

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anže SMOLE

**PRIPRAVA IN BIOLOŠKA AKTIVNOST
KOMPLEKSOV IMUNOSTIMULATORNIH
NUKLEINSKIH KISLIN ZA
STABILIZACIJO, TARČNO DOSTAVO IN
POSTOPNO SPROŠČANJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anže SMOLE

**PRIPRAVA IN BIOLOŠKA AKTIVNOST KOMPLEKSOV
IMUNOSTIMULATORNIH NUKLEINSKIH KISLIN ZA
STABILIZACIJO, TARČNO DOSTAVO IN POSTOPNO
SPROŠČANJE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF
IMMUNOSTIMULATORY NUCLEIC ACID COMPLEXES FOR
STABILIZATION, TARGETED DELIVERY AND GRADUAL
RELEASE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

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

Za mentorja diplomskega dela je bil po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija biotehnologije imenovan prof. dr. Simon Horvat, za somentorja pa prof. dr. Roman Jerala.

Recenzent: prof. dr. Gregor Anderluh

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Anže Smole

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn
 DK UDK 577.27(043.2)=163.6
 KG Imunologija/imunski odziv/prirojena imunost/imunostimulativne nukleinske kisline/rak/cepivo/CpG ODN/poli(I:C)/receptor TLR3/receptor TLR9/konjugat/transferin/poli-L-lizin/SPDP/receptorsko-posredovana endocitoza
 AV SMOLE, Anže
 SA HORVAT, Simon (mentor)/JERALA, Roman (somentor)/ANDERLUH, Gregor (recenzent)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
 LI 2010
 IN PRIPRAVA IN BIOLOŠKA AKTIVNOST KOMPLEKSOV IMUNOSTIMULATIVNIH NUKLEINSKIH KISLIN ZA STABILIZACIJO, TARČNO DOSTAVO IN POSTOPNO SPROŠČANJE
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP XXII, 128 str., 15 pregl., 56 sl., 3 pril., 198 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Toll-u podobni receptorji (TLR) igrajo ključno vlogo pri prepoznavanju molekulskih motivov, značilnih za patogene mikroorganizme (PAMP). Med PAMP sodijo tudi imunostimulativne nukleinske kisline (INK), ki jih prepoznajo receptorji TLR v endosomih, kar vodi do sproženja signalnih poti, ki omogočijo aktivacijo imunskega sistema. Zato so INK in njihovi sintetični analogi potencialno uporabni kot adjuvansi za pripravo cepiv ter za zdravljenje rakastih obolenj. Osredotočili smo se na razvoj nosilnega sistema, ki bi izboljšal terapevtski učinek INK, zato smo pripravili konjugat transferina (Tf) in poli-L-lizina (PLL). Tf je ligand transferinskega receptorja (TfR) in se v celico vnese z receptorsko-posredovano endocitozo, PLL pa je sintetični polikation aminokislinskih ostankov lizina. Konjugat Tf-PLL naj bi omogočal vezavo, stabilizacijo in učinkovit celični vnos negativno nabitih INK predvsem v celice, ki izražajo višji nivo TfR, med katere sodijo tudi rakaste celice. Tf in PLL smo povezali preko disulfidne vezi z uporabo heterobifunkcionalnega reagenta SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate), ga izolirali z gelsko filtracijo in dokazali z NaDS-PAGE (poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS). Z merjenjem spektrov cirkularnega dikroizma (CD) smo pokazali, da se je tekom izolacije sekundarna struktura Tf ohranila, kar je pomembno za funkcionalnost kompleksov. Z metodo zmanjšane mobilnosti na gelu smo dokazali, da konjugat Tf-PLL uspešno veže poli(I:C), sintetični analog dvRNK. Konjugat Tf-PLL zaščiti poli(I:C) pred razgradnjo z RNazo, kar smo dokazali tako spektrofotometrično kot na ravni biološke aktivnosti. S konfokalno fluorescenčno mikroskopijo smo pokazali, da je vnos CpG ODN (oligodeoksinukleotid s CpG motivi) v celice HeLa veliko bolj učinkovit v kompleksih s Tf-PLL kot v primeru samega CpG ODN, obenem pa pride do kolokalizacije z lizosomi, kar potrjuje vnos v endosomalno pot. Časovno spremljanje proizvodnje IL-6 s testom ELISA je na primarni celični liniji HMVEC-dLY Ad pokazalo, da konjugat Tf-PLL omogoča postopno sproščanje poli(I:C) iz kompleksov ter celo močnejšo aktivacijo receptorja TLR3 kot v primeru same poli(I:C). Že po 1 uri stimulacije, v nasprotju s samo poli(I:C), kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) po 36 urah povzročijo močan imunski odziv, kar kaže na biološki pomen učinkovitega vnosa. Z inhibicijo s prostim Tf smo dokazali, da vnos s konjugatom Tf-PLL poteka z receptorsko posredovano endocitozo. Pripravljen konjugat ima velik terapevtski potencial za zdravljenje rakastih obolenj in razvoj modernih cepiv.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
 DC UDC 577.27(043.2)=163.6
 CX Immunology/immune response/innate immunity/immunostimulatory nucleic acids/cancer/vaccine/CpG ODN/poly(I:C)/receptor TLR3/receptor TLR9/conjugate/transferrin/poly-L-lysine/SPDP/receptor-mediated endocytosis
 AU SMOLE, Anže
 AA HORVAT, Simon (supervisor)/JERALA, Roman (co-supervisor)/ANDERLUH, Gregor (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
 PY 2010
 TI PREPARATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF IMMUNOSTIMULATORY NUCLEIC ACID COMPLEXES FOR STABILIZATION, TARGETED DELIVERY AND GRADUAL RELEASE
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XXII, 128 p., 15 tab., 56 fig., 3 ann., 198 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Toll-like receptors (TLRs) play a key role in recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMP), including immunostimulatory nucleic acids (INA), which are recognized by TLRs in endosomes, leading to the activation of signaling pathways, which activate the immune system. This feature makes INA and their synthetic analogs potentially useful as adjuvants for the preparation of vaccines and for cancer treatment. We focused on the development of a delivery system to improve the therapeutic effect of INA by preparing a conjugate between transferrin (Tf) and poly-L-lysine (PLL). Tf is a ligand of the transferrin receptor (TfR) and is internalised via receptor-mediated endocytosis. PLL is a synthetic polycation of lysine amino acid residues. The conjugate Tf-PLL enables binding, stabilisation and effective cellular uptake of negatively charged INA preferentially into cells expressing higher levels of TfR, including cancer cells. We linked Tf and PLL into a conjugate by a disulphide bond using a heterobifunctional reagent SPDP. The conjugate was isolated by a gel filtration and validated by SDS-PAGE. Circular dichroism (CD) spectra measurements demonstrated that secondary structure of the Tf was maintained during isolation procedure, which is important for the conjugate functionality. Using gel-mobility shift method we showed that Tf-PLL conjugate successfully bound a synthetic analogue of dsRNA poly(I:C) and thus enabled a formation of complexes. Tf-PLL conjugate protected poly(I:C) from degradation by RNase, which was demonstrated spectrophotometrically as well as at a biological activity level. Using confocal fluorescence microscopy we showed that the uptake of the CpG oligodeoxynucleotide (CpG ODN) in HeLa cells was much more effective when complexed with Tf-PLL. In addition, the observed colocalization between CpG ODN and lysosomes indicated a trafficking into endosomal pathway. Time monitoring of production of interleukin 6 (IL-6) in the primary cell line HMVEC-dLy Ad by ELISA test showed that Tf-PLL conjugate enabled a gradual release of poly(I:C) from complexes and even stronger activation of TLR3 receptor in comparison to poly(I:C) alone. Only 1 hour of stimulation by Tf-PLL/poly(I:C) complexes elicited strong immune response after 36 hours, whereas poly(I:C) alone did not, thus suggesting the biological importance of an effective cellular uptake. The inhibition with free Tf showed that cellular uptake was due to the receptor-mediated endocytosis. The Tf-PLL conjugate developed in our study, has a great potential in cancer therapy and modern vaccines development.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	XI
Kazalo slik	XII
Kazalo prilog	XV
Okrajšave in simboli	XVI
Slovarček	XXI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 IMUNSKI SISTEM IN IMUNSKI ODZIV	3
2.1.1 Prirojena imunost	4
2.1.2 Pridobljena imunost	4
2.1.2.1 Humoralna imunost	5
2.1.2.2 Celično posredovana imunost	5
2.1.3 Imunološke signalne molekule	6
2.1.4 Povezava med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom	8
2.1.4.1 Imunski odziv na zunajcelične patogene	9
2.1.4.2 Imunski odziv na znotrajcelične patogene	10
2.1.4.3 Navzkrižna predstavitev antigenov in avtofagija	10
2.2 TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI	13
2.2.1 Struktura TLR	15
2.2.2 Vloga TLR	18
2.2.3 Signalizacija TLR	19
2.2.3.1 Od proteina MyD88 odvisna pot	19
2.2.3.2 Od TRIF odvisna pot	19
2.2.4 Prepoznavanje nukleinskih kislin preko endosomalnih TLR	21

2.2.4.1	Receptor TLR3	22
2.2.4.2	Receptor TLR9	23
2.2.5	Signalizacija tekom zorenja fagosomov vpliva na procesiranje in predstavitev antigenov	24
2.3	TERAPEVTSKI POTENCIAL IMUNOSTIMULATORNIH NUKLEINSKIH KISLIN	26
2.3.1	Cepiva	26
2.3.1.1	Cepiva, ki vsebujejo celotne mikrobe	27
2.3.1.2	Podenotna cepiva, ki vsebujejo le določene mikrobne komponente	27
2.3.2	Moderna cepiva in adjuvansi	27
2.3.3	Terapevtski potencial aktivacije TLR3	29
2.3.3.1	Vpliv signalizacije TLR3 na gostiteljev imunski odziv	29
2.3.3.2	Agonisti TLR3 kot adjuvansi za pripravo cepiv	30
2.3.3.3	Agonisti TLR3 v terapiji raka	31
2.3.4	Terapevtski potencial aktivacije TLR9	32
2.3.4.1	Vpliv signalizacije TLR9 na gostiteljev imunski odziv	32
2.3.4.2	Odnos med strukturo in aktivnostjo CpG ODN	33
2.3.4.3	Agonisti TLR9 v terapiji kužnih bolezni	34
2.3.4.4	Agonisti TLR9 kot adjuvansi za pripravo cepiv	34
2.3.4.5	Agonisti TLR9 v terapiji raka	35
2.4	TRANSFERIN IN TRANSFERINSKI RECEPTOR	36
2.4.1	Transferin	36
2.4.1.1	Struktura	36
2.4.1.2	Funkcija	37
2.4.2	Transferinski receptor	37
2.4.2.1	Struktura	38
2.4.2.2	Vezava transferina na transferinski receptor	38
2.4.3	Vnos železa preko transferina in transferinskega receptorja	39
2.4.4	Transferinski konjugati za tarčno specifično dostavo	40
2.4.4.1	Tarčno specifična dostava zdravilnih učinkovin	40
2.4.4.2	Tarčno specifična dostava genov s konjugati Tf-PLL/DNK	40
2.5	KONJUGATI IMUNOSTIMULATORNIH NUKLEINSKIH KISLIN	42
2.5.1	Konjugati nukleinskih kislin in proteinov	42
2.5.2	Konjugati nukleinskih kislin in polikationov	42

3	MATERIALI IN METODE	44
3.1	MATERIALI	44
3.1.1	Uporabljene kemikalije	44
3.1.2	Uporabljena laboratorijska oprema in potrošni material	45
3.1.3	Uporabljene raztopine, pufri in standardi	47
3.1.4	Uporabljeni plazmidi	48
3.1.5	Uporabljeni organizmi	49
3.1.5.1	Bakterijski sevi	49
3.1.5.2	Celične kulture	49
3.2	METODE	50
3.2.1	Sterilizacija pufrov, raztopin in materiala za delo s celičnimi kulturami	50
3.2.2	Gojenje bakterijske kulture <i>E. coli</i> DH5 α	50
3.2.2.1	Gojenje na agarnih gojiščih	50
3.2.2.2	Gojenje v tekočih gojiščih	50
3.2.3	Metode molekulskega kloniranja	50
3.2.3.1	Kemijska transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5 α	51
3.2.3.2	Priprava plazmidne DNK za transfekcijo celičnih kultur	51
3.2.3.2.1	Osamitev plazmidne DNK s komercialno dostopnim kompletom	51
3.2.3.3	Določanje koncentracije nukleinskih kislin	51
3.2.4	Priprava konjugata Tf-PLL	52
3.2.4.1	Sinteza konjugata Tf-PLL	53
3.2.4.1.1	Čiščenje vmesnih stopenj v sintezi konjugata s PD-10 kolono za razsoljevanje	55
3.2.4.1.2	Preverjanje količine piridilditiolnih linkerjev v modificiranem proteinu	55
3.2.4.2	Izolacija konjugata z gelsko filtracijo	56
3.2.4.3	Preverjanje uspešnosti sinteze in izolacije konjugata s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)	58
3.2.4.3.1	Vlivanje gelov NaDS	58
3.2.4.3.2	Priprava, nanos vzorcev in potek NaDS-PAGE	58
3.2.4.3.3	Barvanje NaDS gelov z barvilom Coomassie Brilliant Blue	58
3.2.4.4	Preverjanje konformacije Tf po postopkih sinteze in izolacije	59
3.2.4.4.1	Merjenje spektrov cirkularnega dikroizma	59
3.2.4.4.2	Spremljanje toplotne denaturacije samega Tf in Tf z dodatkom GndCl s cirkularnim dikroizmom	60

