z razvijalcem. Sledilo je spiranje z vodo in prenos v kadičko s fiksirjem za 3 minute. Film smo zopet sprali s tekočo vodo in ga posušili. Suhega smo postavili na membrano in tudi na film narisali lise obarvanega standarda.

Iz intenzitete lis na filmu pa nismo mogli z gotovostjo trditi, ali je izražanje hTLR3 enako, zato smo uporabili program Quantity One (Bio-Rad) verzija 4.6.6. za merjenje intenzitete lis. Program označenim lisam izmeri njihovo intenzitet (INT) in poda številsko vrednost. Izračunali smo razmerje med lisami, ki so ustrezale hTLR3 ter lisami, ki so ustrezale mCerulean.

Preglednica 21: Približne velikosti iskanih proteinov.

Protein	Velikost (kDa)
hTLR3	120 (glikoziliran), 100 (neglikoziliran)
mCerulean	28

3.2.6 OZNAČEVANJE SINTEZNE RNA (poli(I:C))

Pri delu s poli(I:C) smo poizkušali preprečiti delovanje RNaz, ki bi jo lahko razgradile. Delo smo zato izvajali ob ognju s posebej za delo z RNA shranjenimi pipetami in pipetnimi nastavki. Vse tekočine, ki so prišle v stik s sintezno RNA, smo predhodno obdelali z DEPC (dietilpirokarbonat), ki inaktivira RNaze. Raztopinam smo dodali toliko DEPC, da je bila končna koncentracija reagenta 0.1%. Tekočine smo nato dobro pretresli, pustili stati 6 ur na 37°C ter jih nato avtoklavirali, da smo DEPC inaktivirali.

Dan pred oksidacijo smo pripravili dializno vrečko. Napolnili smo jo s sterilno MQ + 0,1-odstotni DEPC in jo čez noč dializirali v enkratnem PBS na 4 °C. S tem smo inaktivirali morebitne RNaze v notranjosti vrečke.

Označevanje poli(I:C) je potekalo v dveh korakih :

- Oksidacija poli(I:C):

Volumnu poli(I:C) smo dodali enak volumen oksidacijskega pufra ter raztopino inkubirali zaščiteno pred svetlobo 30 minut na ledu. Oksidirano poli(I:C) smo preko noči dializirali v 1-kratnem PBS.

- Označevanje:

Oksidirani poli(I:C) smo dodali raztopino Alexa Fluor 633 hidrazida do končne koncentracije 5 mM. Mešanico smo zaščiteno pred svetlobo inkubirali 4 ure pri sobni temperaturi in stresanju (350 rpm). Nevezano fluorescenčno barvilo smo ločili s kompletom QIAquick Nucleotide Removal Kit po navodilih proizvajalca. Poli(I:C)

smo s kolone sprali s 120 µL sterile MQ obdelane z DEPC. Koncentracijo označene poli(I:C) smo pomerili na spektrofotometru NanoDrop-1000 z metodo UV-VIS. Koncentracijo poli(I:C) smo pomerili pri 260 nm, vsebnost barvila Alexa Fluor hidrazid, vezanega na poli(I:C) pa pri 624 nm.

V eno luknjico smo ob barvanju dodali 8 µg/ml označene poli(I:C).

3.2.7 MIKROSKOPIRANJE

Označene žive celice smo pregledovali na konfokalnem mikroskopu Leica TCS SP5 na Leica DMI 6000 CS stojalu. Ta mikroskop je namenjen laserskemu skeniranju fluorescenčno označenih živih ali fiksiranih celic.

Uporabljali smo 63× oljni imerzijski objektiv. Slike smo pridobili s programom LAS AF 1.8.0. Leica Microsystems. Uporaba laserjev je bila odvisna od valovnih dolžin, pri katerih smo želeli vzbujati. V preglednici 14 so navedeni vsi laserji, ki smo jih uporabljali pri opazovanju vzorcev.

Preglednica 22: Vrste laserjev in valovne dolžine, pri katerih vzbujajo fluorescenco.

Vrsta laserja	Valovna dolžina (nm)
Diode 405	405
multi-ion Ar	458, 476, 488, 496, 514
HeNe 543	543
HeNe 633	633

Po vklopu laserjev smo nastavili še ostale parametre (intenziteto laserskega žarka, filtre, ozadje, območje detekcije oddane svetlobe, način snemanja slike), da smo posneli sliko.

Poleg fluorescentno označenih proteinov, ki so se začeli izražati po transfekciji z odgovarjajočimi plazmidi in z Alexa Fluor 633 označeno poli(I:C), smo za študij

kolokalizacije barvali še endosome ali lizosome. Barvila, valovne dolžine in koncentracije potrebne za barvanje so navedene v preglednici 15. Barvila smo dodali ob stimulaciji celic.

Preglednica 23: Označevalci, ki smo jih uporabljali pri barvanju organelov. V preglednici je podana tudi končna koncentracija barvila v luknjici po barvanju ter organeli, ki jih označi.

Barvilo	Absorbacija (nm)	Emisija (nm)	Končna konc./luknjico	Organeli, ki jih označi
Transferrin-Alexa Flour 633 konjugat	632	647	0,05 mg/mL	endosomi
Transferrin-Alexa Fluor 546 konjugat	556	575	0,05 mg/mL	endosomi
LysoTracker Red DND 99	577	590	50 nM	lizosomi

Po inkubaciji smo vsako luknjico na plošči dvakrat sprali z gojiščem (DMEM z 10-odstotnim FBS). Po spiranju smo jim dodali sveže gojišče, da tekom mikroskopiranja ne bi odmrle ali se odlepile od podlage.

V preglednicah 24 in 25 so v preglednejši obliki zbrani sicer že opisani podatki o količini plazmidov za transfekcijo, o načinu stimulacije in o barvanju organelov za opazovanje pod mikroskopom.

Preglednica 24: Prikaz količin plazmidov za transfekcijo, načina stimulacije in barvanja organelov celic HEK293T za opazovanje lokalizacije proteina hTLR3-mCer in označene poli(I:C).

Transfekcija s plazmidi in uporabljeni količina plazmida v eni luknjici (ng)	Stimulacija z ligandom in uporabljeni koncentracija v luknjici (ug/ml)	Uporabljeno barvilo za barvanje endosomov in koncentracija barvila
hTLR3-mCer v pcDNA3 (300 ng)	poli(I:C)-Alexa Fluor 633 hidrazid (8 µg/ml)	Transferrin-Alexa Fluor 546 konjugat (0,05 mg/mL)
hTLR3-mCer v pcDNA3 (300 ng)	poli(I:C)-Alexa Fluor 633 hidrazid (8 µg/ml) + LL-37 (40 µg/ml)	Transferrin-Alexa Fluor 546 konjugat (0,05 mg/mL)

Preglednica 25: Prikaz količin plazmidov za transfekcijo, načina stimulacije in barvanja organelov celic HEK293T za opazovanje premika označenih receptorjev.

Transfekcija s plazmidi in uporabljeni količini plazmida v eni luknjici (ng)		Stimulacija z ligandom in uporabljeni koncentracija v luknjici (µg/ml)	Uporabljeno barvilo za barvanje organelov in uporabljeni koncentracija barvila
hTLR3-mCer v pCDNA3 (300 ng)		- poli(I:C) (10 µg/ml) poli(I:C) (10 µg/ml) poli(I:C) (10 µg/ml)	- LysoTracker Red DND-99 (50 nM) Transferrin-Alexa Flour 633 konjugat (0,05 µg/ml)
hTLR9-YFP v pCDNA3 (200 ng)		- ODN 10104 (22,2 µg/ml) ODN 10104 (22,2 µg/ml) ODN 10104 (22,2 µg/ml)	- LysoTracker Red DND-99 (50 nM) Transferrin-Alexa Flour 633 konjugat (0,05 mg/ml)
hTLR3-mCer v pCDNA3 (300 ng)	pUNO-hTLR9- HA (200 ng)	- ODN 10104 (22,2 µg/ml) ODN 10104 (22,2 µg/ml)	- LysoTracker Red DND-99 (50 nM) Transferrin-Alexa Flour 633 konjugat (0,05 mg/ml)
hTLR9-YFP v pCDNA3 (150 ng)	pUNO-hTLR3 (150 ng)	- poli(I:C) (10 µg/ml) poli(I:C) (10 µg/ml) poli(I:C) (10 µg/ml)	- LysoTracker Red DND-99 (50 nM) Transferrin-Alexa Flour 633 konjugat (0,05 mg/ml)

3.2.7.1 Obdelava slik

Izbrane slike smo morali še obdelati z orodji, ki so dostopni v programu LAS AF 1.8.0. Leica Microsystems (ta program smo uporabljali tudi za slikanje). S funkcijo Noise Reduction - Median smo na vsaki sliki zmanjšali šum ozirom izostrili posamezne točke. S funkcijo Adjust Colours smo uravnali moč signalov, ki so prišli iz posameznih kanalov. Intenziteto signala smo bodisi ojačali ali pa zmanjšali.

3.2.7.2 Določanje kolokalizacije z računalniškimi programi

Pri obdelavi slik za iskanje kolokalizacije smo uporabili program ImageJ 1.40g, ki ga je zasnoval Wayne Rasband iz National Institutes of Health (ZDA). Program je prosto dostopen na spletu (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). ImageJ ponuja precej možnosti in programov za obdelavo slik (Rasband, 1997). Za namen diplomske naloge smo uporabili dve dodatni razširitvi programa, ki omogočata iskanje kolokalizacije in sicer Colocalization (avtor programa je Pierre Bourdoncle iz Institut Jacques Monod, Service Imagerie, Paris) in Colocalization Finder (avtorja programa sta Christophe Laummonerie in Jerome Mutterer iz Institut de Biologie Moleculaire des Plantes, Strasbourg, France). Prvega smo uporabili, če smo iskali kolokalizacijo dveh signalov, drugega pa če smo iskali kolokalizacijo treh signalov (Bourdoncle, 2004; Laummonerie in Mutterer, 2004).

3.2.8 PREGLED OSNOVNEGA POTEKA EKSPERIMENTOV

Tekom enega eksperimenta smo uporabili več metod, ki so že opisane. Za lažje sledenje smo za tri večje skupine eksperimentov izrisali sheme.

V prvo skupino eksperimentov spada preverjanje kolokalizacije z Alexa Fluor hidrazidom 633 označene poli(I:C) ali označene poli(I:C) ob dodatku LL-37 in proteina hTLR3-mCer v endosomih, ki smo jih označili s transferinom Alexa Fluor 546 konjugatom.

V drugo skupino spada preverjanje hipoteze o vplivu premika enega receptorja v endosome ob stimulaciji na premik sorodnega receptorja oziroma kolokalizacije TLR3 in TLR9.

V tretjo skupino pa spada raziskovanje vpliva proteaz (katepsinov) in inhibitorjev proteaz na signalizacijo dvRNK preko TLR3.

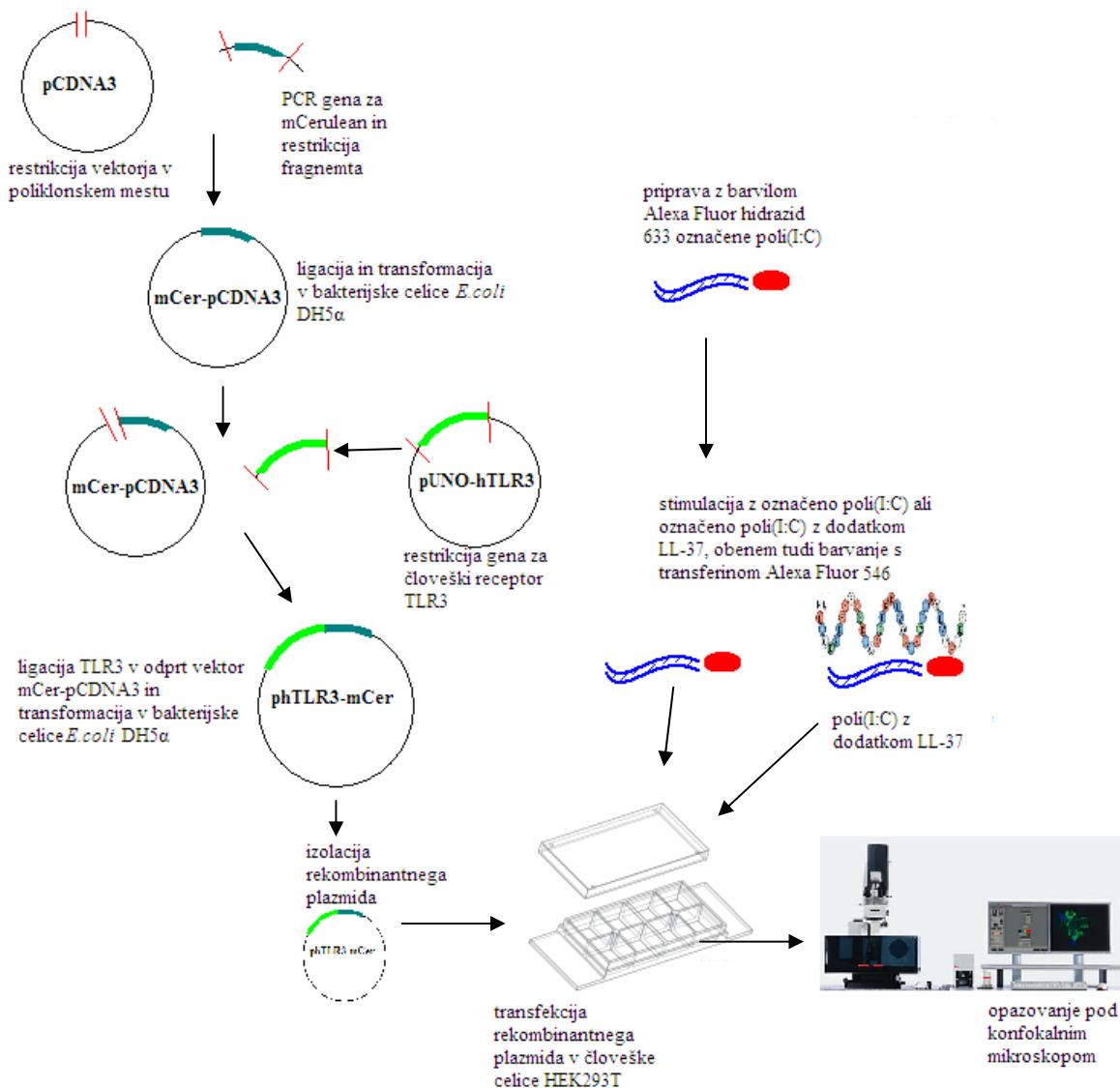
3.2.8.1 Lokalizacija TLR3

Za preverjanje lokalizacije proteina TLR3 s pomočjo konfokalnega mikroskopa smo morali najprej sestaviti genski konstrukt hTLR3-mCer v vektorju pCDNA3. Proteinski produkt tega zapisa je divji tip človeškega TLR3 s fluorescentnim proteinom mCerulean na C terminalnem delu. Priprava konstrukta je potekala po naslednjih stopnjah:

- pomnoževanje zapisa za fluorescentni protein mCerulean z reakcijo PCR iz vektorja pmCerulean-C1, čiščenje produkta ter rezanje z restriktijskima encimoma *Hind*III in *Xho*I;
- restrikcija zapisa za TLR3 iz vektorja pUNO-hTLR3 z restriktijskima encimoma *Age*I in *Bam*HI;
- odprtje vektorja pCDNA3 z restriktijskima encimoma *Hind*III in *Xho*I;
- ligacija rezanega produkta PCR v odprt vektor pCDNA3 in transformacija v bakterijske celice *E. coli* DH5 α ;
- izolacija plazmidov s pravilnimi inserti;
- rezanje pridobljenega vektorja z restriktijskima encimoma *Age*I in *Bam*HI;

- ligacija rezanega zapisa za hTLR3 v odprt vektor mCer-pCDNA3 in transformacija v bakterijske celice *E. coli* DH5 α in izolacija plazmidov brez endotoksina.