3.2.5	Ugotavljanje tvorjenja kompleksov med konjugatom Tf-PLL in nukleinskimi kislinami	60
3.2.5.1	Metoda zmanjšane mobilnosti na gelu	60
3.2.5.1.1	Priprava kompleksov	60
3.2.5.1.2	Elektroforeza v agaroznem gelu	61
3.2.6	Stabilnost poli(I:C) v kompleksih	61
3.2.6.1	Spektrofotometrično spremljanje encimske razgradnje poli(I:C) v kompleksih	61
3.2.7	Biološka aktivnost poli(I:C) v kompleksih po razgradnji z RNazo	62
3.2.7.1	Delo s trajno človeško celično kulturo HEK293	62
3.2.7.2	Preverjanje aktivacije TLR3 z dvojnimi luciferaznimi testom na trajni človeški celični kulturi HEK293	62
3.2.7.2.1	Nacepitev celic HEK293	62
3.2.7.2.2	Transfekcija celic HEK293	63
3.2.7.2.3	Stimulacija celic HEK293	63
3.2.7.2.4	Merjenje luciferazne aktivnosti	64
3.2.8	Preverjanje celičnega vnosa kompleksov	64
3.2.8.1	Delo s trajno človeško celično kulturo HeLa	65
3.2.8.2	Analiza celic s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo	65
3.2.8.2.1	Nacepitev celic HeLa	65
3.2.8.2.2	Dodajanje kompleksov k celicam HeLa	65
3.2.8.2.3	Spiranje celic HeLa	66
3.2.8.2.4	Označevanje celic HeLa z barvilom za lizosome LysoTracker Green in barvilom za jedra HOECHST 33258	66
3.2.8.2.5	Mikroskopiranje	66
3.2.9	Preverjanje biološke aktivnosti kompleksov na primarni celični liniji HMVEC-dLY Ad	68
3.2.9.1	Delo s primarno človeško celično kulturo HMVEC-dLY Ad	68
3.2.9.2	Časovno spremljanje biološke aktivnosti kompleksov s človeškim IL-6 ELISA testom	68
3.2.9.2.1	Nacepitev celic HMVEC-dLY Ad	68
3.2.9.2.2	Stimulacija celic HMVEC-dLY Ad	68
3.2.9.2.3	Zbiranje supernatanta stimuliranih celic HMVEC-dLY Ad	69
3.2.9.2.4	Preverjanje sinteze humanega IL-6 s testom ELISA	71

3.2.9.3	Določanje biološke aktivnosti kompleksov s človeškim IL-6 ELISA testom ob odstranitvi gojišča po eni oziroma treh urah	72
3.2.9.4	Test kompetitivne inhibicije s prostim Tf	73
4	REZULTATI	74
4.1	PRIPRAVA KONJUGATA TF-PLL	74
4.1.1	Sinteza konjugata Tf-PLL	74
4.1.1.1	Preverjanje sinteze konjugata Tf-PLL z NaDS-PAGE	75
4.1.2	Izolacija konjugata Tf-PLL	76
4.1.2.1	Preverjanje izolacije konjugata Tf-PLL z NaDS-PAGE	79
4.1.3	Preverjanje konformacije Tf	80
4.1.3.1	Merjenje cirkularnega dikroizma Tf, PLL in konjugata Tf-PLL	81
4.1.3.2	Vpliv 1,5 M GndCl na sekundarno strukturo Tf	82
4.1.3.3	Toplotna denaturacija Tf in Tf z dodanim 1,5 M GndCl	83
4.2	PRIPRAVA KOMPLEKSOV MED KONJUGATOM TF-PLL IN NUKLEINSKIMI KISLINAMI	86
4.2.1	Preverjanje tvorjenja kompleksov Tf-PLL in nukleinskih kislin	86
4.3	STABILNOST POLI(I:C) V KOMPLEKSIH	88
4.3.1	Spektrofotometrično spremljanje encimske razgradnje poli(I:C) v kompleksih	88
4.3.2	Biološka aktivnost poli(I:C) v kompleksih po delovanju RNaze	90
4.4	CELIČNI VNOS KOMPLEKSOV IMUNOSTIMULATIVNIH NUKLEINSKIH KISLIN	92
4.4.1	Primerjava celičnega vnosa ODN-Alexa 633 in Tf-PLL/ODN-Alexa 633	92
4.4.2	Kolokalizacija kompleksov Tf-PLL/ODN-Alexa 633 in lizosomov	93
4.5	BIOLOŠKA AKTIVNOST KOMPLEKSOV	94
4.5.1	Časovno spremljanje aktivacije imunskega odziva po stimulaciji primarne celične linije s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C)	94
4.5.2	Konjugat Tf-PLL omogoča učinkovit vnos poli(I:C) v primarno celično linijo ter aktivacijo imunskega odziva	95
4.5.3	Kompetitivna inhibicija s prostim Tf	96
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	98
5.1	RAZPRAVA	98
5.1.1	Priprava konjugata Tf-PLL	99
5.1.2	Priprava kompleksov Tf-PLL/poli(I:C)	102
5.1.3	Stabilnost poli(I:C) v kompleksih	103

5.1.4	Celični vnos kompleksov INK	104
5.1.5	Biološka aktivnost kompleksov	104
5.1.6	Nadaljnje raziskave in potencialna uporaba konjugata Tf-PLL	106
5.2	SKLEPI	110
6	POVZETEK	111
7	VIRI	113
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: TLR receptorji in njihovi ligandi (Gay in Gangloff, 2007: 144)	13
Preglednica 2: Lastnosti idealnega cepiva (Abedon, 2005)	26
Preglednica 3: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti	44
Preglednica 4: Laboratorijska oprema in potrošni material	45
Preglednica 5: Raztopine in pufri, uporabljeni pri sintezi konjugatov	47
Preglednica 6: Raztopine in pufri, uporabljeni pri izolaciji konjugatov	47
Preglednica 7: Raztopine in pufri, uporabljeni pri delu s celičnimi kulturami	47
Preglednica 8: Pufri, uporabljeni za testiranje aktivnosti z dvojnimi luciferaznimi testom	47
Preglednica 9: Raztopine in pufri, uporabljeni za biokemijsko dokazovanje konjugatov	48
Preglednica 10: Seznam plazmidov, uporabljenih za testiranje aktivnosti z dvojnimi luciferaznimi testom	48
Preglednica 11: Uporabljen bakterijski sev	49
Preglednica 12: Uporabljene celične kulture	49
Preglednica 13: Sestava transfekcijske mešanice	63
Preglednica 14: Osnovne fizikalno-kemijske lastnosti transferina in poli-L-lizina	74
Preglednica 15: Ocena modifikacije transferina in poli-L-lizina s SPDP	74

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Aktivacija gostiteljevih obrambnih mehanizmov (Medzhitov, 2007: 824)	3
Slika 2: Humoralna in celično posredovana imunost (Abbas in Lichtman, 2004: 5)	6
Slika 3: Vpliv citokinov na polarizacijo Th1/Th2 (Liew, 2002: 57)	8
Slika 4: Sodelovanje med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom	12
Slika 5: Filogenetsko drevo človeških TLR (Takeda in sod., 2003: 339)	13
Slika 6: Celična lokalizacija človeških TLR (Kanzler in sod., 2007: 553)	14
Slika 7: Osnovna arhitektura TLR (Gay in sod., 2006: 694)	16
Slika 8: Terciarna struktura ektodomene človeškega TLR3 in z levcini bogate regije (LRR) (Gay in Gangloff, 2007: 146)	16
Slika 9: Terciarna struktura kompleksa mišjega TLR3 in liganda dvRNK	17
Slika 10: Model dveh vezavnih mest za aktivacijo TLR3 (Pirher in sod., 2008: 762)	18
Slika 11: Signalizacija receptorjev TLR (Akira in sod., 2006: 790)	20
Slika 12: Prepoznavanje nukleinskih kislin preko endosomalnih TLR (Kawai in Akira, 2010: 376)	22
Slika 13: Signalizacija TLR omogoča diskriminacijo tujih in lastnih antigenov na nivoju vezikularnega transporta (Blander, 2007a: 22)	25
Slika 14: Signalizacija TLR3 v mDC vodi do aktivacije CTL in celic NK (Matsumoto in Seya, 2008: 809)	30
Slika 15: Vpliv signalizacije TLR9 na gostiteljev imunski odziv (Kumagai in sod., 2008: 4)	33
Slika 16: Različni razredi CpG ODN (Krieg, 2006: 475)	34
Slika 17: Učinek aktivacije TLR9 na protitumorski imunski odziv (Krieg, 2006: 479)	35
Slika 18: Kristalna struktura človeškega serumskega transferina (Li in Qian, 2002: 228)	37
Slika 19: Kristalna struktura dimerne ektodomene človeškega transferinskega receptorja 1 (Li in Qian, 2002: 228)	38
Slika 20: Atomski model kompleksa transferina in transferinskega receptorja 1 (Cheng in sod., 2004: 571)	38
Slika 21: Cikel celičnega vnosa železa preko transferina in transferinskega receptorja 1 pri ljudeh (Drakesmith in Prentice, 2008: 543)	39
Slika 22: Struktura bifunkcionalnega reagenta SPDP (Carlsson in sod., 1978: 728)	52
Slika 23: Površinsko izpostavljeni lizinski ostanki v molekuli transferina	53
Slika 24: Modifikacija transferina s SPDP	53

Slika 25: Modifikacija poli-L-lizina s SPDP	54
Slika 26: Redukcija SPDP v poli-L-lizinu	54
Slika 27: Konjugacija aktiviranega transferina in poli-L-lizina	55
Slika 28: Shematski prikaz procesa gelske filtracije (Gel filtration ..., 2010: 10)	57
Slika 29: CD spektri različnih sekundarnih struktur proteinov (Kelly in sod., 2005: 121)	59
Slika 30: Shematski prikaz preverjanja celičnega vnosa kompleksov s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo	67
Slika 31: Shematski prikaz poteka poskusa za časovno spremljanje količine IL-6 v supernatantu celic HMVEC-dLy Ad po stimulaciji s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C)	70
Slika 32: Shematski prikaz preverjanja sinteze človeškega IL-6 s testom ELISA (Human IL-6 ..., 2007: 5)	71
Slika 33: Shematski prikaz poteka poskusa za določanje količine IL-6 v supernatantih celic HMVEC-dLy Ad po stimulaciji s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) ob odstranitvi gojišča	72
Slika 34: NaDS-PAGE gel neočiščenih konjugatov Tf-PLL	76
Slika 35: Gelska filtracija transferina in poli-L-lizina	77
Slika 36: Gelska filtracija konjugata Tf-PLL	78
Slika 37: Proteinski spekter izoliranega konjugata Tf-PLL	79
Slika 38: NaDS-PAGE gel konjugatov Tf-PLL po izolaciji z gelsko filtracijo	80
Slika 39: Cirkularni dikroizem transferina in poli-L-lizina	81
Slika 40: Cirkularni dikroizem konjugata Tf-PLL v primerjavi s samim Tf in PLL	82
Slika 41: Cirkularni dikroizem transferina in transferina z dodanim 1,5 M GndCl	83
Slika 42: Cirkularni dikroizem transferina in Tf z dodanim 1,5 M GndCl v odvisnosti od valovne dolžine pred in po toplotni denaturaciji	84
Slika 43: Sprememba cirkularnega dikroizma transferina in Tf z dodanim 1,5 M GndCl v odvisnosti od temperature	85
Slika 44: Agarozni gel zmanjšane mobilnosti poli(I:C) v kompleksih Tf-PLL/poli(I:C)	86
Slika 45: Agarozni gel zmanjšane mobilnosti poli(I:C) v kompleksih PLL/poli(I:C)	87
Slika 46: Zaščita razgradnje RNK ob dodatku poli-L-lizina v različnih stehiometričnih razmerjih	89
Slika 47: Delež nerazgrajene poli(I:C) v kompleksih s poli-L-lizinom v odvisnosti od masnega razmerja poli(I:C): PLL	90
Slika 48: Aktivacija receptorja TLR3 s poli(I:C) in poli(I:C) v kompleksih s poli-L-lizinom po inkubaciji z RNazo	91
Slika 49: Primerjava celičnega vnosa prostega in s konjugatom Tf-PLL vezanega označenega ODN 10104	92

Slika 50: Kolokalizacija CpG ODN 10104 in lizosomov	93
Slika 51: Časovno spremljanje količine IL-6 v supernatantih celic HMVEC-dLy Ad po stimulaciji s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C)	95
Slika 52: Količina IL-6 v supernatantih celic HMVEC-dLY Ad po stimulaciji s samo poli(I:C) oziroma v kompleksih s Tf-PLL ob odstranitvi gojišča	96
Slika 53: Kompetitivna inhibicija vnosa kompleksov s prostim transferinom	97
Slika 54: Shematski prikaz priprave konjugata med transferinom in poli-L-lizinom	100
Slika 55: Gelska filtracija konjugatov Tf-PLL iz sorodne študije (Wagner in sod., 1990: 3412)	101
Slika 56: Sestava modernega modularnega cepiva	109

KAZALO PRILOG

Priloga A: Razlaga statistične obdelave podatkov

Priloga B: Izvorni protokol za testiranje količine IL-6 v supernatantih celic HMVEC-dLy
Ad s komercialnim testom ELISA (Human IL-6 ...2007: 36)

Priloga C: Ločevanje konjugatov Tf-PLL z gelsko filtracijo brez prisotnosti GndCl

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

% (m/v)	Utežni odstotek
% (v/v)	Volumski odstotek
A	Absorbanca pri določeni valovni dolžini
A ₂₆₀	Absorbanca pri valovni dolžini 260 nm
A ₂₈₀	Absorbanca pri valovni dolžini 280 nm
AK	Aminokislina
AM	Zorenje afinitete (ang. »affinity maturation«)
Ang.	Angleško
APC	Antigen predstavitevna celica (ang. »antigen presenting cell«)
APS	Amonijev persulfat
B	Limfocit B
BCR	B celični receptor (ang. »B-cell receptor«)
Bp	Bazni par
CD	Cirkularni dikroizem
CD4+T	Celica T pomagalka
cDC	Konvencionalna dendritična celica (ang. »conventional dendritic cell«)
CoA	Koencim A (ang. »coenzyme A«)
CpG	Dvonukleotidni motiv citozina in gvanina (ang. »cytosine-phosphate-guanosine«)
CpG ODN	Oligodeoksinukleotid z motivi CpG
CTLs	Citotoksični limfociti CD8+T (ang. »cytotoxic T lymphocytes«)
Da	Dalton, enota za molekulsko maso
DC	Dendritična celica (ang. »dendritic cells«)
DD	Domena smrti (ang. »death domain«)
DMEM	Gojišče za celične kulture (ang. »Dulbecco's Modified Eagle's Medium«)

DMSO	Dimetilsulfoksid
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
DTT	Ditiotreitol
dvRNK	Dvovertična ribonukleinska kislina (ang. »double stranded RNA« oziroma dsRNA)
evRNK	Enovertična ribonukleinska kislina (ang. »single stranded RNA« oziroma ssRNA)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetraacetna kislina
ELISA	ang. »enzyme-linked immunosorbent assay«
ER	Endoplazmatski retikulum
EtBr	Etidijev bromid
FBS	Goveji fetusni serum (ang. »fetal bovine serum«)
F-LUC	Kresničkina luciferaza
GndCl	Gvanidinijev hidroklorid
HCCS	Preklop težkih verig (ang. »heavy chain class switching«)
HEK293	Trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (ang. »human embryonic kidney cell line«)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
HPLC	Visoko-tlačna tekočinska kromatografija (ang. »high pressure liquid chromatography«)
HRP	Hrenova peroksidaza
hTLR3	Humani oziroma človeški receptor TLR3
hTLR9	Humani oziroma človeški receptor TLR9
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
Ig	Imunoglobulin (IgG je, na primer, imunoglobulin G oziroma protitelo IgG)
IKK	Inhibitorna kapa B kinaza (ang. »I κ B kinase«)

IL	Interlevkin
INK	Imunostimulatorne nukleinske kisline
IRAK	Kinaza, povezana z receptorjem IL-1 (ang. »IL-1 receptor-associated kinase«)
IRF3	Interferon regulirajoči faktor 3 (ang. »interferon regulatory factor 3«)
IRF7	Interferon regulirajoči faktor 7 (ang. »interferon regulatory factor 7«)
kDa	Kilo Da (1000 Da)
Konc.	Koncentracija
LB	Gojišče Luria-Bertani
LPS	Lipopolisaharid (endotoksin)
LRR	Z levcinom bogata ponovitev (ang. »leucine-rich repeat«)
Mal/TIRAP	Adapterski protein podoben MyD88 (ang. »MyD88-adaptor-like/TIR-domain-containing adaptor molecule«)
mDC	Mieloidna dendritična celica (ang. »myeloid dendritic cell«)
MKK6	ang. »MAP kinase kinase 6«
MQ	Mili Q voda, dodatno očiščena destilirana voda
MyD88	Diferenciacijski mieloidni protein 88 (ang. »myeloid differentiation primary-response protein 88«)
NA	Numerična apertura
NaDS	Natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
NEMO	ang. »NF- κ B essential modulator«
NF- κ B	Jedrni faktor κ B (ang. »nuclear factor κ B«)
NK	Celice naravne ubijalke (ang. »natural killer cells«)
Obr./min	Obrati na minuto
ODN	Oligodeoksinukleotid
ODN-Alexa 633	Oligodeoksinukleotid 10104, označen s fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor 633
PAMP	Molekulski motiv, značilen za patogene mikroorganizme (ang. »pathogen-associated molecular pattern«)

PBS	Fosfatni pufer
pDC	Plazmacitoidna dendritična celica (ang. »plasmacytoid dendritic cell«)
pH	Negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H_3O^+
PHK	Molekula poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (ang. »major histocompatibility complex«)
PLL	Poli-L-lizin (ang. »poly-L-lysine«)
Poli(I:C)	Poliinozinska: policitidinska kislina (ang. »polyinosinic: polycytidylic acid«), tudi poliriboinozinska: poliribocitidinska kislina
PRR	Receptor za prepoznavanje patogenih motivov (ang. »pattern recognition receptor«)
RLU	Relativne enote luciferazne aktivnosti (ang. »relative light units«)
R-LUC	<i>Renilla</i> luciferaza
RNaza	Ribonukleaza
RNK	Ribonukleinska kislina
siRNK	Mala interferenčna RNK (ang. »small interfering RNA«)
SPDP	Heterobifunkcionalni amino- in sulfhidril- reaktivni reagent (ang. »N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate«)
TAA	S tumorjem povezani antigeni (ang. »tumor-associated antigens«)
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- κ B activator (TANK)-binding kinase 1«)
TCR	T-celični receptor (ang. »T-cell receptor«)
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilendiamin
Tf	Transferin (ang. »transferrin«)
Tf-PLL	Konjugat transferina in poli-L-lizina
Tf-PLL/CpG ODN	Kompleks med konjugatom Tf-PLL in CpG ODN
Tf-PLL/DNK	Kompleks med konjugatom Tf-PLL in DNK
Tf-PLL/poli(I:C)	Kompleks med konjugatom Tf-PLL in poli(I:C)

TfR	Transferinski receptor (ang. »transferrin receptor«)
Th	Celice T pomagalke (ang. »T-helper cells«)
TICAM-1	Adapterski protein, znan tudi kot TRIF (ang. »TIR-domain-containing molecule 1«)
TIR	Domena Toll-interlevkinega receptorja (ang. »Toll-interleukin receptor domain«)
TIRAP/MAL	ang. »TIR-associated protein/MyD88-adaptor-like«
TLR	Tollu-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 IFN- β «)
Tris	Tris (hidroksimetil)-aminometan

SLOVARČEK

HEK293	HEK293 je trajna človeška 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 Tollu-podobnih receptorjev (TLR).
Citokini	Kot odziv na prisotnost patogenov pričnejo imunske celice izločati proteine, ki jih imenujemo citokini. Beseda izvira iz grščine in pomeni »povzročiti gibanje celic«. Citokini so signalne proteinske molekule, velikosti med 8 in 30 kDa, ki delujejo avtokrino, parakrino in endokrino. Proizvajajo se v majhnih količinah in se vežejo na visoko afinitetne receptorje na tarčnih celicah. Vplivajo na rast, diferenciacijo in aktivacijo celic ter na ta način uravnavajo in usmerjajo naravno imunskega odziva. Delimo jih na interleukine, limfokine in kemokine.
HeLa	Človeška celična kultura HeLa je trajna celična linija, pripravljena z izolacijo celic cervikalnega raka bolnice Henrietti Lacks, po kateri je dobila ime.
HMVEC-dLY Ad	Primarna celična linija človeškega mikrovaskularnega limfatičnega endotelija, pridobljena iz kože.
Luciferaza	Luciferaza je generično ime za encime, ki katalizirajo reakcije bioluminiscence pri organizmih, kot sta kresnička <i>Photinus pyralis</i> in koralnjak <i>Renilla reniformis</i> . V molekularni biologiji uporabljamo luciferaze kot poročevalske encime, s katerimi spremljamo izražanje genov. V dvojnem luciferaznem testu hkrati uporabimo dve luciferazi in sicer inducibilno izraženo kresničkino luciferazo za spremljanje izražanja genov ter konstitutivno izraženo <i>Renilla</i> luciferazo za normalizacijo glede na učinkovitost transfekcije.
Poli(I:C)	Poliriboinozinska: poliribocitidinska kislina oziroma poli(I:C) (ang. »polyriboinosinic: polyribocytidylic acid«) je stabilen sintetični analog dvRNK, ki se pogosto uporablja kot ligand receptorja TLR3, saj posnema virusno okužbo.
Poli-L-lizin	Poli-L-lizin (PLL) je sintetični polimer AK lizina, pri katerem je ε-amino skupina pri fiziološkem pH pozitivno nabita in zato dobra tarča za kovalentno pripenjanje ostalih molekul. PLL je dostopen v različnih molekulskih masah in je biorazgradljiv.
Tollu-podobni receptorji	Receptorji TLR so podskupina PRR in igrajo ključno vlogo v začetnih stopnjah imunskega odziva na okužbo. TLR se izražajo na površini celice ali v endosomih različnih podtipov APC in se odzivajo na specifične bakterijske, virusne in glivne signale. To vodi do aktivacije APC ter nadaljnje modulacije in oblikovanja pridobljenih imunskih odzivov (na primer polarizacija imunskega odziva v Th1 oziroma Th2 smer).
SPDP	SPDP je amino- in sulfhidril- reaktiven heterobifunkcionalen reagent. Uporablja se za povezavo molekul preko amino-amino ali amino-sulfhidril skupine. Reagent povzroči nastanek disulfidne vezi, ki jo lahko naknadno cepimo z dodatkom reducirajočega sredstva kot je ditiotritol (DTT).

TLR3	Tollu-podoben receptor 3 (TLR3) je zgrajen iz zunajcelične ektodomene, ki vsebuje z levicini bogate ponovitve, transmembranske regije ter znotrajcelične oziroma citoplazemske domene TIR. Na zunajcelično domeno se veže dvoverižna virusna RNK ali njeni sintetični analogi, na znotrajcelično domeno pa adapterski proteini, ki vsebujejo domeno TIR.
TLR9	Tollu-podoben receptor 9 (TLR9) je zgrajen iz zunajcelične ektodomene, ki vsebuje z levicini bogate ponovitve, transmembranske regije ter znotrajcelične oziroma citoplazemske domene TIR. Na zunajcelično 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.
Transferin	Transferin (Tf) je monomerni glikoprotein z molekularno maso približno 80 kDa, ki ima sposobnost kompleksiranja Fe^{3+} ionov. Osnovna vloga Tf je nadziranje nivoja prostega železa v telesnih tekočinah, saj veže, zbira in transportira Fe^{3+} ione. Kompleks Tf in železa se veže na transferinski receptor in se tako preko receptorsko-posredovane endocitoze vnese v celice. V endosomalnih pogojih se železo sprostí iz kompleksa, Tf, vezan na TfR pa se z eksocitozo vrne na celično površino, kjer disociira z receptorja in se vrne v obtok za ponovno uporabo.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Ključna naloga imunskega sistema je prepoznavanje ter uničevanje patogenov in rakastih celic, kar omogoča zaščito organizma pred boleznimi.

Tollu-podobni receptorji oziroma TLR (ang. »Toll-like receptors«) igrajo ključno vlogo pri prepoznavanju molekulskih motivov, značilnih za (patogene) mikroorganizme oziroma PAMP (ang. »pathogen associated molecular patterns«). Med te spadajo tudi imunostimulatorne nukleinske kisline oziroma INK. Po prepoznavi INK TLR sprožijo signalne poti, ki vodijo do aktivacije prirojenega in pridobljenega imunskega sistema, zaradi česar se INK potencialno lahko uporabljajo kot adjuvansi za pripravo cepiv ter za zdravljenje rakastih obolenj.

Čeprav imajo INK številne obetavne lastnosti za uporabo v terapevtske namene, obstajajo težave, ki omejujejo njihovo učinkovitost. Nukleinske kisline so občutljive na razgradnjo, poleg tega slabo prehajajo celične membrane in se vežejo na serumske proteine, zato je njihov vstop v znotrajcelične razdelke neučinkovit.

Zaradi tega je pomembno razviti način za tarčno dostavo, stabilizacijo, učinkovit vnos in postopno sproščanje INK. Obenem je potrebno ohraniti ali celo izboljšati njihovo biološko aktivnost.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V raziskovalnem delu bomo pripravili konjugat transferina oziroma Tf in poli-L-lizina oziroma PLL (ang. »poly-L-lysine«). Tf je serumski glikoprotein, ki veže železo in ga z endocitozo preko membranskega transferinskega receptorja oziroma TfR vnese v celico. To učinkovito pot celičnega vnosa bomo uporabili za specifičen vnos INK v celice. Tf bomo kemijsko povezali s PLL, ki je sintetični polikation, sestavljen iz različnega števila aminokislinskih ostankov lizina. Ker so INK polianionske molekule, se bodo preko elektrostatskih interakcij vezale na pozitivno nabit PLL iz konjugata.

Nastali kompleks bo omogočal tarčno dostavo, stabilizacijo, učinkovit vnos in postopno sproščanje INK z namenom aktivacije imunskega sistema preko receptorjev TLR3 ali TLR9. Ker rakaste celice izražajo več TfR v primerjavi z nerakastimi, bodo kompleksi omogočali tarčno učinkovanje na rakaste tvorbe. Kompleksi bi bili torej primerni za zdravljenje rakastih obolenj ali kot adjuvansi za pripravo modernih cepiv.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

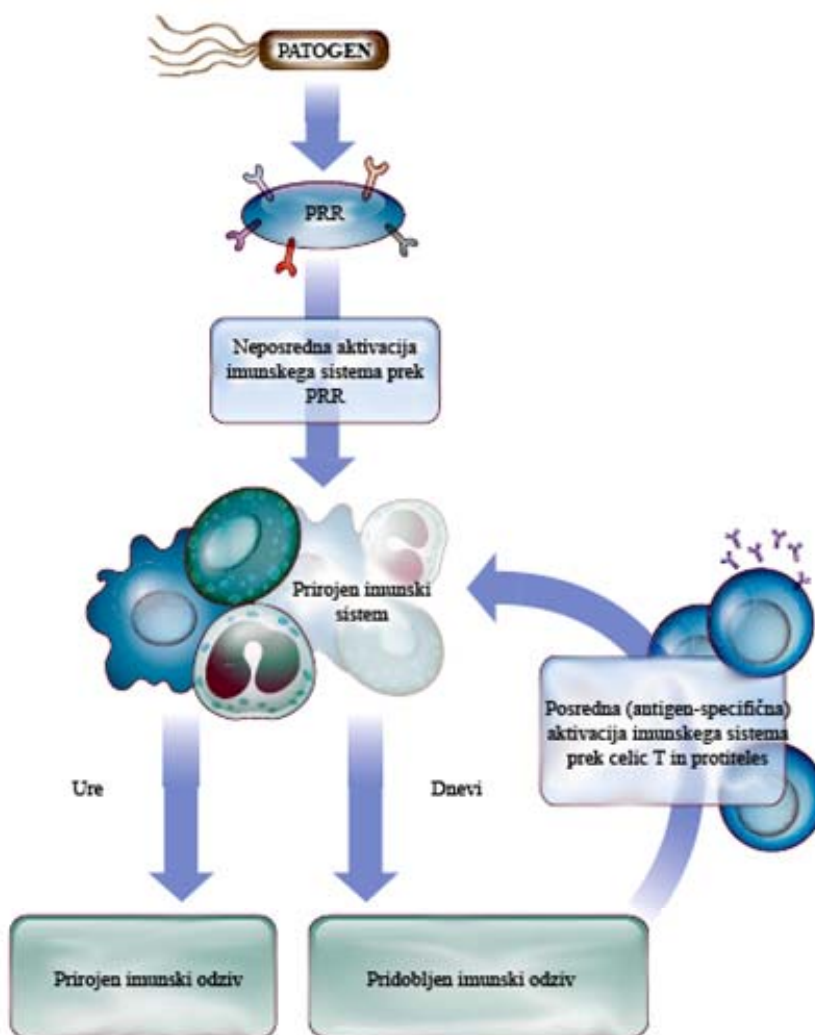
- Tf bo možno kemijsko povezati s PLL, ki bo preko elektrostatskih interakcij vezal negativno nabite INK. Tf bo pri tem ohranil nativno konformacijo in bo sposoben vezave na TfR.
- Kompleksi med konjugatom Tf-PLL in INK (Tf-PLL/INK) bodo sprožili receptorsko-posredovano endocitozo ter učinkovit vnos v endosomalno pot.
- V endosomih bodo kompleksi Tf-PLL/INK postopno razpadli ali se razgradili, sproščene INK pa bodo aktivirale receptor TLR3 oziroma TLR9, kar bo sprožilo učinkovit imunski odziv.