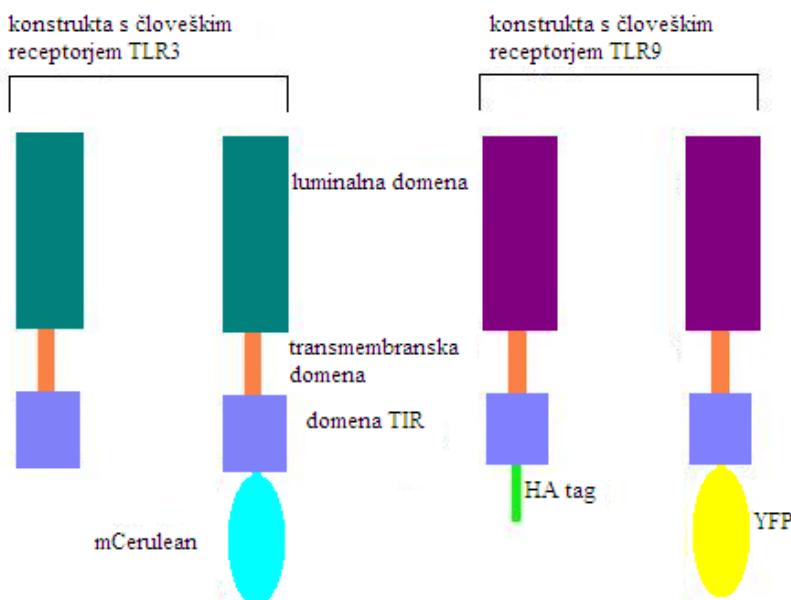
Pripraviti je bilo treba še z barvilmom Alexa Fluor hidrazid 633 označeno poli(I:C). Za opazovanje pod mikroskopom smo pripravljeni plazmid s konstruktom TLR3-mCer transficirali v celice HEK293T, stimulirali z označeno poli(I:C) ali z označeno poli(I:C) ob dodatku peptida LL-37.



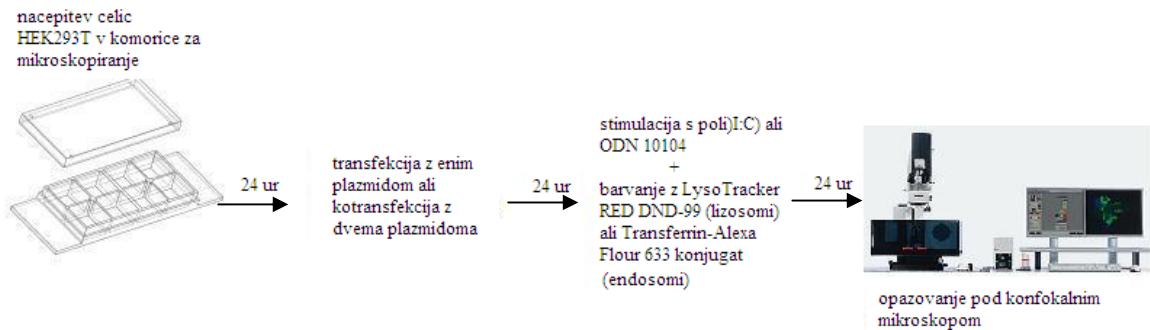
Slika 14: Shema osnovnega poteka eksperimenta za preverjanje kolokalizacije TLR3-mCer in z Alexa Fluor hidrazid 633 označene poli(I:C).

3.2.8.2 Vpliv stimulacije enega receptorja na lokalizacijo drugega

Za preverjanje hipoteze o vplivu premika enega receptorja ob stimulaciji na premik drugega smo uporabili dva konstrukta, ki sta izražala TLR receptor povezan s fluorescentnim proteinom na N terminalnem delu. TLR3 je bil označen s fluorescentnim proteinom mCerulean, TLR9 pa z rumenim fluorescentnim proteinom (YFP). Konstrukt hTLR3-mCer smo izdelali za potrebe sledenja receptorja TLR3, konstrukt TLR9-YFP pa smo dobili, kot je navedeno v poglavju plazmidi. Za potrebe tega poskusa smo potrebovali še plazmida, ki izražata fluorescentno neoznačena proteina TLR3 in TLR9. Uporabili smo plazmida pUNO-hTLR3 in pUNO-hTLR9-HA (InvivoGen). Sheme konstruktorov so prikazane na sliki 15.



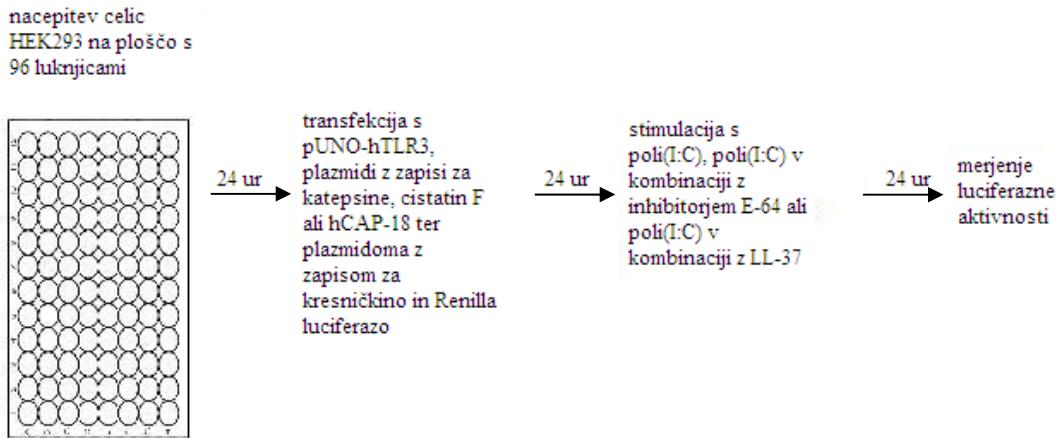
Slika 15: Poenostavljena shema konstruktorov TLR3 in TLR9. Veliki pravokotniki temno zelene in vijolične barve označujejo luminalne domene receptorjev hTLR3 in hTLR9, oranžni pravokotniki označujejo transmembransko domeno, sivi pa TIR domeno pri obeh receptorjih. Ovalni liki prikazujejo fluorescentni protein, HA tag je označen kot zelena navpična črtica.



Slika 16: Poenostavljena shema osnovnega poteka eksperimenta za raziskovanje vpliva premika sorodnih receptorjev v endosome.

3.2.8.3 Vpliv proteaz in njihovih inhibitorjev na signalizacijo dvRNK preko TLR3

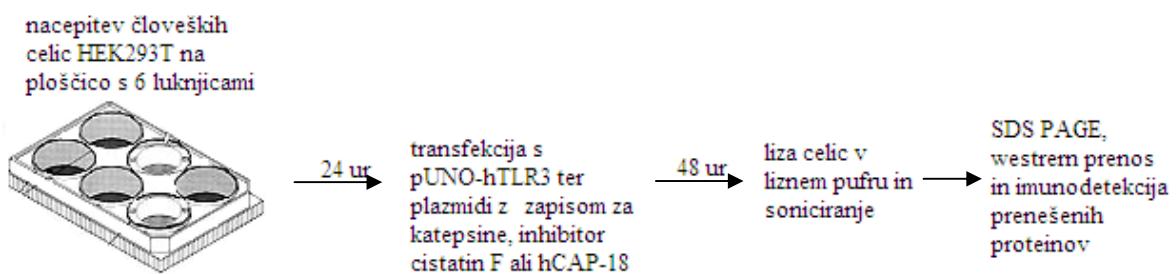
Za preverjanje vpliva katepsinov in inhibitorjev proteaz na signalizacijo preko TLR3 smo uporabili metodo dvojnega luciferaznega testa.



Slika 17: Poenostavljena shema osnovnega poteka eksperimenta za raziskovanje vpliva katepsinov in inhibitorjev proteaz na signalizacijo preko TLR3 z dvojnim luciferaznim testom.

3.2.8.4 Dokazovanje izražanja proteinov

Pri preverjanju vpliva proteolize z encimi in inhibitorji smo želeli preveriti, če dodani encimi morebiti vplivajo na proteinsko sintezo receptorja TLR3 oziroma na razgradnjo že sintetiziranega receptorja.

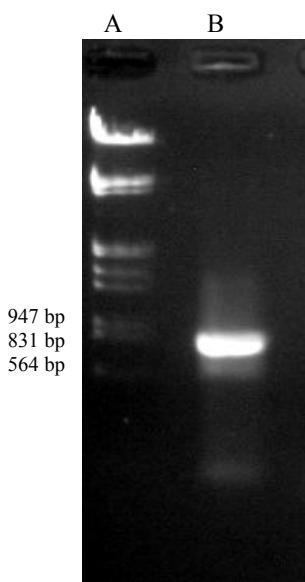


Slika 18: Poenostavljena shema osnovnega poteka eksperimenta za preverjanje proteinske sinteze človeškega receptorja TLR3.

4 REZULTATI

4.1 PRIDOBITEV KONSTRUKTA hTLR3-mCer

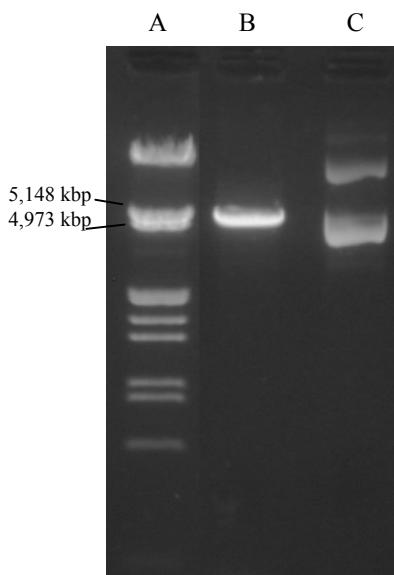
4.1.1 PRODUKTI POMNOŽEVANJA S POLIMERAZO



Slika 19: Slika 1,2-odstotnega agaroznega gela s produktom PCR-reakcije za pomnoževanje gena za fluorescentni protein mCerulean. Na gelu je nanesen standard λ EcoRI/HindIII. V žepek B je nanesen še neočiščen produkt PCR-reakcije.

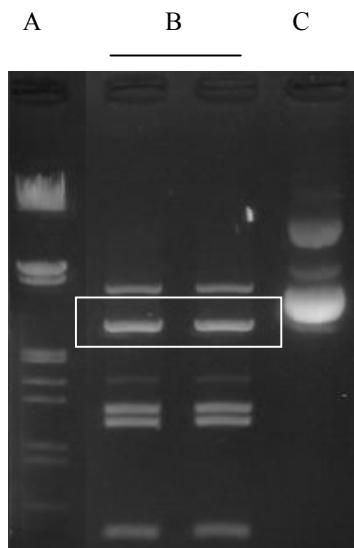
Najsvetlejša lisa na gelu (žepek B) ustreza velikosti pomnoženega gena za mCerulean. Lisa je na velikosti med 831 bp in 564 bp, pričakovana velikost fragmenta pa je 720 bp.

4.1.2 RESTRIKCIJA GENSKIH PRODUKTOV IN VEKTORJA IN LIGACIJA



Slika 20: Slika 1,0-odstotnega agaroznega gela z rezanim vektorjem pcDNA3. Na gelu v žepku A je nanesen DNK- standard λ EcoRI/HindIII, v žepku B je rezan vektor pcDNA3 rezan s HindIII in XbaI. Za primerjavo je v žepku C nanesen še nerezan vektor.

V žepek B smo nanesli produkt restrikcije vektorja pcDNA3. Lisa na gelu je odprt in linealiziran vektor, ki je dolg 5,4 kbp. Velikost produkta restrikcije ustreza pričakovani velikosti. Lisa je med 5,148 kbp in 4,973 kbp. Rezan vektor je velik toliko kot nerezan. Nerezan vektor na gelu potuje hitreje (spodnja lisa v žepek C), ker je v zaprem vektorju DNK dodatno zvita (ang. supercoiled, tudi nadzvita oblika).