Glavni namen raziskovalnega dela je torej razvoj nosilnega sistema, ki bi izboljšal terapevtski učinek INK. Diplomsko naloga ima značaj bazične študije z močnim potencialom za uporabo izsledkov v medicini.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IMUNSKI SISTEM IN IMUNSKI ODZIV

Imunski sistem je celota celic, tkiv in molekul, ki omogočajo obrambo pred okužbami, boleznimi ter drugimi neželenimi biološkimi invazijami. Koordinirana reakcija teh celic in molekul zoper nevarnost v telesu se imenuje imunski odziv. Ključna naloga imunskega sistema je prepoznavanje ter uničevanje patogenov in rakastih celic, kar omogoča zaščito pred boleznimi in ohranjanje integritete organizma (Abbas in Lichtman, 2004). Gostiteljev imunski sistem se deli na prirojeno imunost, ki omogoča začetno, manj specifično obrambo zoper okužbe in pridobljeno imunost, ki se razvije počasneje in omogoča kasnejšo, specifično obrambo zoper nevarnosti (Abbas in Lichtman, 2004) (slika 1). Ključnega pomena za učinkovito obrambo zoper nevarnosti je sodelovanje med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom.



Slika 1: Aktivacija gostiteljevih obrambnih mehanizmov (Medzhitov, 2007: 824)

2.1.1 Prirojena imunost

Izraz prirojena imunost izvira iz dejstva, da je pri zdravem posamezniku stalno prisotna in običajno ne potrebuje predhodne izpostavitve patogenu. Prirojena imunost predstavlja prvo linijo gostiteljevega obrambnega sistema zoper patogene (Akira in sod., 2006). Omogoča preprečitev vstopa patogenov oziroma hitro odstranitev tistih, ki jim je uspelo vdreti v telo gostitelja in na ta način nadzira ali celo odstrani okužbe, še preden se aktivira pridobljena imunost. Glavni igralci prirojene imunosti so fagociti, kot so makrofagi in dendritične celice, oziroma DC (ang. »dendritic cells«). Zelo pomembna vloga prirojene imunosti je usmerjanje nadaljnjega pridobljenega imunskega odziva, saj obstaja neprestana interakcija med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom (natančno opisano pod točko 2.1.4). Prirojen imunski sistem poenostavljeno vsebuje epitelne bariere, fagocite (nevtrofilci, monociti, makrofagi in DC), celice naravne ubijalke oziroma NK (ang. »natural killer cells«) in sistem komplementa. Prirojen imunski sistem prepozna mikroorganizme z omejenim številom, v zarodni liniji zapisanih, konstitutivno izraženih receptorjev za prepoznavanje patogenov oziroma PRR (ang. »pathogen recognition receptors«). PRR prepoznavajo s patogeni povezane molekularne motive oziroma PAMP (ang. »pathogen-associated molecular patterns«), ki so nujni za preživetje mikroorganizmov in zato široko ohranjeni med vrstami. Različni PRR se izražajo na različnih mestih in se odzovejo na različne ligande ter aktivirajo specifične signalne poti, ki vodijo do različnih imunskih odzivov zoper patogene (Akira in sod., 2006). Osnovni mehanizem prepoznavanja PAMP je med vrstami in celo med najvišjimi sistematskimi kategorijami (debla, kraljestva), od rastlin, vinskih mušic do sesalcev zelo ohranjen (Akira in sod., 2006). Glavna skupina PRR so TLR.

2.1.2 Pridobljena imunost

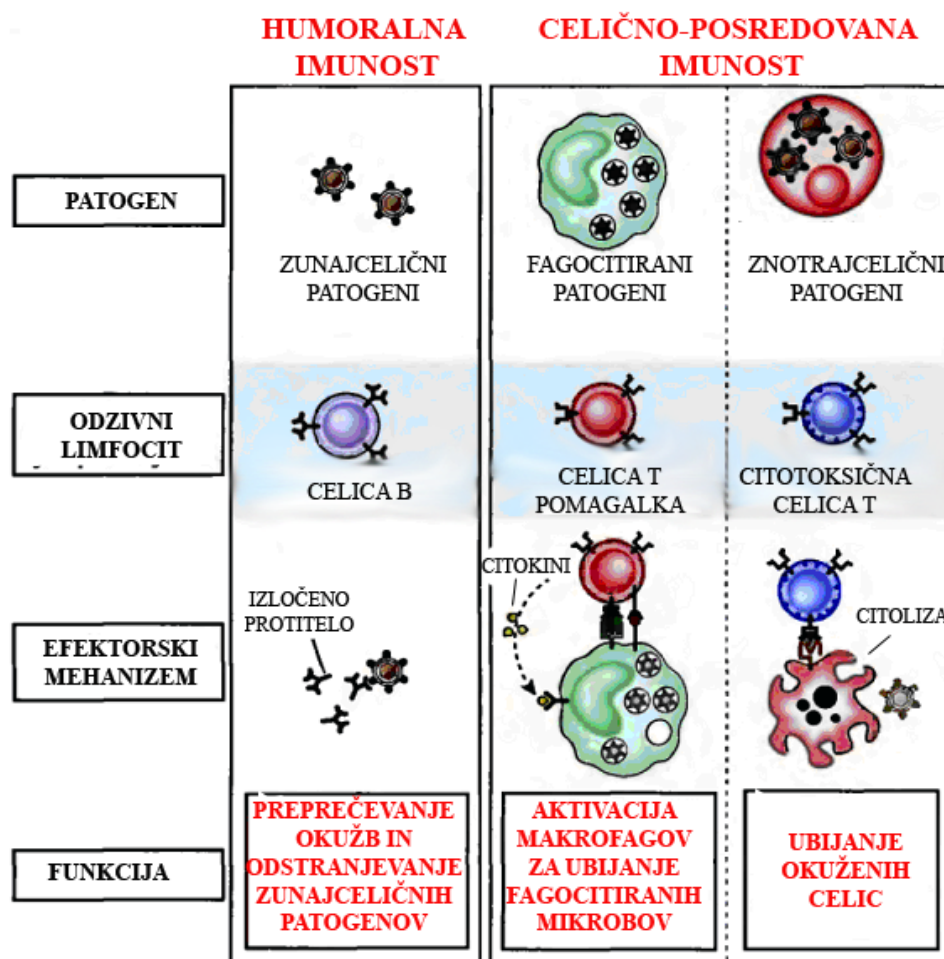
Pridobljena imunost se razvije počasneje od prirojene in je udeležena pri odstranjevanju patogenov v poznih fazah okužbe. Za pridobljeno imunost je značilna specifičnost, nastala v procesu razvoja imunskega repertoarja limfocitov v primarnih limfatičnih organih. Sprva se vzpostavi zelo bogat repertoar limfocitov, ki nosijo antigensko specifične receptorje, nastale v procesu somatske rekombinacije genskih odsekov, ki nosijo zapis za variabilne regije receptorjev. Nato v fazi zorenja in selekcije pride do izbora limfocitov s funkcionalnimi antigenskimi receptorji z ustrezno specifičnostjo (Abbas in Lichtman, 2004; Nemazee, 2006; Turner in sod., 2006). Poleg specifičnosti je za pridobljen imunski sistem značilen imunski spomin, ki omogoča ojačan in hiter odziv na ponovno okužbo. Pridobljen imunski sistem je visoko specializiran in omogoča različen in optimiziran odziv glede na vrsto mikroba. Sestavljajo ga limfociti in njihovi produkti. Pridobljena imunost se deli na humoralno imunost, kjer protitelesa nevtralizirajo in odstranijo zunajcelične mikrobe in toksine ter na celično posredovano imunost, kjer igrajo ključno vlogo limfociti T (slika 2) (Abbas in Lichtman, 2004).

2.1.2.1 Humoralna imunost

Vloga humoralne imunosti je odstranjevanje zunajceličnih mikrobov ter nevtralizacija mikrobnih toksinov. Glavni akterji humoralne imunosti so protitelesa. Protitelesni odziv se prične s prepoznavo nativnega antigena s specifičnim B celičnim receptorjem oziroma BCR (ang. »B-cell receptor« oz BCR), ki je v osnovi membransko vezan imunoglobulin na naivnih celicah B. Celice B se po prepoznavi antigena in sproženi signalizaciji ter ustreznih interakcijah s celicami T pomagalkami oziroma Th (ang. »T-helper cells«) namnožijo in diferencirajo v efektorske celice B, ki proizvajajo protitelesa. Pomemben proces, ki vodi do učinkovitega protitelesnega odziva je preklon težkih verig oziroma HCCS (ang. »heavy chain class switching«). Pri tem se tekom napredovanja humoralnega imunskega odziva spremeni težka veriga (izotip), ne pa tudi specifična protitelesa za določen antigen. Preklon izotipa je odvisen od tipa interakcij celice B s celico Th in od prisotnih citokinov. Različni citokini povzročijo preklon na različne izotipe protiteles, kar omogoča, da se imunski sistem odzove na različne tipe mikrobov na najbolj učinkovit način. Zorenje afinitete oziroma AM (ang. »affinity maturation«) je drug pomemben proces, pri katerem afiniteta protiteles za proteinske antigene narašča z daljšim časom ali ponovno izpostavitvijo antigenu. To se zgodi, ko del aktiviranih celic B potuje v limfne vozle, natančneje v folikularne germinalne centre, kjer pride do hitrih delitev, kar povzroči somatske mutacije v genih za variabilno verigo protitelesa in nadaljnjo selekcijo visoko afinitetnih klonov. Uspešen protitelesni odziv se konča z vzpostavitvijo repertoarja dolgoživečih in spominskih celic B, ki se hitro odzovejo na ponovno prisotnost ustreznega antigena (Abbas in Lichtman, 2004).

2.1.2.2 Celično posredovana imunost

Vloga celično posredovane imunosti je boj proti znotrajceličnim patogenom. Gre za patogene, ki okužijo ne-fagocitne celice ali pa za patogene, ki so jih fagociti internalizirali, vendar v teh celicah preživijo. Celično posredovano imunost vršijo celice T s specifičnimi T-celičnimi receptorji oziroma TCR (ang. »T-cell receptor«), s katerimi prepoznavajo antigenske peptide, predstavljene v molekulah poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa oziroma PHK (ang. »major histocompatibility complex« oziroma MHC). To jim omogoča, da prepoznajo in se odzovejo le na antigene, povezane z gostiteljevimi celicami (Abbas in Lichtman, 2004). Funkcionalni TCR z ustrežno specifično nastanejo v procesu razvoja imunskega repertoarja v timusu (Turner in sod., 2006). T-celični odziv sestavlja več faz. Sprva naivne celice Th prepoznajo antigenske peptide, predstavljene z molekulami PHK na lastnih celicah. Zatem se antigensko specifični kloni celic T namnožijo, čemur pravimo klonalna ekspanzija. Zadnja faza je diferenciacija aktiviranih celic T v efektorske in spominske celice, ki poskrbijo za odstranitev okužbe in nadaljnjo obrambo pred morebitno ponovno izpostavljenostjo enakemu patogenu (Abbas in Lichtman, 2004).



Slika 2: Humoralna in celično posredovana imunost (Abbas in Lichtman, 2004: 5)

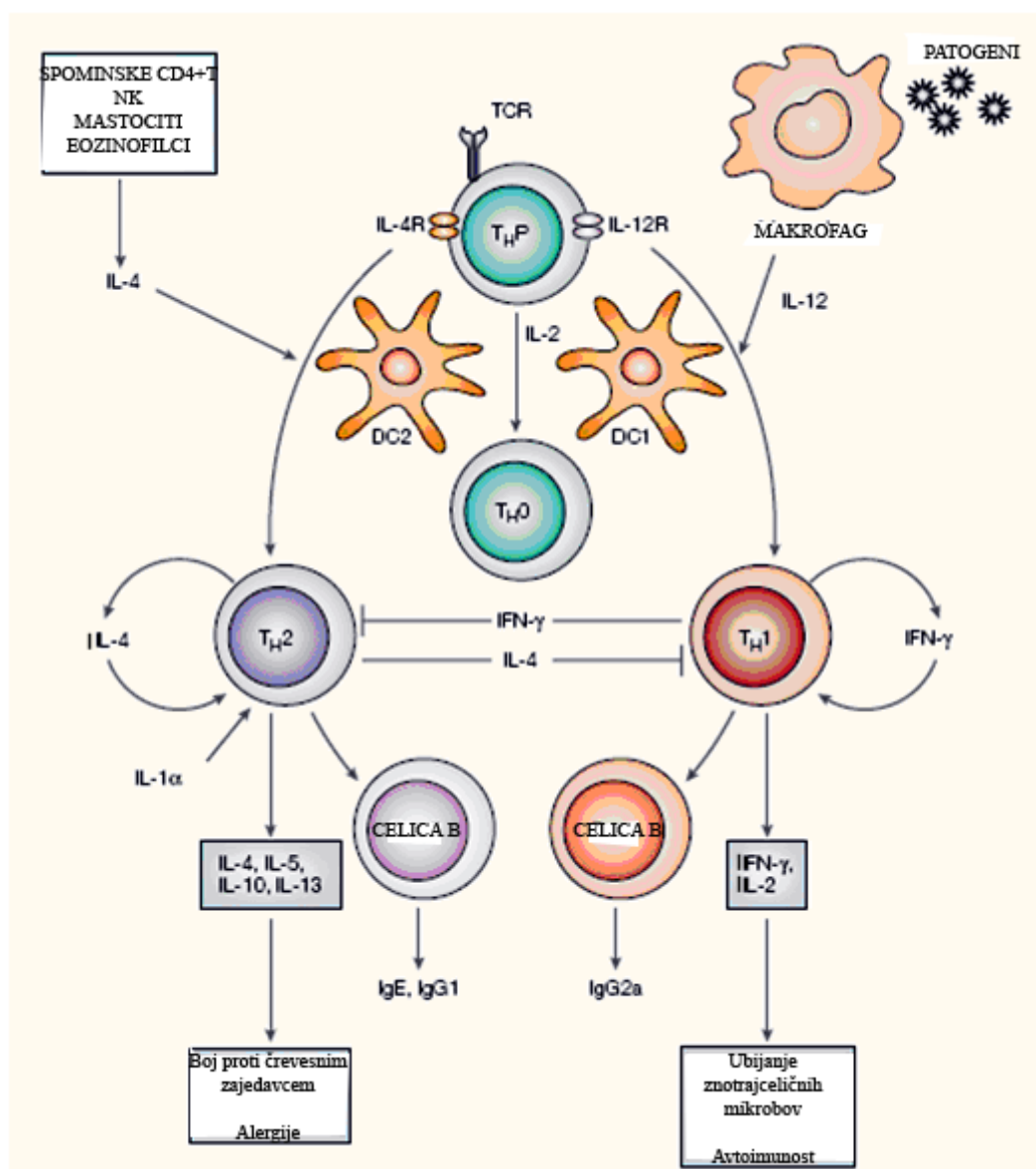
2.1.3 Imunološke signalne molekule

Kot odziv na prisotnost patogenov imunske celice pričnejo izločati proteine, ki jih imenujemo citokini. Beseda izvira iz grščine in pomeni »povzročiti gibanje celic«. Citokini so signalne proteinske molekule, velikosti med 8 in 30 kDa, ki delujejo avtokrino, parakrino in endokrino (Cannon, 2000). Proizvajajo se v majhnih količinah in se vežejo na visoko afinitetne receptorje na tarčnih celicah (Abbas in Lichtman, 2004). Vplivajo na rast, diferenciacijo in aktivacijo celic ter na ta način uravnavajo in usmerjajo naravo imunskega odziva (Commins in sod., 2010). Citokine lahko delimo na interleukine, limfokine in kemokine. Commins in sod. (2010) pa so citokine razdelili na dve osnovni skupini. Prvo skupino proizvajajo antigen predstavitvene celice oziroma APC (ang. »antigen presenting cell«), drugo pa limfociti T. Citokini sodelujejo pri citotoksični (protivirusno in protirakasto delovanje), humoralni, celično posredovani (Th1 in Th17) in alergijski imunosti (Th2) ali pa so imunosupresivni (Treg). Citokini, ki jih proizvajajo APC so, na primer, TNF, IL-1, IL-6 in IL-12. Citokini, povezani s citotoksično imunostjo, ki jo vršijo citotoksični CD8⁺T limfociti in celice NK so, na primer, IL-11 in interferoni tipa I (na primer IFN- α). Citokini, povezani s humoralno imunostjo so, na primer, IL-7, IL-11 in IL-21. Citokini, povezani s T celično imunostjo so IL-2, interferon tipa II (IFN- γ), IL-16 in