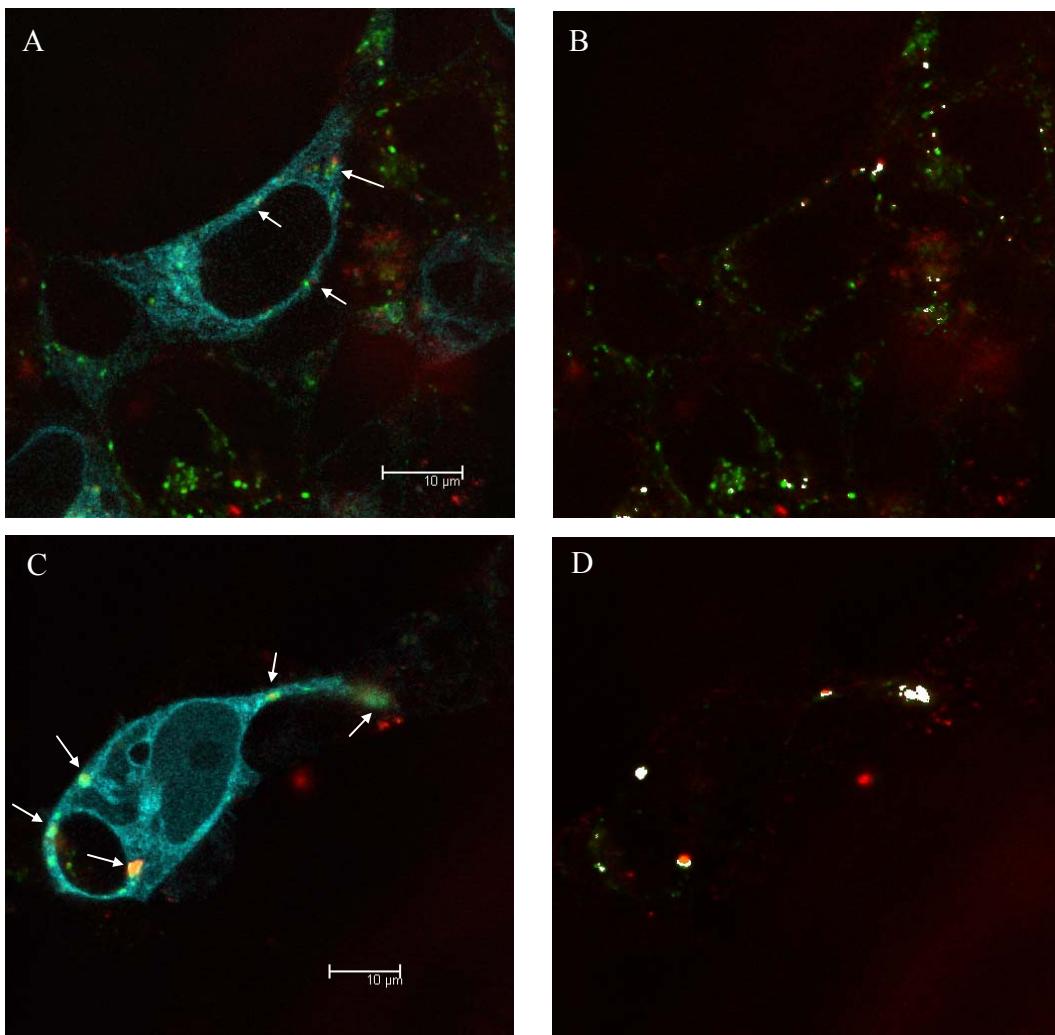


Slika 21: Slika 1,0-odstotnega agaroznega gela z rezanim vektorjem pUNO-hTLR3. Na gelu je v žepek A nanesen DNK- standard λ EcoRI/HindIII, rezan vektor pUNO-hTLR3 rezan s HindIII, XbaI in NcoI je nanesen v žepka označena z B, za primerjavo je v žepku C nanesen še nerezan vektor. Z belim pravokotnikom sta označena fragmenta velikosti 2709 bp, ki smo ju izrezali iz gela.

V žepka, označena z B, smo nanesli rezan vektor pUNO-hTLR3. Z belim pravokotnikom sta označeni lisi, ki ustrezata velikosti gena za hTLR3. Lisi sta na velikosti med 4,973 kbp in 2,027 kbp. Pričakovana velikost fragmenta pa je 2,709 kbp. Fragmenta nad belim pravokotnikom sta ostanka nerezanega plazmida.

4.2 REZULTATI MIKROSKOPIRANJA

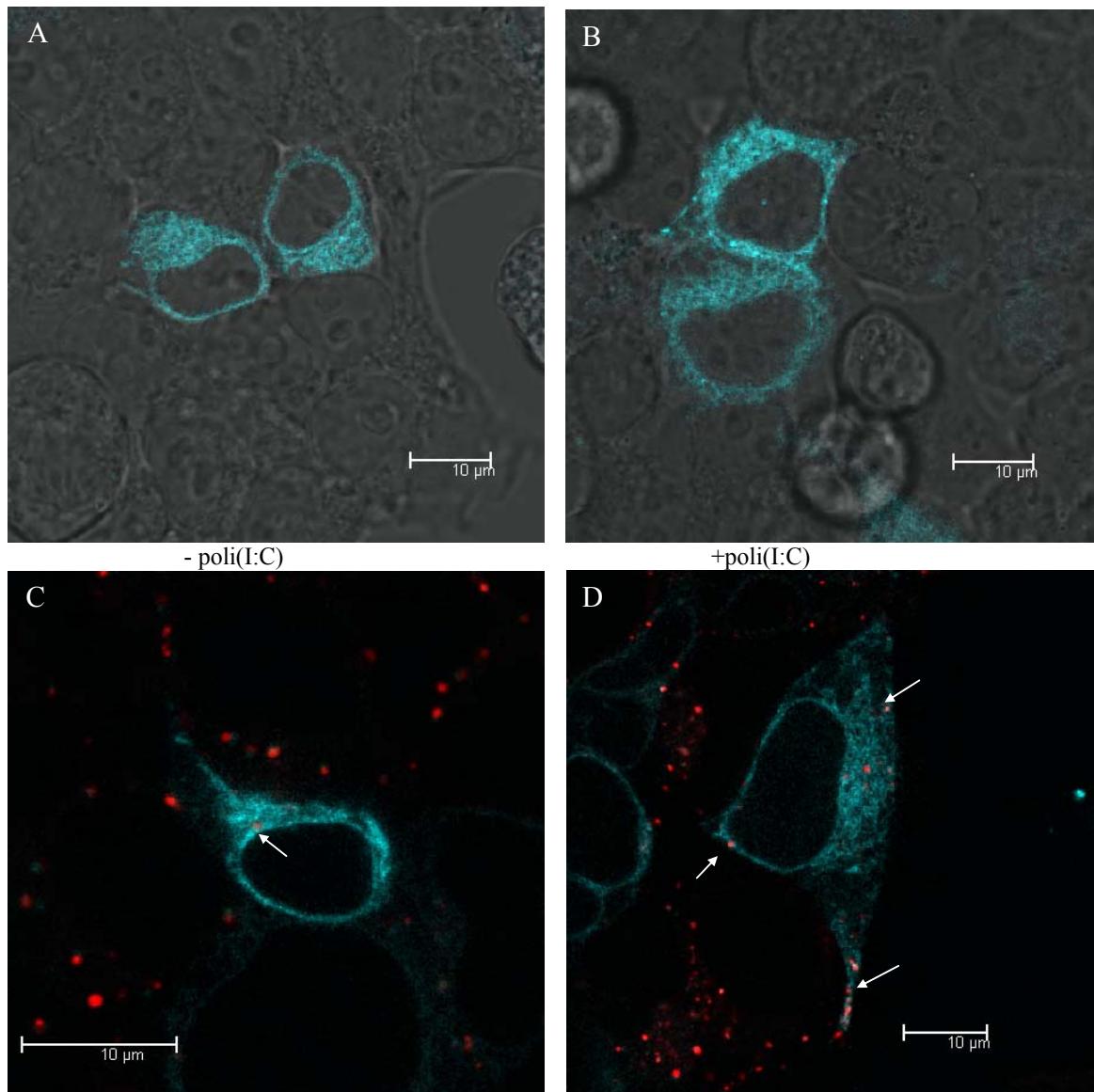
4.2.1 LOKALIZACIJA PROTEINA hTLR3-mCer IN OZNAČENE poli(I:C)



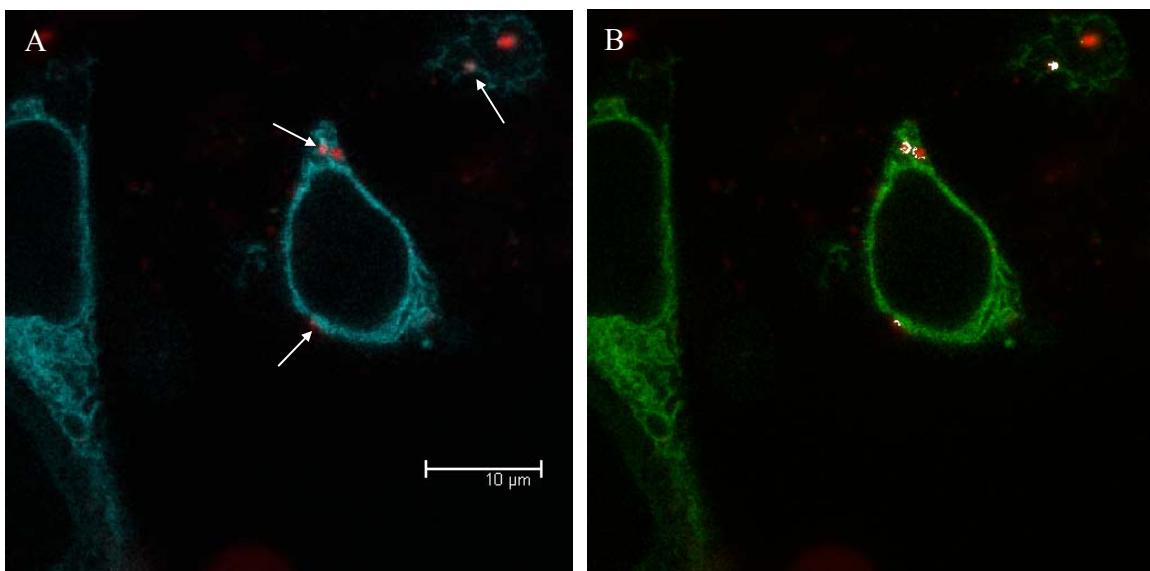
Slika 22: Kolokalizacija hTLR3-mCer in označene poli(I:C) ali označene poli(I:C) ob dodatku LL-37 v endosomih. Celice HEK293T so transfisirane s plazmidom phTLR3-mCer, stimulirane s poli(I:C)- Alexa Fluor hidrazid 633, endosomi so označeni s transferinom-AlexaFluor 564 konjugat. Slika A prikazuje celice stimulirane z označeno poli(I:C), slika C pa celice stimulirane z označeno poli(I:C) ob dodatku LL-37. Področja, kjer se izraža protein hTLR3-mCer, so označena modro. Zeleno so prikazani endosomi. S puščicami so prikazana mesta, kjer je prišlo do kolokalizacije transferina, označene poli(I:C) in hTLR3-mCer. Sliki B in D prikazujeta slike A in C obdelani v programu ImageJ z orodjem Colocalization Finder. Bele točke označujejo področja, kjer je prišlo do kolokalizacije transferina, poli(I:C) in proteina hTLR3-mCer.

Na slikah 22A in 22B lahko vidimo, da je prišlo do kolokalizacije proteina hTLR3-mCer in označene sintetične poli(I:C) v endosomih. Na sliki 22C in 22D smo celice stimulirali z označeno poli(I:C) ob dodatku neoznačenega peptida LL-37. Tudi v tem poskusu je prišlo do kolokalizacije hTLR3-mCer in označene poli(I:C) v endosomih. V primeru, ko smo poleg poli(I:C) dodali še LL-37, smo opazili (rezultati niso prikazani) tudi večje aggregate označene poli(I:C) zunaj celic.

4.2.2 VPLIV STIMULACIJE ENEGA TLR NA PREMIK DRUGEGA TLR

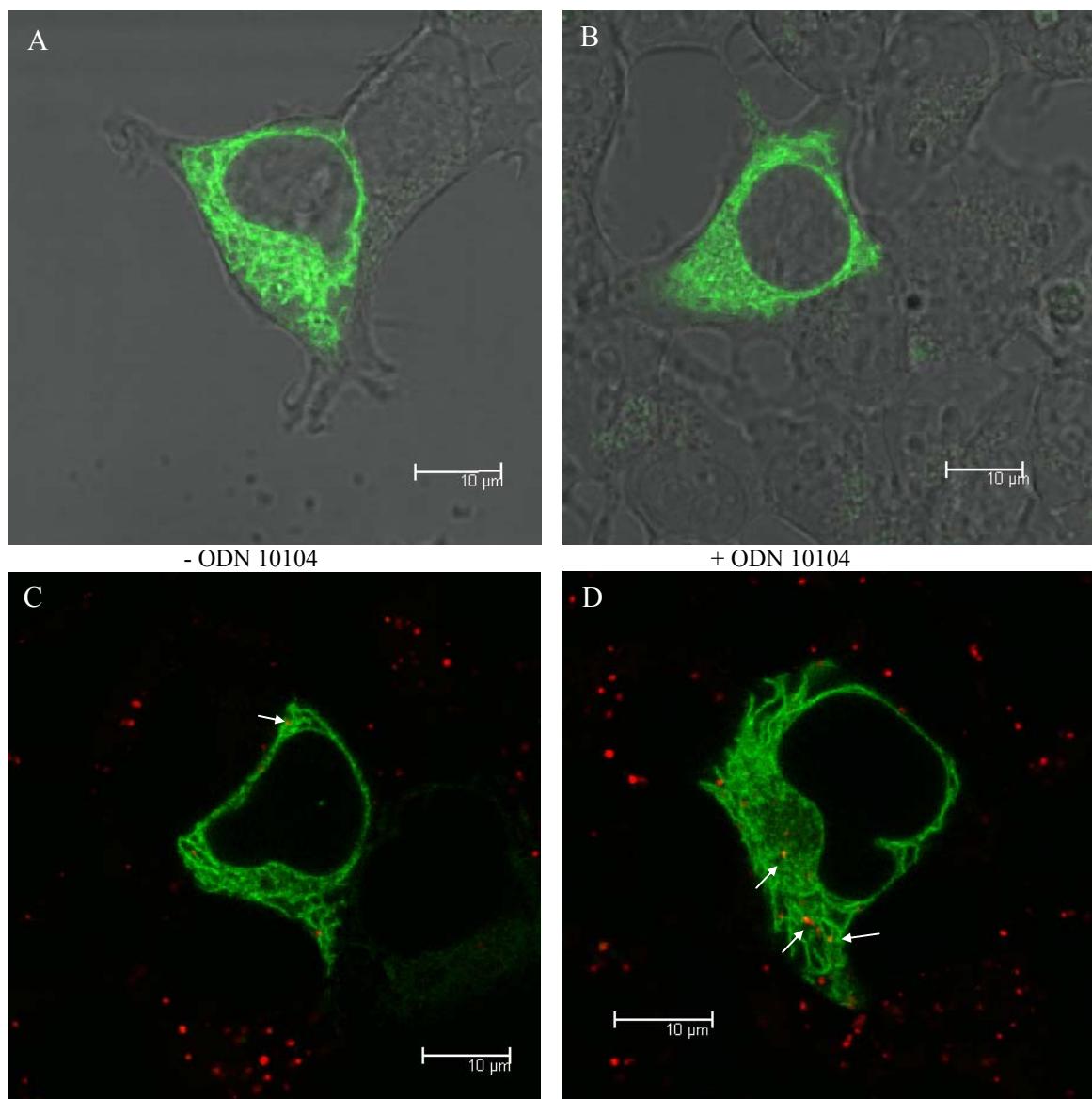


Slika 23: Stimulacija s poli(I:C) poveča lokalizacijo hTLR3-mCer v lizosomskih veziklih. Celice HEK293T so transfirane s plazmidom phTLR3-mCer. Sliki A in C prikazujeta nestimulirane celice HEK293T, sliki B in D pa celice stimulirane s poli(I:C). Področja, kjer se himerni protein izraža, so označena modro. Rdeče so prikazani lizosomi, ki so barvani z LysoTracker Red DND-99 (C,D). S puščicami so na sliki prikazana mesta, kjer je prišlo do kolokalizacije barvila LysoTracker Red DND-99 in proteina hTLR3-mCer.