IL-17. Z alergijsko imunostjo so povezani IL-4, IL-5 in IL-13. V skupino protivnetnih citokinov spadajo TGF- β in interlevkini skupine IL-10.

Citokini torej vplivajo na celoten imunski odziv. Odgovorni so za polarizacijo imunskega odziva v smer Th1 ali Th2 (ang. »T helper 1« oziroma »T helper 2«), saj vplivajo na diferenciacijo naivne celice CD4+T (slika 3). Ko naivna celica CD4+T prvič prejme signale stimulacije s strani APC, začne proizvajati le IL-2, kasneje pa se pod vplivom citokinov diferencira v fenotipe, ki v nadaljnjem poteku imunskega odziva proizvajajo različen profil citokinov (Th1/Th2). IFN- γ in IL-12 povzročita diferenciacijo v smeri Th1, medtem ko IL-4 povzroči diferenciacijo v smeri Th2. Poleg tega določeni citokini posameznega tipa celic T delujejo inhibitorno na drug tip. IFN- γ selektivno inhibira delitev celic Th2, IL-10 pa inhibira citokinsko sintezo celic Th1. Funkcija celic Th1 in Th2 sovпада z različnim citokinskim profilom. Celice Th1 so udeležene v celično posredovanem vnetnem odzivu, celice Th2 pa pomagajo pri proizvodnji protiteles (Mosmann in Sad, 1996).

Pomembne signalne molekule imunskega sistema so tudi kemokini. Gre za majhne proteine (8-12 kDa), ki imajo sposobnost sproženja celične migracije ali kemotakse številnih celičnih tipov (nevtrofilci, monociti, limfociti, eozinofilci, fibroblasti in keratinociti). Kemokini vplivajo na aktivacijo imunskih celic in na sproženje imunskega odziva, poleg tega sodelujejo pri celjenju ran.



Slika 3: Vpliv citokinov na polarizacijo Th1/Th2 (Liew, 2002: 57)

2.1.4 Povezava med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom

Do nedavnega je bila prirojena imunost zapostavljena, saj je veljalo mnenje, da ključno vlogo pri imunskem odzivu igra pridobljena imunost. Danes je znano, da je prirojena imunost zelo pomembna kot prva obrambna črta zoper patogene, poleg tega bistveno sodeluje pri razvoju pridobljenega imunskega odziva. Polarizacija imunskega odziva je v veliki meri odvisna od začetnih signalov, ki jih sproži prirojena imunost (Guy, 2007).

Na podlagi spoznanj o mehanizmi in pomenu prirojene imunosti je napredovalo tudi vedenje o pridobljenem imunskem odzivu, predvsem na področju interakcij med glavnimi tipi imunskih celic (CD4+T, CD8+T in B). Na podlagi citokinskih profilov in načina modulacije B in CD8+T CTL celičnih odzivov so določili različne podtipе celic Th, kot so Th1 in Th2 (Mosmann in Sad, 1996) ter Th17 (Harrington in sod., 2006). Veliko novih

odkritij je bilo tudi na področju razvoja T- in B- celičnega imunskega spomina. Ugotovili so, na primer, da so spominske celice T heterogena skupina z različnimi efektorskimi funkcijami zato so jih razdelili na centralne in efektorske spominske celice T (Sallusto in sod., 2004), katerih nastanek in vzdrževanje sta odvisna od različnih signalov (Lanzavecchia in Sallusto, 2005).

Za indukcijo učinkovitega T- in B- celičnega odziva je potrebnih nekaj ključnih signalov, ki jih sproži prirojen imunski sistem in so shematsko prikazani na sliki 4 ter podrobneje opisani v naslednjih odstavkih. Signali prirojene imunosti določajo kvantiteto in kvaliteto pridobljenega imunskega odziva, ki je odvisen od narave patogena (Guy, 2007). Odziv proti znotrajceličnim in zunajceličnim patogenom oziroma antigenom je povsem drugačen. Obstajata dve osnovni poti procesiranja antigenov, ki omogočata, da se imunski sistem ustrezno odzove na znotraj oziroma zunajcelične patogene (Jensen, 2007; Trombetta in Mellman, 2005; Vyas in sod., 2008). Ločeni poti procesiranja antigenov omogočata, da so določeni podseti celic CD4+T usmerjeni zoper zunajcelične antigene in priskrbijo pomoč celicam B, ki preko BCR prepoznajo in internalizirajo antigene, celice CD8+T pa so (ob pomoči celic CD4+T) usmerjene proti znotrajceličnim antigenom, sintetiziranim v okuženih celicah, ki jih specifično prepoznajo, medtem ko zdravim celicam prizanesajo (Abbas in Lichtman, 2004).

2.1.4.1 Imunski odziv na zunajcelične patogene

Ko patogen vdre v telo, njegove PAMP prepoznajo PRR gostitelja na APC, kot so, na primer, DC. Prepoznavanje antigena in aktivacija APC je prvi signal za aktivacijo imunskega sistema (Guy, 2007). Zatem se antigen vnese v znotrajcelične razdelke, čemur pravimo internalizacija in se razgradi v peptide, ki se predstavijo v molekulah poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda II oziroma PHK II (ang. »major histocompatibility complex class II«, oziroma MHC II), kar označujemo z izrazoma »procesiranje« in predstavitev antigena. Antigenske peptide, predstavljene v molekulah PHK razreda II na APC, prepoznajo limfociti CD4+T s svojim TCR, ki je specifičen za isti antigen. Ta prepoznavanje predstavlja drugi signal aktivacije imunskega sistema. Tretji signal je ko-stimulacija, ki je odvisna od interakcij kostimulatornih molekul, kot sta B7 in CD40 na APC in CD-28 ter CD-40L na limfocitu CD4+T. Opisano dogajanje v prvih fazah imunskega odziva vodi do izražanja ustreznih imunskih posrednikov, kot so citokini, kar vodi polarizacijo imunskega odziva v smer, ki je potencialno optimalna za odstranitev patogena (Abbas in Lichtman, 2004).

Kot primer navajamo nekaj osnovnih citokinskih profilov imunskega sistema, ki določijo polarizacijo imunskega odziva. Ko ni prisotnega IL-12 oziroma sta prisotna IL-4 in IL-10, pride do polarizacije v smer celic Th2, ki proizvajajo IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 in IL-13 ter sodelujejo pri imunskih odzivih, neodvisnih od fagocitoze (Biedermann in sod., 2004). Pomagajo pri aktivaciji celic B in indukciji nastanka IgG1, IgE in IgA, ki omogočajo obrambo proti zunajceličnim patogenom. Primer je IL-4, ki povzroči preklon na razred IgE težke verige protiteles. Nastala protitelesa so učinkovita pri obrambi zoper črevesne zajedavce, saj ima IgE Fc (ang. »fragment crystalline«), ki ga prepozna Fc- ϵ RI receptor na eozinofilcih, ki v končni fazi odstranijo okužbo (Abbas in Lichtman, 2004).

Za ustrezen B-celični imunski odziv so bistvenega pomena interakcije med celicami Th in celicami B. Celice B so poseben tip APC, saj so del pridobljenega imunskega sistema. V nasprotju z DC in makrofagi, ki imajo površinsko izpostavljene PAMP, imajo celice B specifični BCR, ki je v osnovi membransko vezan imunoglobulin, specifičen za določen antigen. Ko celica B s svojim BCR prepozna ustrezen nativen antigen, ga internalizira, procesira in predstavi v molekulah PHK razreda II. To vodi do interakcij z aktiviranimi celicami Th, ki nosijo TCR, specifičen za isto antigensko komponento, ki je predstavljena v molekulah PHK razreda II celice B. Šele po specifični interakciji celica Th sproži dodatne signale, ki celici B z ustreznim BCR omogočijo klonalno ekspanzijo in diferenciacijo (Bishop in Hostager, 2001; McHeyzer-Williams LJ in McHeyzer-Williams MG, 2005). Končni rezultat dogajanja je proizvodnja protiteles z isto specifikom in nadaljnje zorenje afinitete v germinalnih centrih folikularne B celične cone ter preklap težkih verig, kar je nujno za razvoj učinkovitega humoralnega odziva. Končno stanje po srečanju z antigenom in učinkovitim imunskim odzivom je vzpostavitev repertoarja dolgoživečih in spominskih celic B, ki se hitro odzovejo na ponovno prisotnost ustreznega antigena.

2.1.4.2 Imunski odziv na znotrajcelične patogene

Obramba zoper znotrajcelične patogene poteka na povsem drugačen način kot zoper zunajcelične, saj humoralni odziv ni učinkovit v boju proti virusom, nekaterim bakterijam, ki lahko uidejo iz endosoma in spremenjenim proteinom v citoplazmi (Abbas in Lichtman, 2004).

Ko makrofagi ali DC fagocitirajo patogene ali s patogeni okužene lastne celice, začnejo izločati vnetne citokine, kot je, na primer, IL-12, ki povzroči Th1 celično polarizacijo in nadaljnjo proizvodnjo IL-2, IFN- γ in TNF- α . Nastali citokini stimulirajo od fagocitoze odvisno obrambo proti znotrajceličnim patogenom, celično posredovane imunske odzive, aktivacijo citotoksičnih celic CD8+T (ang. »cytotoxic T lymphocytes« oziroma CTLs) in proizvodnjo komplement-fiksirajočih protiteles IgG2a in IgG3 (Abbas in Lichtman, 2004).

V primeru celično posredovanega imunskega odziva se citosolni antigeni predstavijo v molekulah PHK razreda I, ki so prisotne na vseh celicah z jedrom, saj se vse celice lahko okužijo z virusi. Antigenske peptide, predstavljene v molekulah PHK razreda I prepoznajo celice CD8+T z ustreznim TCR in se nato ob pomoči celic Th diferencirajo v CTL. Te celice ubijejo okužene celice, kar je najučinkovitejši način za odstranitev citoplazemskih patogenov (Bevan, 2004; Guernonprez in sod., 2002).

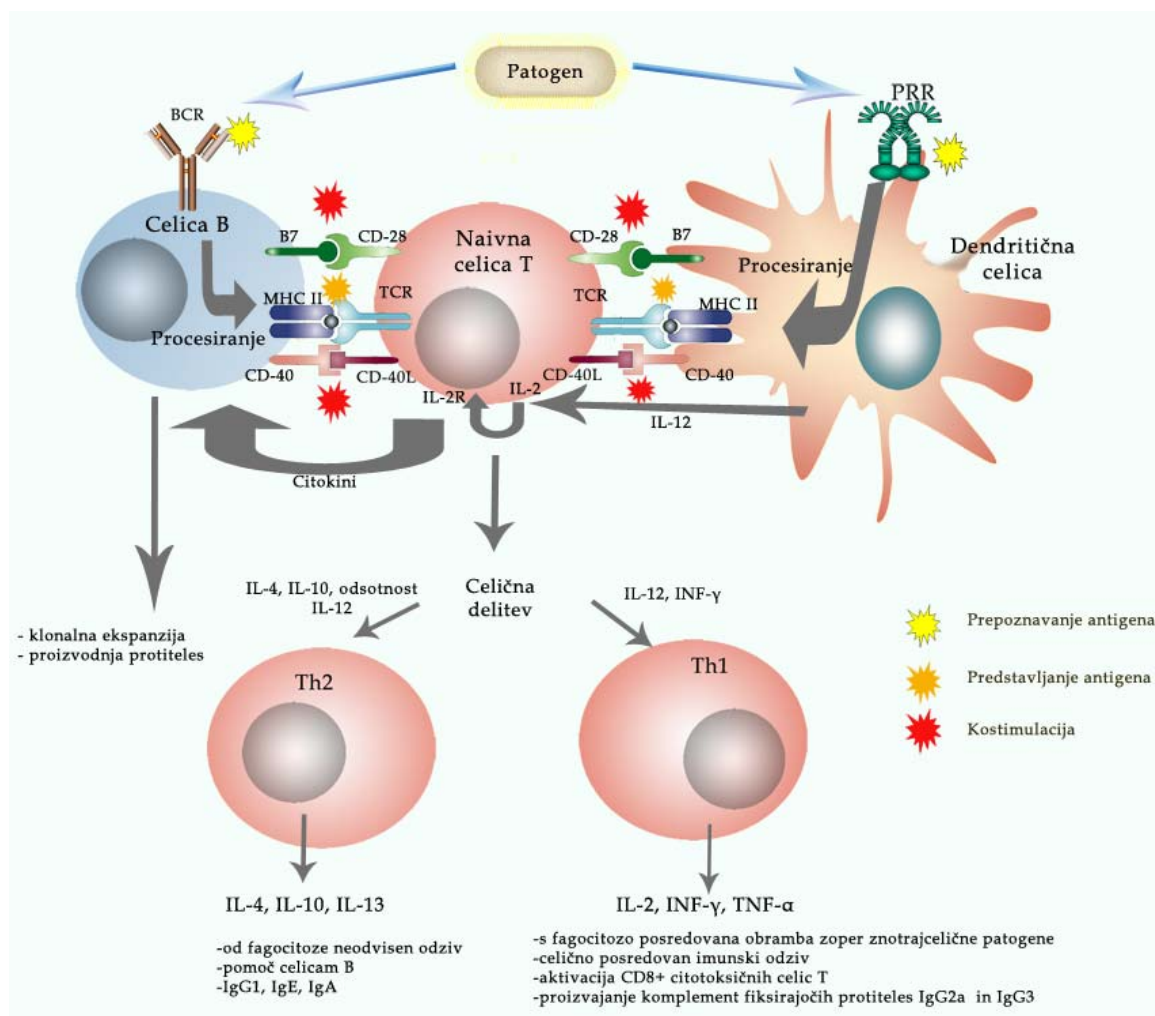
2.1.4.3 Navzkrižna predstavitev antigenov in avtofagija

DC lahko poleg zbiranja endogenih peptidov za predstavitev v molekulah PHK razreda I celicam CD8+T z molekulami PHK razreda I predstavljajo tudi zunajcelične antigenske peptide, ki so prišli v celico po endocitotski poti, čemur pravimo navzkrižna predstavitev antigenov (ang. »cross presentation«). Ta mehanizem je ključnega pomena za iniciacijo CD8+T celičnega odziva na antigene, ki sicer ne bi prišli v PHK I pot procesiranja v DC (Jensen, 2007). Znotrajcelične spremembe v neimunskih celicah, kot so virusne okužbe ali maligne transformacije, je potrebno posredovati imunskemu sistemu, da se zagotovi

CD8⁺T celični odziv, ki bo odstranil takšne škodljive spremembe. Neimunske celice niso sposobne vršiti PHK II poti procesiranja. Prav tako ne morejo kostimulirati celice CD8⁺T, ki je s svojim TCR prepoznala antigeni peptid, predstavljen v molekulah PHK razreda I na neimunski celici. Stimulacijo naivnih celic T lahko vršijo le profesionalne APC, kot so DC (Kurts in sod., 2010). V procesu navzkrižne predavitve antigenov APC torej fagocitirajo in razgradijo okužene neimunske celice in poleg običajne PHK II poti procesiranja vršijo tudi netipično PHK I pot procesiranja antigenov, ki se konča s predavitvijo antigenih peptidov celicam CD8⁺T. Mehanizem tega dogajanja je kompleksen in izčrpno opisan (Jensen, 2007; Kurts in sod., 2010; Trombetta in Mellman, 2005; Vyas in sod., 2008).

Avtofagija je pomemben imunski proces, pri katerem kisla vakuola z dvojno membrano, imenovane avtofagosomi, zbirajo znotrajcelično vsebino (poškodovani organeli ali makromolekule) in jo po fuziji z lizosomi razgradijo. To pomeni, da ima avtofagija pomembno vlogo pri vzdrževanju celične homeostaze. Novejše raziskave kažejo, da je njena vloga tudi vnos citosolnih antigenov v PHK II pot procesiranja in prezentacije. Avtofagija usmerja patogene, ki bivajo v citosolu ali v fagosomih v endolizosomalno pot razgradnje (Trombetta in Mellman, 2005; Vyas in sod., 2008). Kljub temu da je avtofagija v profesionalnih APC konstitutiven proces, jo signalizacija TLR lahko regulira. Signalizacija TLR7 lahko, na primer, inducira avtofagijo. Velja pa tudi nasprotno - avtofagija lahko stimulira signalizacijo TLR, saj v endosome prinese TLR ligande, kot je, na primer, dvRNK. To pomeni, da avtofagija sodeluje pri zorenju DC (Vyas in sod., 2008). Funkcionalna posledica razgradnje citosolnih antigenov v avtofagosomih je razširjen peptidni repertoar, predstavljen z molekulami PHK razreda II na površini celic. Poleg zunajceličnih je z molekulami PHK razreda II predstavljen tudi del znotrajceličnih antigenov (Vyas in sod., 2008). Takšen mehanizem lahko ojača imunski odziv proti endogenim patogenom.

Poenostavljeno lahko torej trdimo, da je končni rezultat (polarizacija) imunskega odziva odvisen od tega, kateri igralec prirojene imunosti (DC, makrofag, celica NK) je prepoznal patogena, kako je predstavil peptide, izvirajoče iz antigenih komponent patogena ali okuženih gostiteljevih celic (PHK I ali PHK II pot procesiranja) in katere imunomodulatorne molekule je začel proizvajati (na primer IL-12). To pomeni, da je za razumevanje imunskega sistema in odziva potrebno gledati na začetni prirojeni in nadaljnji prirojeni odziv kot celoto.

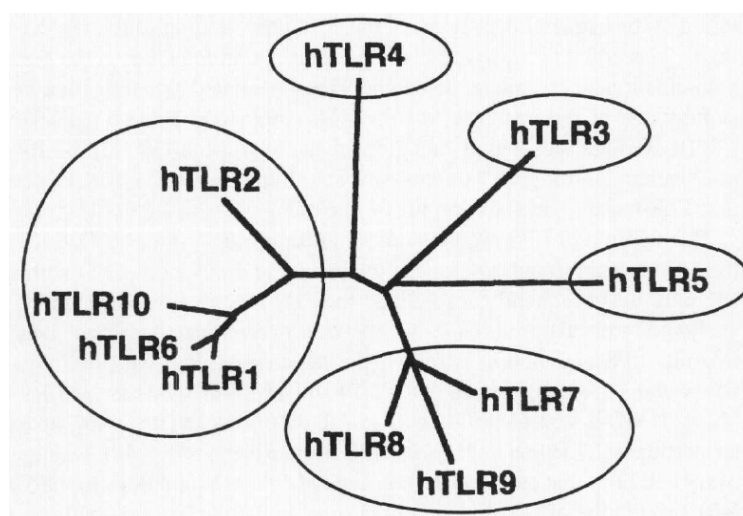


Slika 4: Sodelovanje med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom

Vsebina slike je osnovana na informacijah iz knjige (Abbas in Lichtman, 2004) ter članka (Mosmann in Sad, 1996). Narejena je bila za namen slovenske iGEM ekipe 2008 (Team Slovenia ..., 2008).

2.2 TOLL-U PODOBNI RECEPTORJI

Receptorji TLR so transmembranski receptorji tipa I, ki prepoznavajo in se odzivajo na različne strukture, povezane s patogenimi mikroorganizmi (Gay in Gangloff, 2007). Odkritje vretenčarskih TLR sloni na homologiji z genskim produktom Toll, za katerega so pokazali, da pri modelnem organizmu *Drosophila melanogaster* vodi do razvoja dorzo-ventralne polarnosti embria (Anderson in sod., 1985; Belvin in Anderson, 1996; Hashimoto in sod., 1988). Kasneje so ugotovili, da igra protein Toll ključno vlogo pri obrambnem odzivu vinskih mušic zoper glive (Lemaitre, 2004; Lemaitre in sod., 1996). Leto po tem odkritju so identificirali sesalski homolog proteina Toll (Medzhitov in sod., 1997). Danes vemo, da so TLR evolucijsko ohranjeni od gliste *Caenorhabditis elegans* do sesalcev (Akira in Takeda, 2004; Hoffmann, 2003; Janeway in Medzhitov, 2002). Do sedaj pri sesalcih poznamo 12 predstavnikov družine receptorjev TLR, ki jih lahko razdelimo na osnovi primarne sekvence na več poddružin, ki prepoznavajo sorodne PAMP (slika 5). Poddružina TLR1, TLR2 in TLR6 prepozna lipide, medtem ko poddružina TLR7, TLR8 in TLR9 prepozna nukleinske kisline. Nekateri TLR, kot je TLR4, lahko prepoznajo več strukturno nesorodnih ligandov. V preglednici 1 so prikazani TLR receptorji in njihovi ligandi.



Slika 5: Filogenetsko drevo človeških TLR (Takeda in sod., 2003: 339)

Preglednica 1: TLR receptorji in njihovi ligandi (Gay in Gangloff, 2007: 144)

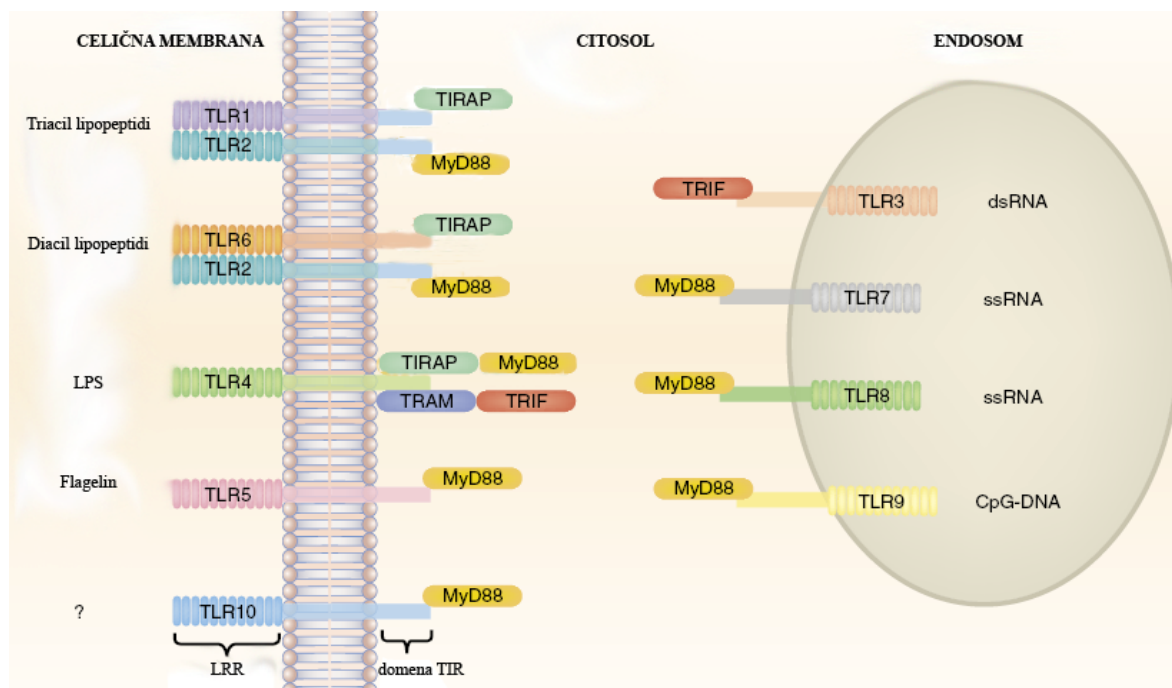
TLR	LIGAND	IZVOR LIGANDA
TLR1/2	Triacil lipopeptidi (Pam ₃ CSK ₄)	Bakterije in mikobakterije
TLR2	Lipoproteini in lipopeptidi Diacil lipopeptidi (Pam ₃ CSK ₄ , MALP ₂ SK ₄) Peptidoglikan Lipoteihoična kislina Zimosan Hialuronan Hsp70	Veliko različnih patogenov Sintetični ligandi G+ bakterije G+ bakterije Glive Gostitelj Gostitelj

se nadaljuje

nadaljevanje

TLR	LIGAND	IZVOR LIGANDA
TLR3	dvoverižna RNK in njen sintetični analog poli(I:C)	Virusi
TLR4	Lipopolisaharid oziroma LPS Taksol Fuzijski protein Hsp60 in Hsp70 Fragment fibronektina (EDA)	G- bakterije Rastline Respiratorni sincicijski virus (RSV) Gostitelj Gostitelj
TLR5	Flagelin	Bakterije
TLR2/6	Diacil lipopeptidi	Mikoplazme
TLR7	evRNK, imidazokvinolini (imiquimod, R848)	Sintetični ligandi
TLR8	evRNK, R848	Sintetični ligandi
TLR9	Nemetilirana CpG DNK	Bakterije, virusi, kvasovke, insekti

TLR se izražajo na različnih imunskih celicah, vključno z makrofagi, DC, celicami B, in določenimi tipi celic T, poleg tega tudi na neimunskih celicah, kot so fibroblasti in epitelne celice. Izražanje TLR ni statično, temveč se uravnava kot odziv na patogene, citokine in okoljski stres. TLR so lokalizirani v celični membrani ali v membranah znotrajceličnih razdelkov. Medtem ko TLR 1, 2, 4, 5, 6 najdemo na celični površini, se TLR 3, 7, 8, 9 nahajajo skoraj izključno v znotrajceličnih razdelkih kot so endosomi (slika 6) (Akira in sod., 2006).