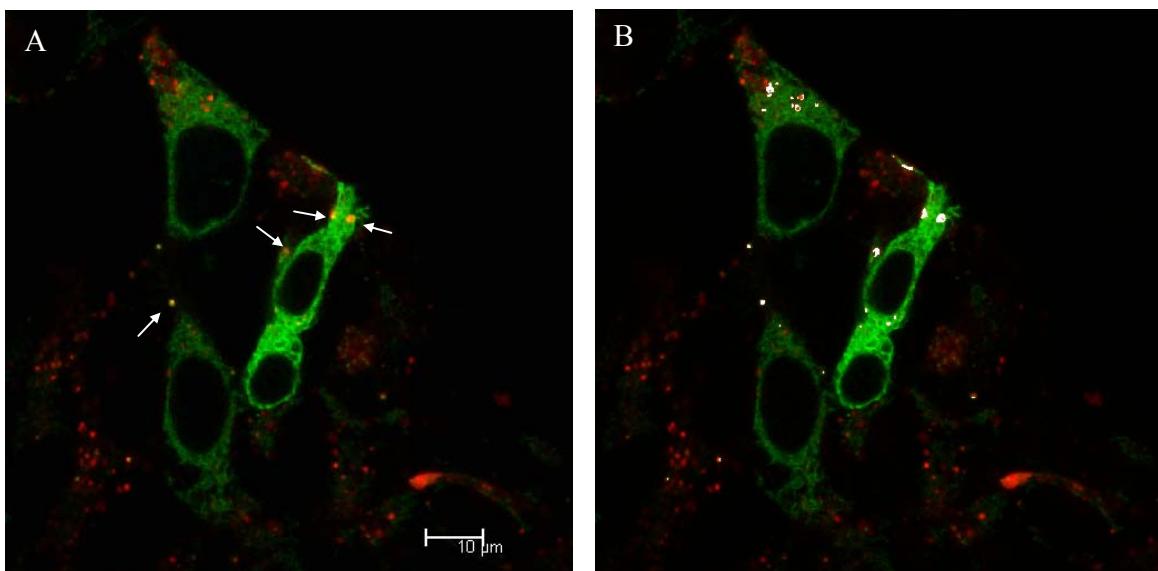


Slika 24: Stimulacija s poli(I:C) poveča lokalizacijo hTLR3-mCer v endosomih. Celice HEK293T so transficirane s plazmidom phTLR3-mCer in označene s transferinom-AlexaFluor 633 konjugatom. Slika A prikazuje s poli(I:C) stimulirane celice HEK293T. Področja, kjer se himerni protein izraža, so označena modro. Rdeče so prikazani endosomi, ki so označeni s transferinom-AlexaFluor 633. S puščicami so na sliki prikazana mesta, kjer je prišlo do kolokalizacije transferina in proteina hTLR3-mCer. Slika B prikazuje sliko obdelano v programu ImageJ z orodjem za iskanje kolokalizacije (Colocalization). Področja, kjer se izraža himerni protein, so označena zeleno. Rdeče so prikazani endosomi označeni s transferinom-AlexaFluor 633, bele točke označujejo področja, kjer je prišlo do kolokalizacije transferina in proteina hTLR3-mCer.

Slike 23 in 24 prikazujeta poskus, pri katerem smo celice HEK293T, ki so izražale protein hTLR3-mCer, stimulirali z neoznačeno poli(I:C) (slike 23B,D in 24A,B). Razvidno je, da je prišlo do premika hTLR3-mCer v endosomske in lizosomske vezikle. Pri stimuliranih celicah je bila kolokalizacija izrazitejša.

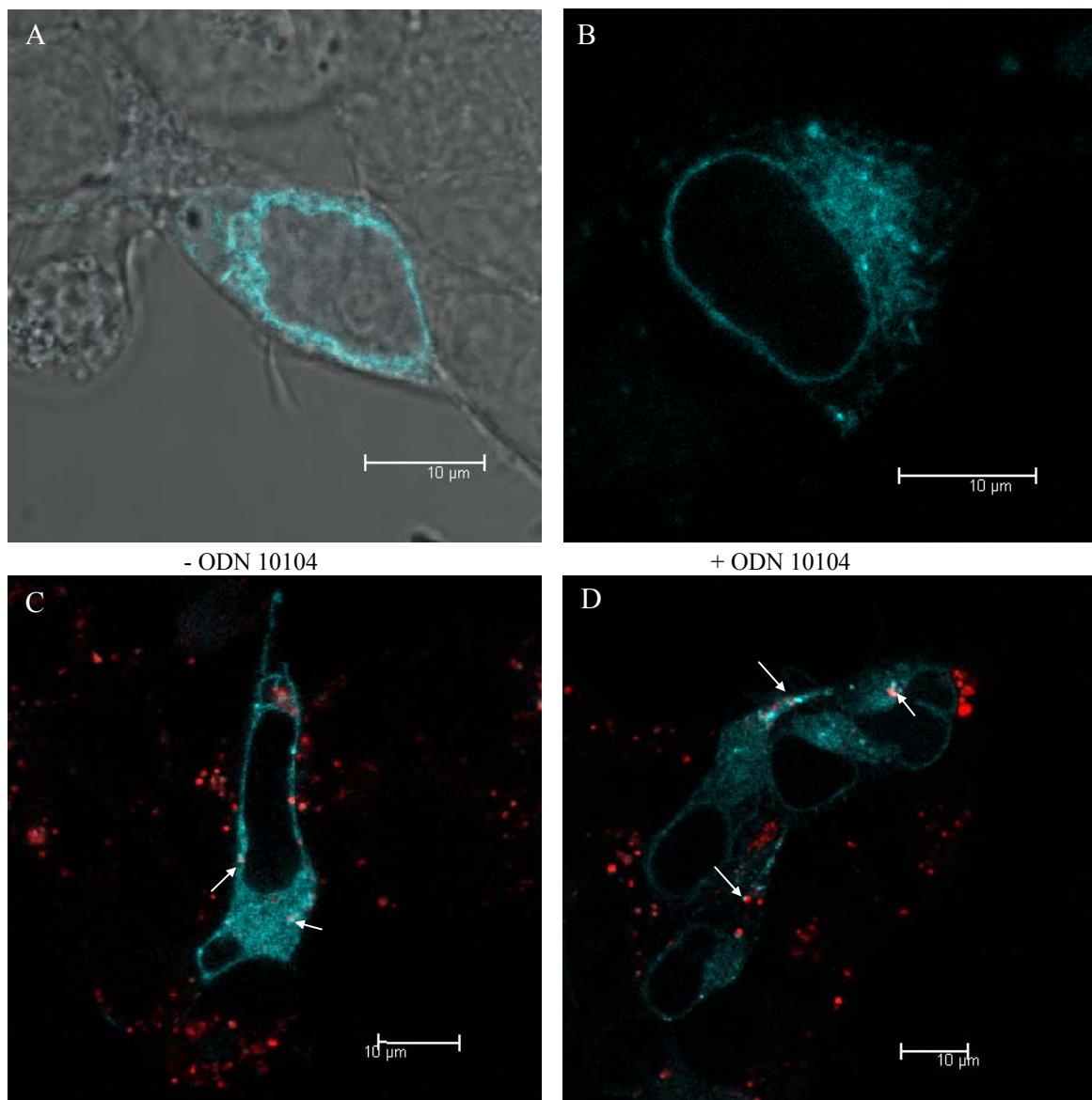


Slika 25: Stimulacija z ODN 10104 poveča lokalizacijo hTLR9-YFP v lizosomskih veziklih. Celice HEK293T so transficiirane s plazmidom pHTLR9-YFP. Sliki A in C prikazujeta nestimulirane celice HEK293T, sliki B in D pa celice stimulirane z ODN 10104. Področja, kjer se himerni protein izraža, so označena zeleno. Rdeče so prikazani lizosomi, ki so označeni z Lysotracker Red DND-99 (C,D). S puščicami so na sliki prikazana mesta, kjer je prišlo do kolokalizacije barvila Lysotracker Red DND-99 in proteina hTLR9-YFP.

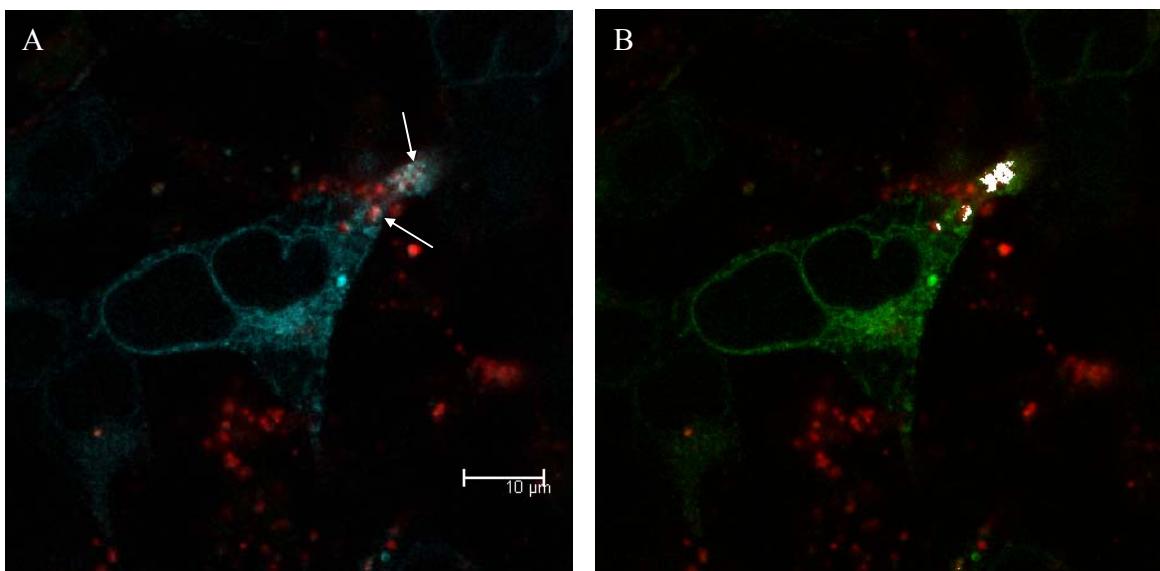


Slika 26: Stimulacija z ODN 10104 poveča lokalizacijo hTLR9-YFP v endosomih. Celice HEK293T so transficirane s plazmidom phTLR9-YFP in označene s transferinom-AlexaFluor 633 konjugatom. Slika A prikazuje z ODN 10104 stimulirane celice HEK293T. Področja, kjer se himerni protein izraža, so označena zeleno. Rdeče so prikazani endosomi, ki so označeni s transferinom-AlexaFluor 633. S puščicami so na sliki prikazana mesta, kjer je prišlo do kolokalizacije transferina in proteina hTLR9-YFP. Slika B prikazuje sliko obdelano v programu ImageJ z orodjem za iskanje kolokalizacije (Colocalization). Področja, kjer se izraža himerni protein, so označena zeleno. Rdeče so prikazani endosomi označeni s transferinom, bele točke označujejo področja, kjer je prišlo do kolokalizacije transferina in proteina hTLR9-YFP.

Slike 25 in 26 prikazujeta celice HEK293T, ki so izražale protein hTLR9-YFP, stimulirane z neoznačenim ODN 10104 (sliki 25B,D in 26A,B). Razvidno je, da je prišlo do kolokalizacije hTLR9-YFP v lizosomske vezikle in endosome. Pri stimuliranih celicah je bila kolokalizacija izrazitejša.

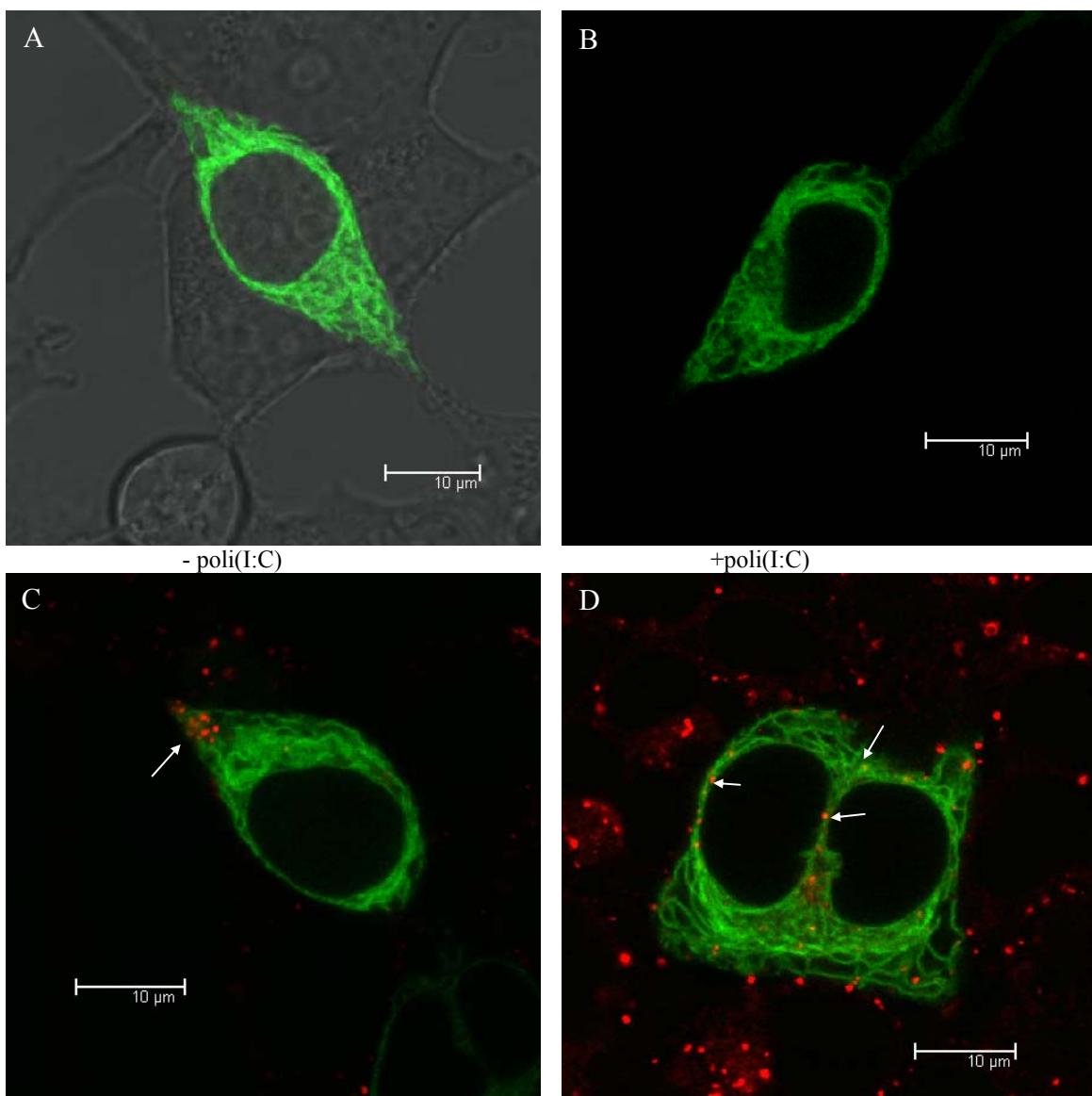


Slika 27: Stimulacija z ODN 10104 poveča lokalizacijo hTLR3-mCer v lizosomskih veziklih. Celice HEK293T so transfisirane s plazmidoma phTLR3-mCer in phTLR9-HA. Sliki A in C prikazujeta nestimulirane celice HEK293T, sliki B in D pa celice stimulirane z ODN 10104. Področja, kjer se izraža himerni protein hTLR3-mCer, so označena modro. Rdeče so prikazani lizosomi, barvani z Lysotracker Red DND-99 (C,D). S puščicami so na sliki prikazana mesta, kjer je prišlo do kolokalizacije barvila Lysotracker Red DND-99 in proteina hTLR3-mCer.