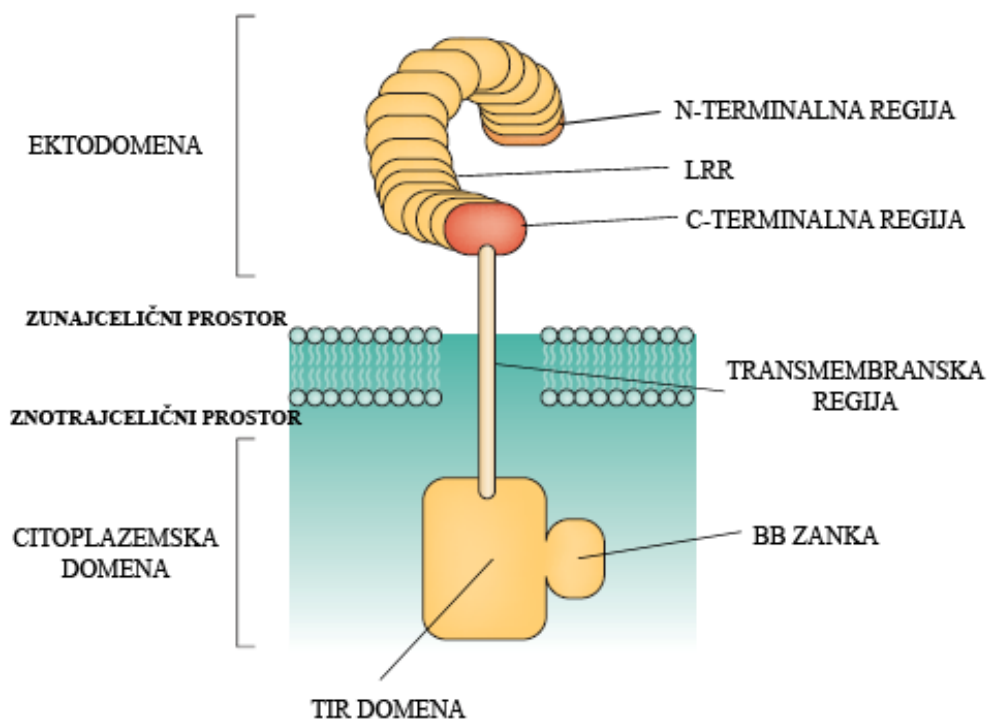


Slika 6: Celična lokalizacija človeških TLR (Kanzler in sod., 2007: 553)

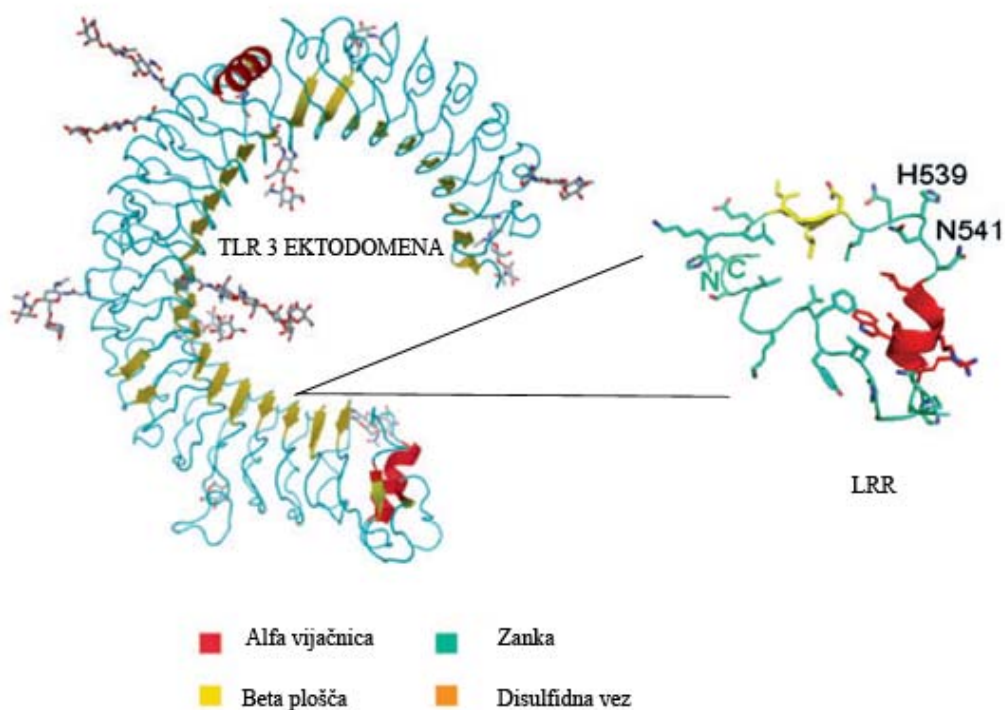
2.2.1 Struktura TLR

Vsi predstavniki TLR imajo ohranjeno modularno strukturo. TLR so integralni membranski glikoproteini tipa I (N-terminalni del proteina je usmerjen v zunajcelični prostor). Sestavljeni so iz zunajcelične ektodomen, ki vsebuje različno število z levicini bogatih ponovitev oziroma LRR (ang. »leucine-rich-repeat«) in je preko transmembranske alfa vijačnice povezana s citoplazemsko domeno, ki je odgovorna za signalizacijo (Gay in sod., 2006). Citoplazemska domena TLR je homologna citoplazemski signalizacijski domeni interlevkinskega receptorja 1 oziroma IL-1R, zato jo imenujemo domena TIR (Toll/IL-1R) (Bowie in O'Neill, 2000) (slika 7). Domene LRR so odgovorne za vezavo PAMP. Sestavlja jih 19-25 tandemskih motivov LRR, od katerih vsak vsebuje 24-29 aminokislinskih ostankov z ohranjenim aminokislinskim motivom XLXXLXX, pri čemer so levicinski ostanki lahko zamenjani s hidrofobnimi. Vsak LRR ima sekundarno strukturo beta plošče in alfa vijačnice, ki sta povezani z zanko (Akira in sod., 2006) (slika 8). Na podlagi aminokislinskega zaporedja LRR in homolognega modeliranja so napovedali, da imajo ektodomen podkvasto terciarno strukturo (Bell in sod., 2003), kar se je leta 2005 ob določitvi terciarne strukture ektodomen človeškega TLR3 (Bell in sod., 2005; Choe in sod., 2005) izkazalo za pravilno (slika 8).

Vezava ustreznega liganda na receptor TLR povzroči dimerizacijo in konformacijske spremembe, potrebne za nadaljnjo signalizacijo. Pred kratkim (Liu in sod., 2008) so določili terciarno strukturo dimera mišjih ektodomen TLR3 z vezanim ligandom dvRNK (46 bp) (slika 9), kar pojasnjuje mehanizem vezave liganda na TLR3. Struktura receptorskega kompleksa in usmerjena mutageneza sta potrdili obstoj N-končnega vezavnega mesta. V strukturi je vidno, da obe vezavni mesti interagirata samo s fosfatnim in riboznim ogrodjem dvRNK, našli pa so tudi mesto homotipične interakcije med samima ektodomenama preko njunih LRR C-končnih regij. V receptorskem kompleksu, ki je viden iz kristalne strukture, je razdalja med N-končnima vezavnima mestoma maksimalna in ustreza dolžini 46 bp dolge dvRNK. To je verjetno najstabilnejša ureditev, ni pa edina. Kompleks v kristalni strukturi namreč ne razloži meje aktivacije s kratkimi, 21 do 40 bp dolgimi dvRNK, med njimi tudi majhno interferenčno RNK oziroma siRNK (ang. »small interfering RNA«). Zato so predpostavili dodaten model vezave (Pirher in sod., 2008), v katerem sta ektodomeni zamaknjeni za dolžino enega zavoja bližje skupaj. Posledica je večja razdalja med C-končnima vezalnima mestoma, ki pa ne ovira dimerizacije domen TIR. Po tem modelu se lahko veže na TLR3 in ga tudi aktivira 21 bp dolga dvRNK, kot je majhna interferenčna RNK oziroma siRNK (ang. »small interfering RNA«) (slika 10).

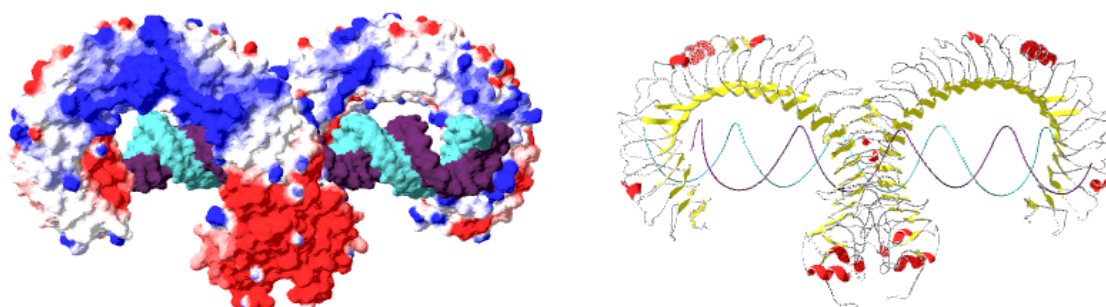


Slika 7: Osnovna arhitektura TLR (Gay in sod., 2006: 694)

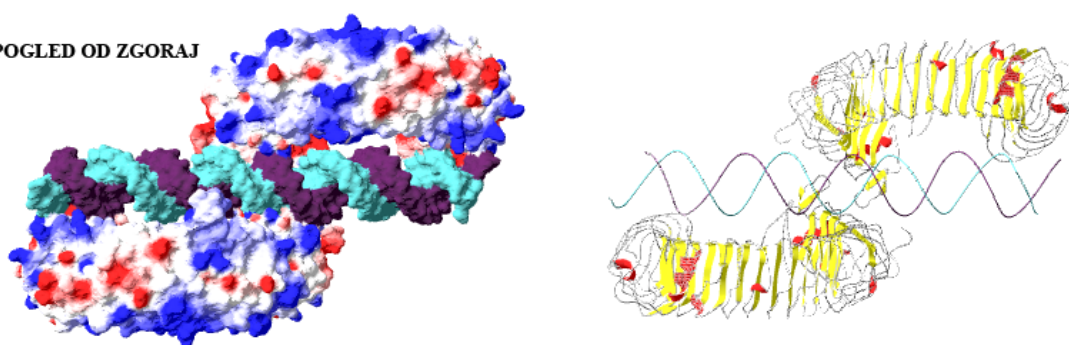


Slika 8: Terciarna struktura ektodomene človeškega TLR3 in z levcini bogate regije (LRR) (Gay in Gangloff, 2007: 146)

STRANSKI POGLED

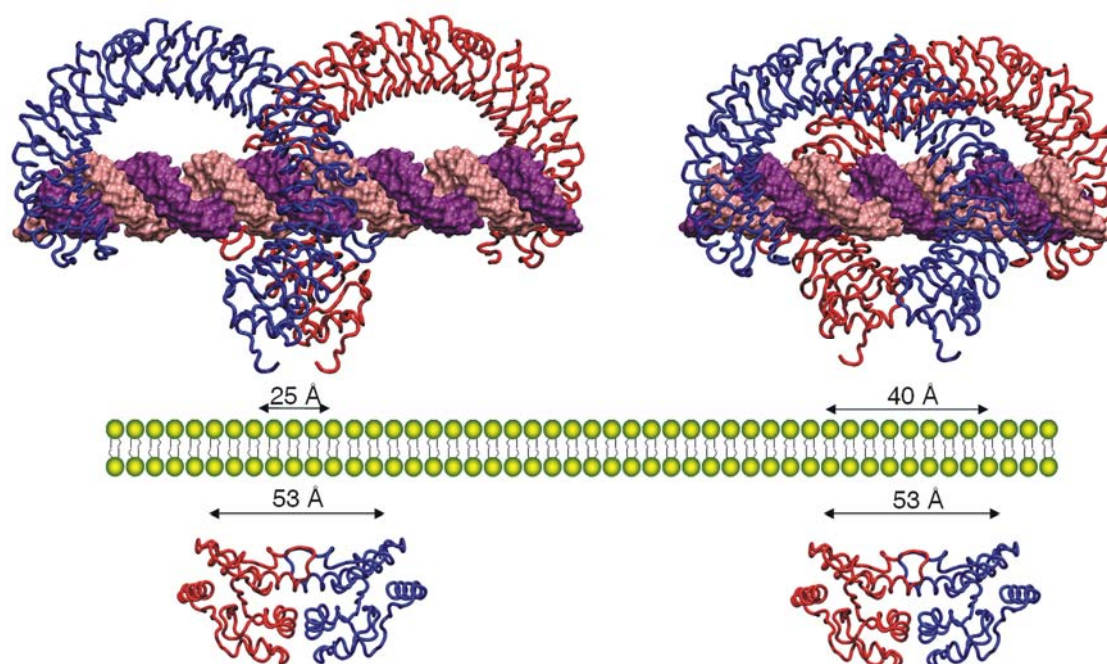


POGLED OD ZGORAJ



Slika 9: Terciarna struktura kompleksa mišjega TLR3 in liganda dvRNK

Različni pogledi na dimer ektodomen z vezanim ligandom dvRNK (46 bp), predstavljen z uporabo programske opreme Swiss-PdbViewer (Guex in Peitsch, 1997) in PDB strukture 3CIY (Liu in sod., 2008). Dimer ektodomen je na levem delu slike predstavljen kot molekulska površina, pri čemer modra barva predstavlja pozitiven elektrostatski potencial, rdeča pa negativnega. DvRNK je predstavljena s sivo barvo. Na desnem delu slike je isti kompleks predstavljen s sekundarno strukturo dimera ektodomen, pri čemer rumena barva predstavlja beta ploščo, rdeča pa alfa vijačnico.



Slika 10: Model dveh vezavnih mest za aktivacijo TLR3 (Pirher in sod., 2008: 762)

Aktivacijo omogočajo različne razdalje med C-končnim delom ektodomen TLR3, ki so odvisne od dolžine dvRNK. Na levi strani je razširjena konformacija iz določene terciarne strukture (Liu in sod., 2008), na desni pa je predpostavljena konformacija kjer je TLR3 dimer bliže za en zavo vijačnice dvRNK (Pirher in sod., 2008).

2.2.2 Vloga TLR

Glavna vloga TLR je zaznavanje patogenov, aktivacija imunskega sistema in nadaljnje usmerjanje pridobljenega imunskega odziva. Signalizacija TLR aktivira APC, kar vodi do proizvodnje vnetnih citokinov, vključno z IL-6 in TNF- α . Vnetni citokini aktivirajo sosednje celice, ki začnejo proizvajati kemokine in adhezijske molekule, kar omogoča ostalim imunskim celicam najti mesto okužbe. Aktivirani makrofagi in nevtrofilci, ki so prišli na mesto okužbe, lahko delujejo neposredno na patogene, saj jih preko PRR internalizirajo ter s proizvodnjo dušikovega oksida, reaktivnih kisikovih zvrsti in defenzinov, uničijo (Kaisho in Akira, 2006).

Poleg tega TLR igrajo ključno vlogo pri aktivaciji in nadaljnjem razvoju pridobljenega imunskega odziva, o čemer smo podrobno govorili v poglavju 2.1.4, zato bomo na tem mestu le na kratko povzeli bistvo. APC, ki jih je aktivirala signalizacija TLR, povečajo ekspresijo površinskih molekul, kar ob ustreznem prepoznavanju predstavljenega antigena vodi do aktivacije celic T. Polarizacija imunskega odziva je v veliki meri odvisna od začetnih signalov, ki jih sproži signalizacija TLR, saj povzroča selektivno diferenciacijo naivnih celic CD4+T v smer Th1 ali Th2. Celice Th1 proizvajajo IFN- γ , kar omogoča boj proti virusom in bakterijam, medtem ko celice Th2 proizvajajo IL-4 in IL-13 ter sprožijo avtoimunske odzive in obrambo proti črevesnim zajedavcem. Večina ligandov TLR v APC povzroči proizvodnjo Th1 citokinov, kot sta IL-12 in IL-18, kar vodi do nadaljnje polarizacije imunskega odziva v smer Th1 (Kaisho in Akira, 2006).