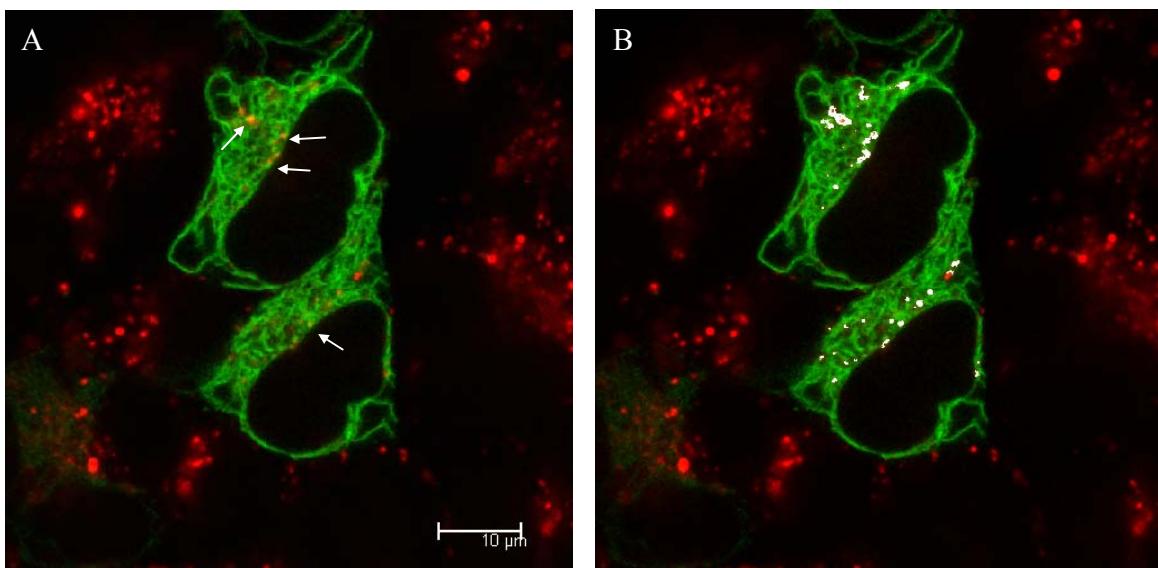


Slika 28: Stimulacija z ODN 10104 poveča lokalizacijo hTLR3-mCer v endosomih. Celice HEK293T so transfisirane s plazmidoma phTLR3-mCer in phTLR9-HA in označene s transferinom-AlexaFluor 633 konjugatom. Slika A prikazuje celice HEK293T, stimulirane z ODN 10104. Področja, kjer se izraža himerni protein hTLR3-mCer, so označena modro. Rdeče so prikazani endosomi označeni s transferinom. S puščicami so na sliki prikazana mesta, kjer je prišlo do kolokalizacije transferina in proteina hTLR3-mCer. Slika B prikazuje sliko obdelano v programu ImageJ z orodjem za iskanje kolokalizacije (Colocalization). Področja, kjer se izraža himerni protein, so označena zeleno. Rdeče so prikazani endosomi barvani s transferinom, bele točke označujejo področja, kjer je prišlo do kolokalizacije transferina in proteina hTLR3-mCer.

Slike 27 in 28 celice HEK293T, ki so izražale označen receptor hTLR3-mCer in neoznačen receptor hTLR9-HA, stimulirane z ligandom za hTLR9-HA ODN 10104. Pod mikroskopom smo lahko opazovali le lokalizacijo hTLR3-mCer. Na slikah 27D in 28A, B vidimo, da je stimulacija z ligandom ODN 10104 vplivala na premik hTLR3-mCer v lizosomske vezikle in endosome.



Slika 29: Stimulacija s poli(I:C) poveča lokalizacijo hTLR3-mCer v lizosmskih veziklih. Celice HEK293T so transficirane s plazmidoma phTLR9-YFP in phTLR3. Slike A in C prikazujeta nestimulirane celice HEK293T, slike B in D pa celice stimulirane s poli(I:C). Področja, kjer se izraža himerni protein hTLR9-YFP, so označena modro. Rdeče so prikazani lizosomi, ki so barvani z Lysotracker Red DND-99 (C,D). S puščicami so na sliki prikazana mesta, kjer je prišlo do kolokalizacije barvila Lysotracker Red DND-99 in proteina hTLR9-YFP.



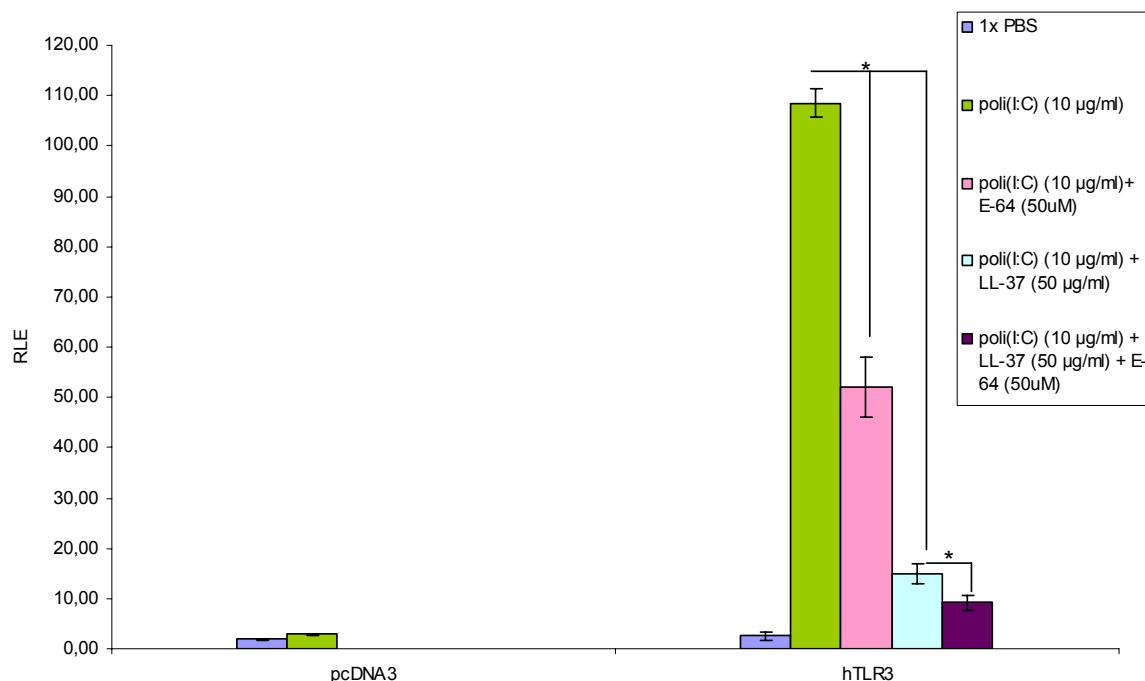
Slika 30: Stimulacija s poli(I:C) poveča lokalizacijo hTLR9-YFP v endosomih. Celice HEK293T so transfisirane s plazmidoma phTLR9-YFP in phTLR3 ter označene s transferinom-AlexaFluor 633 konjugatom. Slika A prikazuje celice HEK293T, stimulirane s poli(I:C). Področja, kjer se izraža himerni protein hTLR9-YFP, so označena zeleno. Rdeče so prikazani endosomi označeni s transferinom. S puščicami so na sliki prikazana mesta, kjer je prišlo do kolokalizacije transferina in proteina hTLR9-YFP. Slika B prikazuje sliko obdelano v programu ImageJ z orodjem za iskanje kolokalizacije (Colocalization). Področja, kjer se izraža himerni protein, so označena zeleno. Rdeče so prikazani endosomi označeni s transferinom, bele točke označujejo področja, kjer je prišlo do kolokalizacije transferina in proteina hTLR9-YFP.

Slike 29 in 30 prikazujeta celice HEK293T, ki so izražale označen receptor hTLR9-YFP in neoznačen receptor hTLR3, stimulirane z ligandom za hTLR3 poli(I:C). Pod mikroskopom smo lahko opazovali le lokalizacijo hTLR9-YFP. Na slikah 29D in 30A, B lahko vidimo, da so se nestimulirani receptorji hTLR9-YFP premaknili v lizosomske vezikle in endosome. Pri stimuliranih celicah je bila kolokalizacija izrazitejša.

4.3 VPLIV PROTEAZ NA SIGNALIZACIJO PREKO RECEPTORJA TLR3

4.3.1 REZULTATI MERJENJA LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI

4.3.1.1 Vpliv inhibitorja E-64 in peptida LL-37 na signalizacijo preko hTLR3

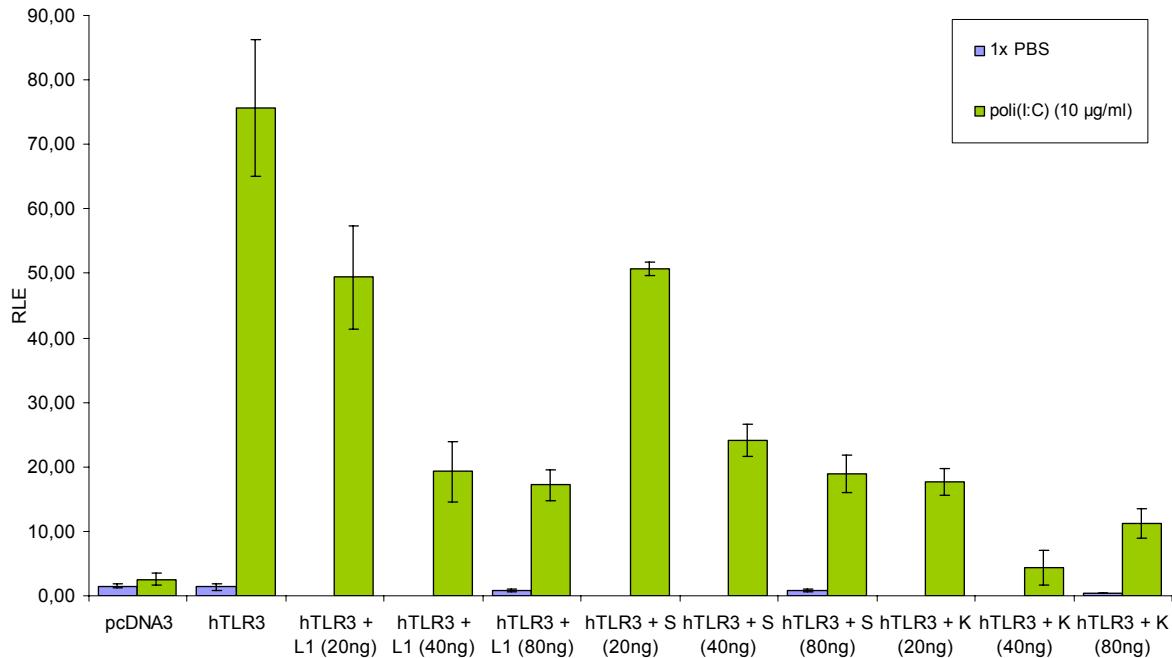


* $p < 0.01$

Slika 31: Vpliv različnih stimulacijskih mešanic na signalizacijsko pot preko hTLR3. Način stimulacije je prikazan v legendi.

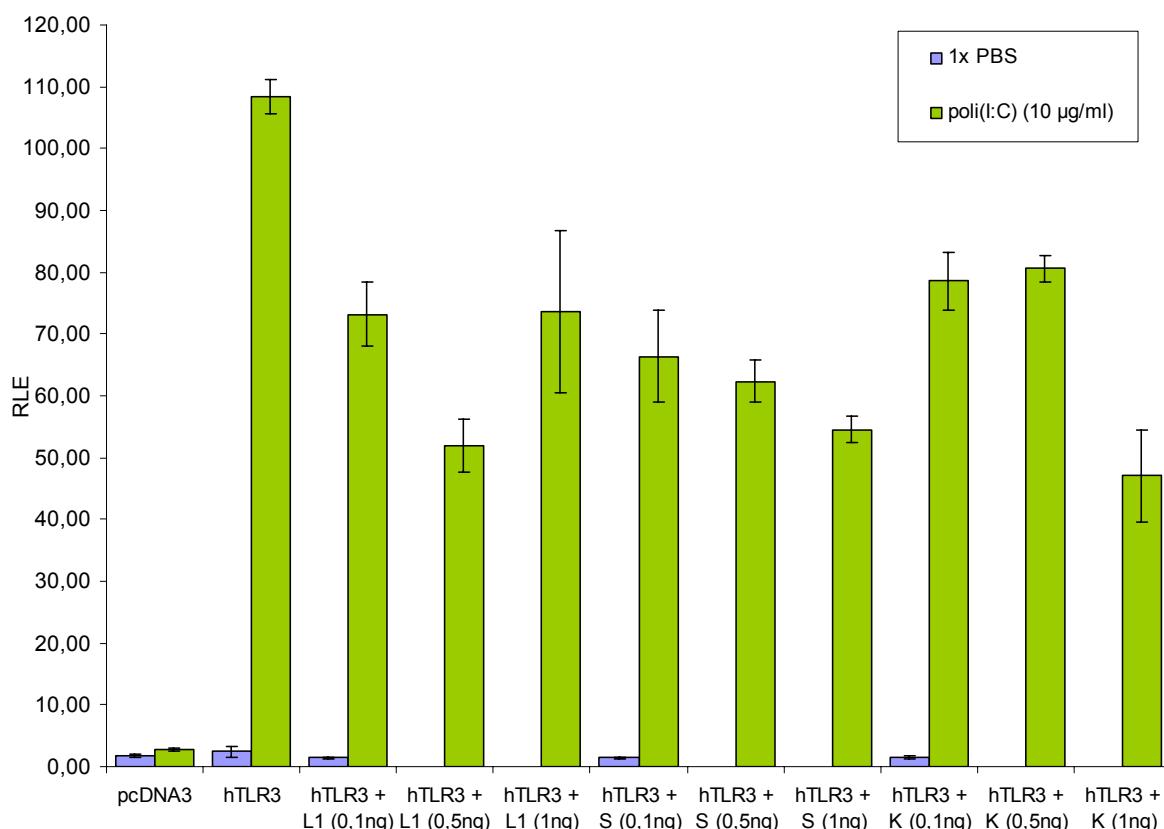
Slika 31 prikazuje vpliv na signalizacijo poly(I:C) preko hTLR3. Stimulacija z 1-kratnim PBS predstavlja odziv nestimuliranih celic. Rezultati kažejo, da inhibitor cisteinskih proteaz vpliva na signalizacijo poly(I:C). Odziv celic se je zmanjšal. Do zmanjšanja odziva glede na stimulacijo s samo poly(I:C) je prišlo tudi ob stimulaciji s poly(I:C) ob dodatku peptida LL37. Do najmanjšega odziva je prišlo ob stimulaciji s poly(I:C) in dodatku peptida LL-37 in inhibitorja E-64. Transfekcija s pcDNA3 je predstavljala negativno kontrolo.

4.3.1.2 Vpliv katepsinov na signalizacijo preko hTLR3



Slika 32: Vpliv količine katepsinov (L1, S in K) na signalizacijsko pot preko hTLR3 ob stimulaciji s poli(I:C).

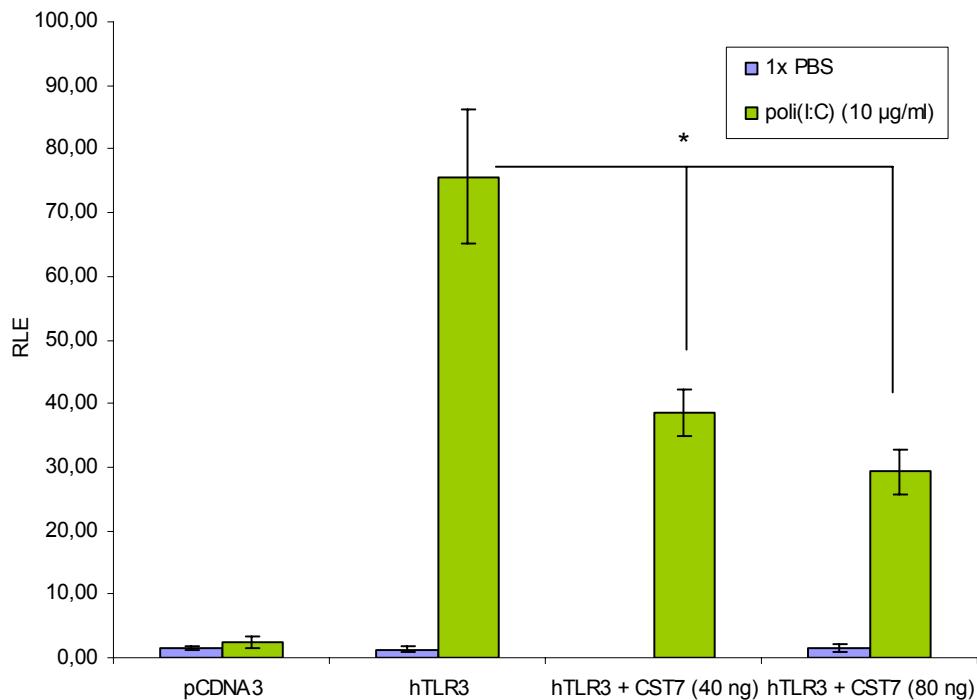
Slika 32 prikazuje vpliv različnih koncentracij katepsinov na signalizacijsko pot preko hTLR3 s poli(I:C). Rezultati kažejo, da je vpliv vseh katepsinov podoben in sicer, da zmanjšajo odziv ob stimulaciji poli(I:C). Odziv z naraščajočo količino katepsina pada. To velja za vse katepsine, razen pri transfekciji z 80 ng plazmida za katepsina K, kjer je odziv višji kot pri transfekciji s 40 ng plazmida za katepsina K. To bi bila lahko tudi posledica eksperimentalne napake. Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili, da bomo testirali še tri manjše količine (0,1 ng, 0,5 ng in 1 ng).



Slika 33: Vpliv količine katepsinov (L1, S in K) na signalizacijsko pot preko hTLR3 ob stimulaciji s poli(I:C).

Slika 33 prikazuje vpliv različnih koncentracij katepsinov na signalizacijsko pot preko hTLR3 s poli(I:C). Uporabili smo manjše količine katepsinov. Rezultati kažejo, da so tudi manjše koncentracije katepsinov vplivale na zmanjšanje odziva ob stimulaciji s poli(I:C) glede na pozitivno kontrolo. Odziv z naraščajočo količino katepsina pada. To velja za katepsina S in K, medtem ko je pri katepsinu L1 ob transfekciji z 0,5 ng plazmida odziv manjši, kot pri transfekciji z 1 ng plazmida. Tudi to bi bila lahko tudi posledica eksperimentalne napake.

4.3.1.3 Vpliv cistatina 7 na signalizacijo preko hTLR3

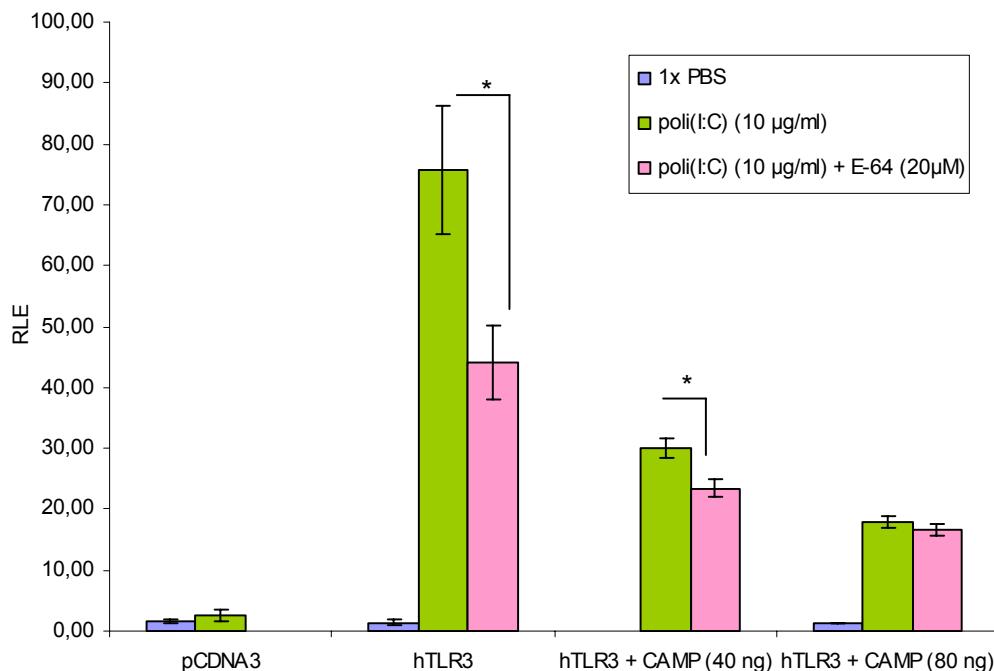


* $p < 0.01$

Slika 34: Vpliv količine inhibitorja cistatina F na signalizacijsko pot preko hTLR3 ob stimulaciji s poly(I:C).

Slika 34 prikazuje vpliv količine dodanega plazmida (pCST7) z zapisom za človeški cistatin F. Z naraščajočo količino inhibitorja odziv na stimulacijo s poly(I:C) pada. Inhibicija je glede na pozitivno kontrolo statistično značilna na 99-odstotnem intervalu zaupanja.

4.3.1.4 Vpliv hCAP-18 na signalizacijo preko hTLR3

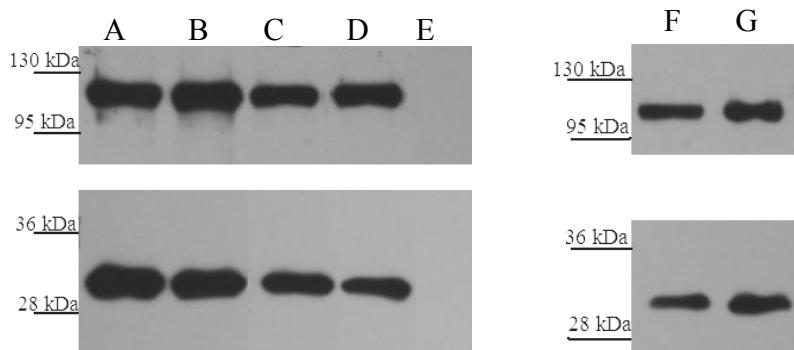


* $p < 0.01$

Slika 35: Vpliv količine proteina hCAP-18 (človeški katelicidin) na signalizacijsko pot preko hTLR3 ob stimulaciji s poli(I:C) ali poli(I:C) ob dodatki inhibitorja E-64.

Slika 35 prikazuje vpliv količine dodanega plazmida (pCAMP) z zapisom za človeški katelicidin hCAP-18. Z naraščajočo količino proteina odziv pada. Zmanjšuje se tudi odziv na poli(I:C) v kombinaciji z inhibitorjem E-64.

4.3.2 REZULTATI DOKAZOVANJA IZRAŽANJA PROTEINOV



Slika 36: Imunodetekcija proteinov hTLR3 in mCerulean. Na sliki zgornja vrstica predstavlja rezultate detekcije hTLR3 z 1 : 250 redčenimi monoklonskimi primarnimi protitelesi proti TLR3 ter 1 : 4000 redčenimi protimišjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo. Spodnja vrstica predstavlja rezultate detekcije proteina mCerulean z 1 : 6000 redčenimi poliklonskimi primarnimi zajčjimi protitelesi proti GFP ter 1 : 6000 redčenimi protizajčjimi sekundarnimi protitelesi konjugiranimi s hrenovo peroksidazo. Poleg smo nanesli še proteinski standard Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder. Ekspozicija filma je trajala 2 minuti. Oznake od A do G ustrezajo oznakam v preglednici 25.

Slika 36 prikazuje detekcijo izražanja proteinov hTLR3 in mCerulean. Dobljene lise ustrezajo pričakovani velikosti proteinov.

Preglednica 26: Rezultati merjenja intenzitete lis iz filmov dobljenih po imunodetekciji proteinov. Oznake od A do G ustrezajo oznakam v preglednici 25.

	pUNO-hTLR3 A	pUNO-hTLR3 B	pUNO-hTLR3 C	pUNO-hTLR3 D	pUNO-hTLR3 F	pUNO-hTLR3 G	Negativna kontrola E
Intenziteta lise (INT1)							
hTLR3	186,712	197,736	176,276	181,418	162,431	160,776	0,000
Intenziteta lise mCerulean-C1 (INT2)	203,031	183,365	174,273	158,380	152,091	167,202	0,000
Razmerje (INT1/INT2)	0,92	1,08	1,01	1,15	1,07	0,96	/

Iz razmerja intenzitete lis lahko sklepamo na razlike v izražanju proteinov. Iz podatkov v preglednici 26 lahko sklepamo, da je razlika v izražanju majhna. Standardni odklon med rezultati (razmerje INT1/INT2) je 0,083.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Receptorji TLR imajo pomembno vlogo pri imunskega odziva na patogene mikroorganizme in povezujejo prisojeno imunost s pridobljeno. TLR specifično prepoznavajo ohranjene molekulske motive patogenih mikroorganizmov.

Pri izdelavi diplomske naloge smo se osredotočili na dva receptorja, ki prepoznavata nukleinske kisline. Receptor TLR3 prepozna dvočlenne RNK virusov, receptor TLR9 pa enoverično bakterijsko DNK z nemetiliranimi CpG motivi. Oba se nahajata v lumnu endosomov in lizosomov. V teh razdelkih je pH okolice najbolj primern za vezavo nukleinske kisline na receptor. Podobna je tudi njuna lokalizacija v nestimuliranih celicah, saj se oba nahajata v ER. Ob stimulaciji pa se premakneta v zgodnje endosome direktno iz ER in ne preko sekretorne poti iz Golgijskega aparata (Latz in sod., 2004).

Za človeški receptor TLR9 je bilo v zadnjem času narejenih kar nekaj raziskav, ki kažejo, da imajo pri njegovem prepoznavanju ligandov katepsini pomembnejšo vlogo. Poleg tega pa v povezavi s peptidi in proteinimi, ki vežejo nukleinske kisline, prepoznavajo tudi lastne nukleinske kisline in tako sodeluje pri nastanku avtoimunskih bolezni kot sta luskavica in sistemski eritematozni lupus (Lande in sod., 2007). Vpliv proteaz smo želeli pokazati tudi za receptor TLR3.

Znano je tudi, da stimulacija enega receptorja vpliva lokalizacijo in izražanje drugih receptorjev in tako poveča občutljivost celic (tako imenovana senzibilizacija), vendar pa pretiran odziv lahko vodi v sepsko (Pestka in Zhou, 2006). Zanimalo nas je, če obstaja povezava v lokalizaciji v endosome preko aktivacije z ligandom tudi med tudi med receptorjem TLR3 in TLR9.

5.1.1 MEDSEBOJNO DELOVANJE ENDOSOMALNIH TLR OB STIMULACIJI Z LIGANDOM

Kot so že dokazali (Johnsen in sod., 2006), smo večino proteina hTLR3-mCer videli v ER, kjer se nahaja tudi v nestimuliranih celicah. Johnsen in sodelavci (2006) so dokazali tudi kolokalizacijo fluorescentno označene dvočlenih RNK in receptorja hTLR3 v HEK293 celicah. V diplomskem delu smo lokalizacijo določali na celicah HEK293T. Naši rezultati se ujemajo z že omenjenimi rezultati raziskovalcev, saj smo dokazali kolokalizacijo označene poli(I:C) in hTLR3-mCer v endosomih. Tako kot so ugotovili že Johnsen in sodelavci (2006), smo tudi mi opazili večino označenega receptorja v ER.

Pokazali smo, da dodatek LL-37 ob stimulaciji s poli(I:C) ne prepreči prehoda poli(I:C) v endosome. Ne moremo pa z gotovostjo trditi, da je označena poli(I:C) v endosomih prosta ali pa je v celice prišla skupaj s peptidom LL-37 saj nismo uporabljali označenega peptida.. Lande in sodelavci (2007) so z uporabo označenega peptida LL-37 na DC dokazali, da se označena človeška DNK ali CpG DNK in peptid pojavljajo v skupnih kompartimenti. Zunaj celic smo opazili tudi večje agregate označene poli(I:C), ki jih v primerih stimulacije samo z označeno poli(I:C) nismo. Zaradi teh agregatov je bil del poli(I:C) vsaj 4 ure po stimulaciji še nedostopen celicam. To bi lahko razložilo tudi zmanjševanje aktivacije TLR3 s poli(I:C) ob prisotnosti LL-37.

Znano je, da pri signalizaciji preko receptorjev TLR prihaja do vpliva stimuliranega receptorja na lokalizacijo in izražanje sorodnega receptorja (Pestka in Zhou, 2006). Mehanizmi tako imenovane senzibilizacije so bolj podrobno raziskani na receptorjih TLR2 in TLR4. Aktivacija TLR4 povzroči povečano izražanje receptorja TLR2. Poveča pa se tudi količina proteina (TLR2) na zunanjih membranah (Lin in sod., 2000). V diplomskem delu smo pokazali, da obstaja povezava tudi med receptorjema hTLR3 in hTLR9. Ob stimulaciji neoznačenega receptorja v lizosomske vezikle in endosome premaknil tudi označeni receptor.

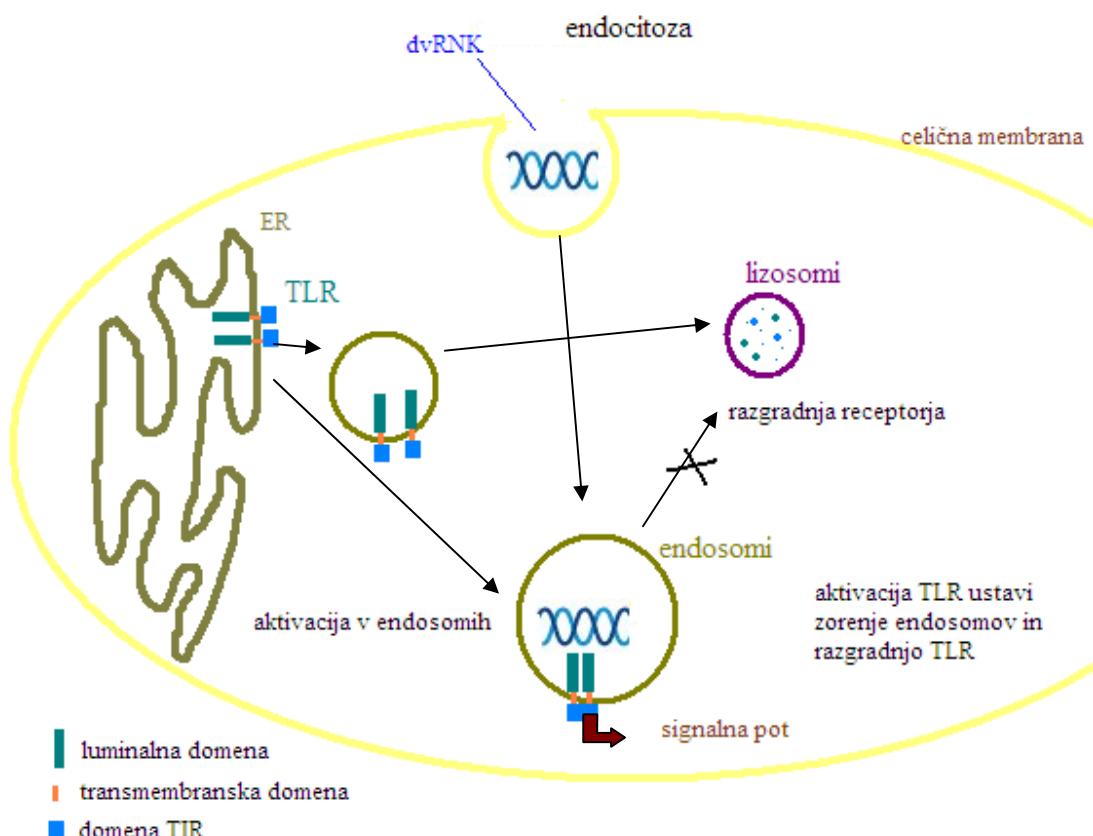
Dobljen rezultati nakazujejo, da ob stimulaciji receptorja vplivata eden na drugega. S konfokalno mikroskopijo je sicer možno pridobiti tudi kvantitativne podatke o kolokalizaciji, s katerimi bi lahko dokazali, da je pojav statistično značilen. V tem primeru bi morali analizirati večje število slik v več ravninah, da bi se prepričali, da je opažena kolokalizacija res posledica prisotnosti označenega proteina v endosomu in ne dveh ločenih signalov blizu skupaj.

Hipotezo o senzibilizaciji med receptorjema hTLR3 in hTLR9 bi lahko testirali še na druge načine. Signalizacijski poti receptorjev TLR3 in TLR9 sta ločeni. Prva je od TRIF odvisna pot, druga pa od MyD88 odvisna pot. Na koncu pride do aktivacije različnih transkripcijskih faktorjev. Z luciferaznim testom bi lahko preverili ali je prepis genov in izražanje kresničkine luciferaze hitrejše v primeru predčasnega premika receptorja v endosome. Na podoben način bi lahko spremljali tudi fosforilacijo proteinov, ki nastopajo v signalni kaskadi.

Če do regulacije pride tudi na nivoju izražanja proteinov, bi lahko to preverili s kvantitativnim PCR (RT-PCR), tako da bi pri stimuliranih in nestimuliranih celicah sledili izražanje mRNK za posamezen receptor. To metodo bi lahko uporabili tudi pri študiju izražanja mRNK za receptorje v dendritičnih celicah, ki so boljši sistem za raziskovanje odzivanja celic in receptorjev TLR na ligande.

Na zgoraj opisane načine bi lahko ugotovili, kakšen je mehanizem senzibilizacije, ki je povzročil premik nestimuliranega receptora v endosome. Ugotovili bi lahko, katera stopnja v signalizacijski poti je odgovorna za povečanje občutljivosti sorodnega receptorja.

Na sliki 37 smo prikazali model premika endosomalnih TLR receptorjev znotraj celice. V neaktiviranih celicah TLR receptorji prehajajo iz ER v endosome, se zlijejo z lizosomi in se nato razgradijo. Ob stimulaciji se ustavijo v endosomih, kjer vežejo endocitirano dvRNK in sprožijo odziv. Za natančnejšo postavitev modela bo potrebno v prihodnje ugotoviti mehanizem, preko katerega pride do senzibilizacije.



Slika 37: Model premika receptorjev iz ER v endosome. V primeru stimulacije in aktivacije receptorjev se le-ti ustavijo v endosomih, prepozna ligand in sprožijo signalno pot. Če stimulacije ni, se razgradijo.

5.1.2 VPLIV PROTEOLIZE NA SIGNALIZACIJO PREKO TLR3

Asagiri in sodelavci (2008) so na DC pokazali, da dodatek inhibitorja E-64 ob stimulaciji s poli(I:C) zmanjša ekspresijo mRNK za IFN- β . V diplomskem delu, smo pokazali smo, da dodatek inhibitorja E-64 zmanjša odziv ob stimulaciji s poli(I:C) tudi na celicah HEK293.

Proteaze imajo pomembno vlogo pri signalizaciji preko receptorja TLR3. Ob dodatku poli(I:C) v gojišče se le ta verjetno veže na kationske skupine različnih izvenceličnih proteinov. Z endocitozo kompleksi preidejo v endosome, kjer proteaze verjetno cepijo proteine in peptide. Poli(I:C) se sprosti iz kompleksov, se veže na receptor in sproži signalizacijsko pot.

Tudi z naraščajočo količino endogenega inhibitorja cistatina 7 je odziv na stimulacijo s poli(I:C) padal. Take rezultate smo pričakovali, saj so s tem inhibitorjem že dokazali zmanjšanje aktivnosti katepsinov (Hamilton in sod., 2008, Ni in sod., 1998). Encim je verjetno inhibiral endogene cisteinske proteaze, ki so odgovorne za razgradnjo proteinov, na katere se lahko veže poli(I:C). Da imajo proteaze pomembno vlogo pri odzivu receptorja hTLR3 na poli(I:C) smo dokazali tudi z dodatkom inhibitorja E-64.

Glede na lastnosti proteaz, rezultatov inhibicije endogenih proteaz (prikazani v diplomskem delu) in objavljene rezultate smo pričakovali, da se bo ob povečani količini katepsinov povečal odziv TLR3 na stimulacijo s poli(I:C). Skupine raziskovalcev (Matsumoto in sod., 2008; Asagiri in sod, 2008) so pokazale, da imajo katepsini pomembno vlogo pri signalizaciji preko receptorja TLR9. Rezultati naše hipoteze niso potrdili, saj je odziv na stimulacijo s poli(I:C) s količino katepsinov padal. Efekt je bil podoben, če smo za transfekcijo uporabili večje ali manjše količine plazmidov za katepsine. Zmanjšanje odziva bi bila lahko tudi posledica razgradnje proteina zaradi povečane količine proteaz, vendar rezultati proteinske sinteze kažejo, da receptor TLR3 ne razpade.

Rezultati vpliva katepsinov so začetni. Na rezultate lahko vpliva marsikaj, tudi vrsta celic. Celice HEK293, ki smo jih uporabljali, verjetno niso najboljši sistem za opazovanje teh efektov. Lahko pa je odziv značilnost samega receptorja TLR3. Avtorji, ki so opazovali vpliv katepsina K na signalizacijo preko hTLR3 in hTLR9 (Asagiri in sod, 2008) so uporabljali DC, Ba/F3 (Matsumoto in sod., 2008) in vranične limfocite B mišk brez zapisa za katepsin K. Za nadaljnje raziskave bi bilo potrebno poiskati možnosti, da bi vpliv posameznega katepsina preveri z utišanjem njegovega izražanja s siRNK. S siRNK so že preprečili izražanje katepsina L v žilnih endotelijskih celicah (Platt in sod., 2006).

Lande in sodelavci (2007) so pri študiju vpliva peptida LL-37 v povezavi s humano DNK uporabljali plazmacitoidne dendritične celice. Celice na človeško DNK niso odgovorile z izražanjem interferonov tipa 1. Odgovorile so v primeru, ko je bila DNK v kompleksu z LL-37. Pri našem eksperimentu je bil odziv na stimulacijo z mešanco LL-37 in poli(I:C) zmanjšan. Poli(I:C) se zaradi kationske skupine veže na peptid LL-37. Dostop v endosome s tem ni oviran, vendar je zaradi vezave na proteine in peptide dostopnost poli(I:C) za receptor zmanjša. Dodatek inhibitorja E-64 odziv še dodatno zmanjša.

Pri nadalnjih poskusih bi morali vpliv LL-37 preveriti na dendritičnih celicah. Na neodzivnost namreč lahko vpliva veliko dejavnikov, kot na primer sposobnost celic za fagocitozo.

Človeški katelicidin hCAP-18 je prekurzor protimikrobnega peptida LL-37, ki se sprosti po cepitvi s proteinazo 3 v zunajceličnem prostoru. Z naraščajočo količino plazmida, s katerim smo transficirali celice, odziv na stimulacijo s poli(I:C) pada. Zmanjšuje se tudi odziv na poli(I:C) v kombinaciji z inhibitorjem E-64.

Zmanjšanje odziva HEK293 na stimulacijo s poli(I:C) bi lahko razložili na podoben način, kot pri stimulaciji s poli(I:C) ob dodatku LL-37. Poli(I:C) se verjetno veže na LL-37, ki se je sprostil po cepitvi hCAP-18, zato ni več dostopna in sproži manjši odziv. Zelo verjetno je, da

bi se poli(I:C) lahko vezala tudi na hCAP-18 še pred cepitvijo, saj le-ta vsebuje veliko kationsko skupino.

5.1.3 NADALJNJE RAZISKAVE

Za nadaljnje raziskave vpliva katepsinov in peptida LL-37 bi morali uporabiti bolj specializirane celice imunskega sistema, kot so dendritične celice, B limfociti, monociti ter spremljati nastanek IFN - α in drugih citokinov kot odgovor na stimulacijo.

Ker so bili naši rezultati delovanja katepsinov drugačni od rezultatov s TLR9, bi morali ugotoviti če so omenjeni rezultati značilnost TLR3, ali pa so morebiti odvisni od tipa celic.

Raziskovanja vpliva katepsinov bi se morali lotiti tako, da preprečimo izražanje posameznega katepsina ter na tak način sklepamo na njegovo vlogo.

Pri nadalnjih raziskavah senzibilizacije oziroma medsebojnega vpliva receptorjev hTLR3 in hTLR9 bi se bilo smiselno osredotočiti na študij izražanja posameznega receptorja. Poleg tega bi bilo zanimivo ugotoviti, če pride do hitrejšega odziva signalne poti ob predpostavki, da so receptorji v endosomih že pred stimulacijo z ligandom.

Preveriti bi morali, če tudi funkcionalno neaktivni TLR (mutacije v TIR domeni ali brez nje) in inhibitorni ODN povzročijo translokacijo ter, če na translokacijo vpliva dodatek bafilomicina, ki prepreči zakisanje endosomov.

5.2 SKLEPI

- Endogene proteaze imajo pri signaliziranju poli(I:C) preko receptorja hTLR3 pomembno vlogo, saj z njihovo inhibicijo odziv upade. Zmanjšanje odziva smo dosegli z inhibitorjem cisteinskih proteaz E-64 in cistatinom F. Poli(I:C) se lahko veže na različne proteine in peptide, ki lahko vežejo nukleinske kisline. Proteze v endosomih s hidrolizo proteinov verjetno sprostijo vezano poli(I:C), ki se nato veže na receptor.
- Ob transfekciji s katepsini smo opazili zmanjšanje odziva na poli(I:C) kar bo potrebno bolj podobno raziskati, saj na rezultate lahko vpliva tudi vrsta celic, lahko pa je pojav lastnost receptorja TLR3.
- Protein hCAP-18 je prekurzor protimikrobnega peptida LL-37. Glede na kontrolo se je odziv zmanjšal, tako kot se je zmanjšal tudi odziv na poli(I:C) v kompleksu z LL-37. Prekurzor in peptid vsebuje veliko kationsko skupino, ki lahko veže nukleinske kisline. Proteaze v endosomih sprostijo vezano poli(I:C), ki nato sproži stimulacijo.
- Dodatek peptida LL-37 ne prepreči vstopa poli(I:C) v celice in endosome.
- Stimulacija posameznega receptorja hTLR3 oziroma hTLR9 vpliva na lokalizacijo drugega. Dokazali smo, da se v primeru kotransfekcije ob stimulaciji s poli(I:C) v endosome premakne tudi hTLR9, ob stimulaciji z ODN 10104, pa se bo v endosome premaknil tudi hTLR3. Podatki so sicer kvalitativni, vendar lahko vseeno sklepamo, da med receptorji pride do senzibilizacije. Mehanizem tega pojava bo potrebno preveriti z nadaljnimi raziskavami.

6 POVZETEK

Človek je neprestano v stiku z mikroorganizmi, ki lahko vdrejo v organizem in povzročijo bolezni. Zaradi prirojenega in specifičnega imunskega sistema, okužbe naše telo omeji. Ključno je hitro prepoznavanje tujka in ustrezni odgovor. Receptorji TLR imajo pri tem pomembno vlogo, saj specifično prepoznavajo ohranjene molekulske motive patogenih mikroorganizmov.

Pri receptorjih, ki se nahajajo na plazemski membrani so interakcije med sorodnimi receptorji (povezovanje receptorja TLR2 z TLR1 ali TLR6) ali pa drugimi molekulami (TLR4, LPB, MD-2 in CD14) dokaj dobro raziskane. Te interakcije so kritične za prepoznavanje molekulskeih vzorcev in odgovor nanje. Pri receptorjih, ki se nahajajo v znotrajceličnih kompartimentih, so te interakcije in molekule, ki vplivajo na interakcije liganda z receptorji, manj poznane.

V ta namen smo pri izdelavi naloge poskušali odkriti, kako na aktivacijo receptorja TLR3 vplivajo proteaze, ki se nahajajo v endosomih ter proteini, ki vežejo nukleinske kisline. V preteklih študijah so se namreč na podoben način lotili obravnavanja receptorja TLR9. Dokazali so namreč, da imajo katepsini pomembno vlogo pri signaliziranju preko TLR9 (Matsumoto in sod., 2007), povezava humane DNK na peptid LL-37 pa omogoči močnejšo aktivacijo TLR9 in vodi do nastanka avtoimunskih bolezni kot sta luskavica in eritematozni lupus (Lande in sod., 2007). Naši rezultati potrjujejo, da imajo proteaze tudi pri signalizaciji preko TLR3 pomembno vlogo, ker njihova inhibicija odziv zmanjša. LL-37 pa je povzročil zmanjšanje odziva na poli(I:C). V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno uporabiti bolj specializirane celice imunskega sistema kot so na primer dendritične celice.

Odziv na mikroorganizme je kompleksen, ker lahko aktivirajo več receptorjev in različne signalne poti. Med njimi lahko pride tudi do tolerance in senzibilizacije.

Znano je tudi, da stimulacija enega receptorja vpliva izražanje drugih receptorjev in tako poveča občutljivost celic, vendar pa lahko na ta način pride do pretiranega odziva (Pestka in Zhou, 2006; Nansen in Thomsen, 2001). Zanimalo nas je, če tako povezava obstaja tudi med receptorjema TLR3 in TLR9. Rezultati kažejo, da povezava obstaja, saj se v primeru kotransfekcije celic HEK293T z obema receptorjema ob stimulaciji z ligandom za en receptor v endosome premakne tudi drugi.

Interakcije med receptorji ter ostalimi molekulami so kompleksne. Poznavanje vseh vplivov bo omogočilo boljši vpogled v signalne poti in odkritje načinov njihove modifikacije kot možne terapije bolezni kot so sepsa in avtoimunske bolezni.

VIRI

Akira S., Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews: Immunology*, 4: 499–511.

Anders H. J., Zeher D., Pawar R. D., Patole P. S. 2005. Molecular mechanisms of autoimmunity triggered by microbial infection. *Arthritis Research & Therapy*, 7, 5: 215-224.

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.

Asagiri M., Hirai T., Kunigami T., Kamano S., Gober H. J., Okamoto K., Nishikawa K., Latz E., Golenbock D. T., Aoki K., Ohya K., Imai Y., Morishita Y., Miyazono K., Kato S., Saftig P., Takayanagi H. 2008. Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science*, 319, 5863: 624-627.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 2002. Short protocols in molecular biology. 5th ed. New York, John Wiley and Sons: 1512 str.

Barrett A. J., Kembhavi A. A., Brown M. A., Kirschke H., Knight C. G., Tamai M., Hanada K. 1982. L-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochemical Journal*, 201: 189-198.

Barrat F. J., Meeker T., Gregorio J., Chan, J. H, Uematsu S., Akira S., Chang B., Duramad O., Coffman R.L. 2005. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *Journal of Experimental Medicine*, 202, 8: 1131-1139.

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, 23: 8792-8797.

Bell J. K., Botos I., Hall P. R., Shiloach J., Segal D. M. 2005. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 31: 10976-10980.

Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40: 845–859.

Bourdoncle P. 2003. Colocalization. Paris, Institut Jacques Monod. (oktober 2004) <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/colocalization.html> (avgust 2008): 1 str.

Bowdish D. M. F., Davidson D. J., Lau Y. E., Lee K., Scott M. G., Hancock R. E. W. 2005. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 77: 451-459.

Celis E. 2007. Toll-like receptor ligands energize peptide vaccines through multiple paths. *Cancer Research*, 67, 17: 7945-7947.

Chen W., Yang S., Abe Y., Li M., Wang Y., Shao J., Li E., Li Y. P. 2007. Novel pycnodysostosis mouse model uncovers cathepsin K function as a potential regulator of osteoclast apoptosis and senescence. *Human Molecular Genetics*, 16, 4: 410-423.

Chwieralski C. E., Welte T., Bühling F. 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis*, 11, 2: 143-149.

Faure E., Thomas L., Xu H., Medvedev A., Equils O., Arditi M. 2001. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *Journal of Immunology*, 166, 3: 2018-2024.

Green J. J., Alderfer J. L., Tazawa I., Tazawa S., Ts'o P.O., O'Malley J., Carter W. A. 1978. Interferon induction and its dependance on the primary and secondary structure of poly(inosinic)•poly(cytidylic acid). *Biochemistry*, 17, 20: 4214-4220.

Hamilton G., Colbert J. D., Schuettelkopf A. W., Watts C. 2008. Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis. *EMBO Journal*, 27, 3: 499-508.

Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408, 6813:740-745.

Iwasaki A., Medzhitov R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5: 987–995.

Jiang Z., Mak T. W., Sen G., Li X. 2004. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-κB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-β. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 10: 3533–3538.

Johnsen I. B., Nguyen T. T., Ringdal M., Tryggestad A. M., Bakke O., Lien E., Espevik T., Anthonsen M.W. 2006. Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling. *EMBO Journal*, 25, 14: 3335-3346.

Jorgenson R. L., Lesmeister M. J., Misfeldt M. L. 2005. Human endometrial epithelial cells cyclically express toll-like receptor 3 (TLR3) and exhibit TLR3-dependent responses to dsRNA. *Human Immunology*, 66, 5: 469–482.

Kawai T., Akira S. 2004. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Research & Therapy*, 7, 1: 816–825.

Kawai T., Akira S. 2006. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13: 816–825.

Kopitar-Jerala N. 2006. The role of cystatins in cells of the immune system. *FEBS Letters*, 580, 27: 6295-6301.

Lande R., Gregorio J., Facchinetti V., Chatterjee B., Wang Y. H., Homey B., Cao W., Wang Y. H., Su B., Nestle F. O., Zal T., Mellman I., Schröder J. M., Liu Y. J., Gilliet M. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 449, 7162: 564-569.

Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K. A., Monks B. G., Knetter C. F., Lien E., Nilsen N. J., Espesvik T., Golenbock D. T. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology*, 5: 190–198.

Laummonerie C., Mutterer J. 2004. Colocalization finder 1.2. Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes. (avgust 2006) <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/colocalization-finder.html> (avgust 2008): 2 str.

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

Leonard J. N., Ghirlando R., Askins J., Bell J. K., Margulies D. H., Davies D. R., Segal D. M. 2008. The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 1: 258-263.

Lin Y., Lee H., Berg A. H., Lisanti M. P., Shapiro L., Scherer P.E. 2000. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 32: 24255-24263.

Liu L., Botos I., Wang Y., Leonard J. N., Shiloach J., Segal D. M., Davies D. R. 2008. Structural basis of Toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*, 320, 5874: 379-381.

Matsumoto F., Saitoh S., Fukui R., Kobayashi T., Tanimura N., Konno K., Kusumoto Y., Akashi-Takamura S., Miyake K. 2008. Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367, 3: 693-699.

Matsumoto M., Kikkawa S., Kohase M., Miyake K., Seya T. 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293: 1364–1369.

Nansen A., Thomsen A. R.. 2001. Viral infection causes rapid sensitization to lipopolysaccharide: central role of IFN-alpha beta. *Journal of Immunology*, 166, 2: 982-988.

Ni J., Fernandez M. A., Danielsson L., Chillakuru R. A., Zhang J., Grubb A., Su J., Gentz R., Abrahamson M. 1998. Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 38:24797-24804

Nishiya T., Kajita E., Miwa S., DeFranco A. L. 2005. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 44: 37107–37117.

Pestka J, Zhou H. R. 2006. Toll-like receptor priming sensitizes macrophages to proinflammatory cytokine gene induction by deoxynivalenol and other toxicants. *Toxicological Sciences*, 92, 2: 445-455.

Pirher N., Ivčak K., Pohar J., Benčina M., Jerala R. 2008. A second binding site for double stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15, 7:761-763.

Platt M. O., Ankeny R. F., Jo H. 2006. Laminar shear stress inhibits cathepsin L activity in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26:1784-1790.

Ranjith-Kumar C. T., Miller W., Xiong J., Russell W. K., Lamb R., Santos J., Duffy K. E., Cleveland L. Park M., Bhardwaj K., Wu Z., Russell D. H., Sarisky R. T., Mbow M. L., Kao C. C. 2007. Biochemical and functional analyses of the human toll-like receptor 3 ectodomain. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 10: 7668–7678.

Rasband W. 1997. ImageJ 1.40g. Bethesda, National Institutes of Health. (julij 2007) <http://rsbweb.nih.gov/ij/> (avgust 2008): 36 str.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1659 str.

Sørensen O. E., Follin P., Johnsen A. H., Calafat J., Tjabringa G. S., Hiemstra P. S., Borregaard N. 2001. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, 97: 12: 3951-3959.

Turner J., Cho Y., Dinh N., Waring A. J., Lehrer R. I. 1998. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 2206–2214.

Velayudham A., Hritz I., Dolganiuc A., Mandrekar P., Kurt-Jones E., Szabo G. 2006. Critical role of toll-like receptors and the common TLR adaptor, MyD88, in induction of granulomas and liver injury. *Journal of Hepatology*, 45, 6: 813-824.

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

Wang Q., Carmichael G. G. 2004. Effects of length and location on the cellular response to double-stranded RNA. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 3: 432–452.

Zavašnik-Bergant T., Turk B. 2006. Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens*, 67, 5: 349-355.

ZAHVALA

Somentorju prof. dr. Romanu Jerali se zahvaljujem za priložnost opravljanja diplomskega dela v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu ter vse nasvete in usmerjanje tekom nastajanja naloge.

Nini Pirher se zahvaljujem za vso pomoč in nasvete pri eksperimentalnem delu ter za uvajanje v "svet TLR3".

Dr. Mojci Benčina se zahvaljujem za pomoč pri delu s konfokalnim mikroskopom.

Mentorju prof. dr. Gregorju Anderluhu se zahvaljujem za prevzem mentorstva in temeljit pregled diplomske naloge.

Prof. dr. Tomu Turku se zahvaljujem za recenzijo in pregled diplomske naloge.

Hvala tudi vsem iz Laboratorija za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu za pomoč v laboratoriju in prijazen odgovor na vsako vprašanje.

Hvala še vsem sošolcem in prijateljem za popestritev študijskih in šolskih dni.

Velika zahvala pa gre vsem mojim domačim, ki so me vedno podpirali in mi pomagali po najboljši poti.

PRILOGE

Priloga A: Genski kod in okrajšave aminokislin.

Oznaka za aminokislino	aminokislina	Kodon za aminokislino
A	alanin	GCU, GCC , GCA, GCG
D	asparaginska kislina	GAU, GAC
F	fenilalanin	UUU, UUC
G	glicin	GGU, GGC , GGA, GGG
K	lizin	AAA, AAG
L	levcin	UUA, UUG, CUU, CUC , CUA, CUG
M	metionin	AUG
P	prolin	CCU, CCC, CCA, CCG
Q	glutamin	CAA, CAG
R	arginin	CGU, CGC, CGA, CGG
S	serin	UCU, UCC, UCA, UCG
T	treonin	ACU, ACC, ACA, ACG
W	triptofan	UGG

*Opomba: U, A, C, G predstavljajo posamezne nukleotide (U – uracil, A – adenin, C – citozin, G – gvanin). v
RNK Krepko označene kodone smo uporabili pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov, saj omogočajo boljše
izražanje v evkariontskih celicah.

Priloga B: Statistična obdelava rezultatov merjenja luciferazne aktivnosti pri odzivu hTLR3 ob dodatku LL-37 in E-64. Preizkusili smo domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc z uporabo Studentove porazdelitve pri 99-odstotnem intervalu zaupanja. Domneve so označene na sliki 31.

Domneva	t-vrednost	Stopnja prostosti Df	Kritična vrednost
inhibicija TLR3 signalne poti ob dodatku inhibitorja E-64	14,856	3	5,841
inhibicija TLR3 signalne poti ob dodatku peptida LL37	46,336	4	4,604
inhibicija TLR3 signalne poti ob dodatku peptida LL37 in E-64	4,057	4	4,604

Priloga C: Statistična obdelava rezultatov merjenja luciferazne aktivnosti pri odzivu hTLR3 ob transfekciji s pCAMP in dodatku E-64. Preizkusili smo domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc z uporabo Studentove porazdelitve pri 99-odstotnem intervalu zaupanja. Domneve so označene sliki 34.

Domneva	t-vrednost	Stopnja prostoti Df	Kritična vrednost
inhibicija TLR3 signalne poti ob dodatku inhibitorja E-64	4,969	5	4,032
inhibicija TLR3 signalne poti z 40 ng pCAMP ob dodatku E-64	6,433	6	3,707

Priloga D: Statistična obdelava rezultatov merjenja luciferazne aktivnosti pri odzivu hTLR3 ob transfekciji s pCST7. Preizkusili smo domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc z uporabo Studentove porazdelitve pri 99-odstotnem intervalu zaupanja. Domneve so označene na sliki 35.

Domneva	t-vrednost	Stopnja prostoti Df	Kritična vrednost
inhibicija TLR3 signalne poti ob dodatku 40 ng pCST7	6,600	4	4,604
inhibicija TLR3 signalne poti ob dodatku 80 ng pCST7	8,309	4	4,604

Če je t-vrednost večja od kritične vrednosti, zavrnemo hipotezo o enakosti povprečnih vrednosti in potrdimo hipotezo, da sta varianci pri izbranem intervalu zaupanja različni.

Statistične analize smo naredili v programu Excel (Microsoft) z orodjem za analizo podatkov t-Test: preizkus domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc (ang. t-Test: Two Sample Assuming Unequal Variances).