2.2.3 Signalizacija TLR

Ob vezavi ustreznega liganda na receptor TLR pride do dimerizacije in konformacijskih sprememb, ki so potrebne za interakcije adapterskih molekul, ki vsebujejo domeno TIR, z domeno TIR receptorja TLR. To vodi do signalne kaskade in indukcije genov, udeleženih v gostiteljevi obrambi zoper patogene (Akira in sod., 2006). Poznane so štiri adapterske molekule. Prva je MyD88 (ang. »myeloid differentiation primary-response protein 88«), druga TIRAP/MAL (ang. »TIR-associated protein/MyD88-adaptor-like«), tretja TRIF/TICAM1 (ang. »TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β /TIR-domain-containing molecule 1«) in četrta TRAM (ang. »TRIF related adaptor molecule«). Različne odzive, ki jih sprožijo različni ligandi TLR, lahko delno pojasnimo s selektivno uporabo adapterskih molekul. MyD88 in TRIF sta odgovorna za aktivacijo različnih signalnih poti. Prvi vodi do proizvodnje vnetnih citokinov, drugi pa do IFN tipa I (Akira in sod., 2006).

Signalizacija preko receptorjev TLR je predstavljena na sliki 11. Kot primer je prikazana signalizacija preko receptorja TLR4, ki sproži tako MyD88 odvisno kot tudi neodvisno (od TRIF odvisno) pot.

2.2.3.1 Od proteina MyD88 odvisna pot

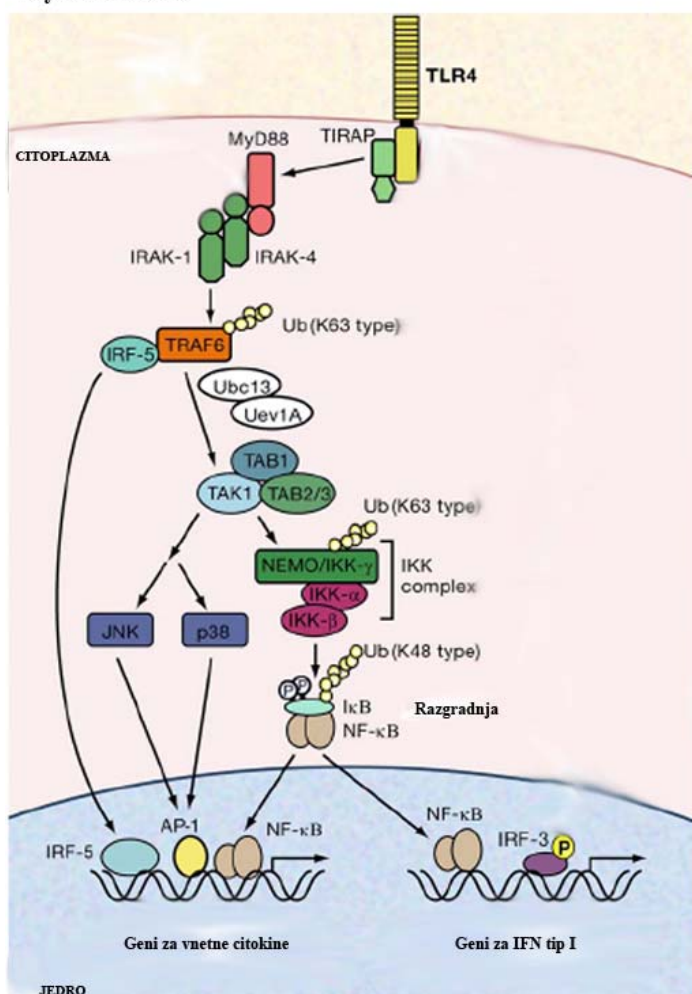
MyD88 je ključen za signalizacijo vseh TLR, razen TLR3. Po stimulaciji se poveže s citoplazemsko domeno receptorjev TLR in nato preko homofilnih interakcij z domeno smrti oziroma DD (ang. »death domain«) interagira s kinazama IRAK-4 (ang. »IL-1R-associated kinase 4«) in IRAK-1. Pri signaliziranju preko receptorjev TLR4 in TLR2 sodeluje kot adapterski protein za vezavo MyD88 na TLR še TIRAP/Mal. V nadaljevanju IRAK-4 fosforilira IRAK-1, slednja pa se nato poveže s TRAF6 (ang. »TNFR-associated factor 6«) (Akira in sod., 2006), ki deluje kot ubikvitin protein ligaza (E3) (Li in sod., 2002). TRAF6 s pomožnim encimskim kompleksom katalizira poliubikvitinacijo IKK- γ /NEMO (ang. »NF- κ B essential modulator«) (Deng in sod., 2000). Na TRAF6 se prav tako poveže kompleks, sestavljen iz TAK1 (ang. »TGF- β -activated kinase 1«) in TAK1-vezavnih proteinov TAB1, TAB2 in TAB3 (Wang in sod., 2001). Zatem TAK1 fosforilira in s tem aktivira IKK- γ in MKK6 (ang. »MAP kinase kinase 6«). Fosforilirani IKK se ubikvitinira in razgradi s proteasomom, prost NF- κ B (ang. »nuclear factor κ B«) pa potuje v jedro in sproži izražanje genov za vnetne citokine. Sočasno TAK aktivira MAP (ang. »mitogen-activated protein«) kinazno kaskado, kar vodi do aktivacije AP-1 (ang. »Activating protein«), ki je prav tako pomemben za indukcijo citokinskih genov (Akira in sod., 2006).

2.2.3.2 Od TRIF odvisna pot

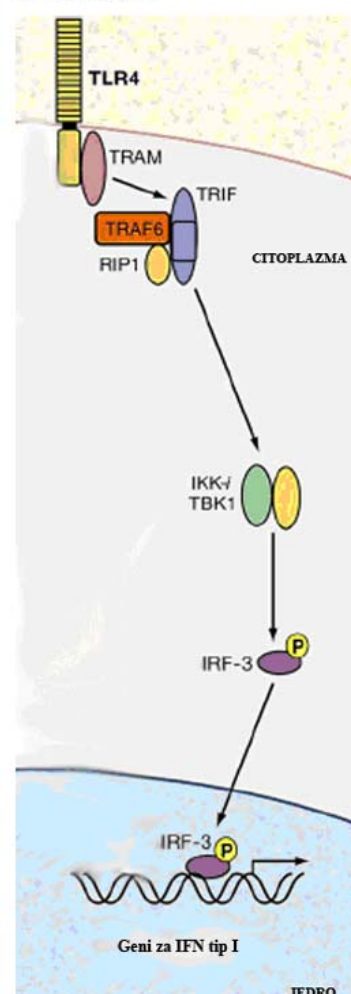
Stimulacija z ligandi TLR3, TLR4, TLR7 in TLR9 sproži proizvodnjo interferonov tipa I. TLR3 in TLR4 lahko inducirata IFN gene v *MyD88*^{-/-} celicah (Akira in sod., 2006). Aktivnost teh poti vodi do zorenja DC, ekspresije kostimulativnih molekul in nastanka IFN- α/β (Kaisho in Akira, 2006). Ta pot se ne prične z adapterjem MyD88, temveč s TRIF, ki prav tako vsebuje domeno TIR (Hoebe in sod., 2003). Pri signalizaciji TLR4 je

specifično udeležen še protein TRAM (Fitzgerald in sod., 2003b), ki služi kot premostitveni adapter med TLR4 in TRIF. TRIF interagira z RIP1 (ang. »receptor-interacting protein 1«), ki je odgovoren za aktivacijo NF- κ B (Meylan in sod., 2004). Poleg tega TRIF preko TRAF3 aktivira TBK1 (ang. »TANK binding kinase 1«, pri čemer je TANK ang. »TRAF-family-member-associated NF- κ B activator«) (Hacker in sod., 2006). TBK1 sestavlja družina z inducibilno I- κ B kinazo (IKK- β), ki neposredno fosforilira IRF-3 (ang. »interferon regulatory factor«) in IRF-7 (Fitzgerald in sod., 2003a). Fosforilirana IRF-3 in IRF-7 tvorita homodimere, ki potujejo v jedro in povzročijo ekspresijo nabora IFN (ang. »interferon«)-inducibilnih genov.

MyD88-odvisna



TRIF-odvisna



Slika 11: Signalizacija receptorjev TLR (Akira in sod., 2006: 790)

Na levi strani je prikazana od MyD88 odvisna pot, na desni pa od TRIF odvisna pot.

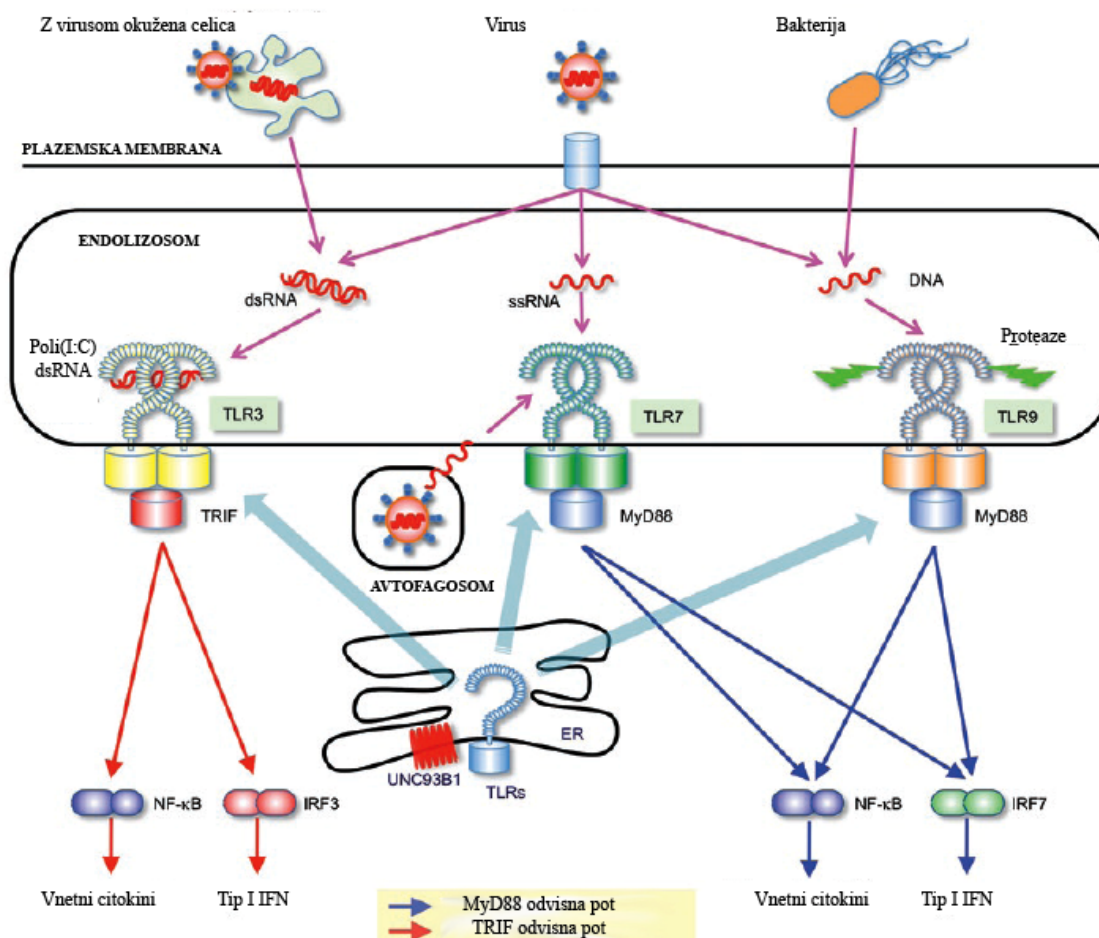
2.2.4 Prepoznavanje nukleinskih kislin preko endosomalnih TLR

Po odkritju stimulatornega učinka bakterijske DNK, ki preko TLR9 deluje na celice sesalskega imunskega sistema (Hemmi in sod., 2000), so odkrili celotno družino endosomalnih TLR, ki zaznavajo tuje nukleinske kisline (slika 12). TLR v endosomih prepoznavajo različne naravne ligande: TLR3 prepozna dvRNK (Alexopoulou in sod., 2001), TLR7 evRNK (Diebold in sod., 2004), TLR8 prav tako evRNK (Heil in sod., 2004) in TLR9 evDNK (Hemmi in sod., 2000).

Pomen endosomalnih TLR je prepoznavanje in imunski odziv na tuje nukleinske kisline, ki se sprostijo iz bakterij in virusov oziroma celic, ki so z virusi okužene. Ko se na endosomalne TLR vežejo ustrezne nukleinske kisline, pride do izražanja IFN tipa I. Ti sprožijo nastanek različnih protivirusnih proteinov, povečajo izražanje molekul PHK in inducirajo zorenje DC, kar omogoča imunski odziv proti virusom (Kaisho in Akira, 2006).

Izražanje TLR, ki prepoznavajo nukleinske kisline je omejeno na določene tipe celic. V plazmacitoidnih dendritičnih celicah oziroma pDC (ang. »plasmacytoid dendritic cell«), ki proizvajajo IFN tipa I se izražata TLR7 in TLR9 (Colonna in sod., 2004), ne pa tudi TLR3. Slednji se izraža v konvencionalnih dendritičnih celicah oziroma cDC (ang. »conventional dendritic cells«) (Akira in sod., 2006).

Ker so vse nukleinske kisline strukturno podobne molekule, je meja med lastnimi in tujimi lahko v določenih primerih zabrisana. To pomeni, da obstaja potencialna nevarnost avtoimunskih motenj. Primer so CpG motivi, ki se nahajajo tudi v DNK sesalcev in potencialno lahko aktivirajo TLR9. Prav tako lahko gostiteljeva evRNK oziroma dvRNK služi kot ligand za TLR7 oziroma TLR3. Zato v gostitelju obstajajo različni mehanizmi, ki omejujejo škodljive vplive imunskega sistema (Kaisho in Akira, 2006). Ključna je lokalizacija TLR, ki prepoznavajo nukleinske kisline, saj je omejena na endosome. Tukaj pride do prepoznavanja ustreznih ligandov, ki morajo z internalizacijo sprva priti v endosomalno pot, da lahko poteče nadaljnja signalizacija (Akira in sod., 2006). Zanimiv poskus, kjer so TLR9 izrazili na površini celice, je pokazal, da tudi lastna DNK lahko aktivira receptor (Barton in sod., 2006).



Slika 12: Prepoznavanje nukleinskih kislin preko endosomalnih TLR (Kawai in Akira, 2010: 376)

2.2.4.1 Receptor TLR3

Virusna dvRNK je PAMP, ki ga prepozna TLR3 (Alexopoulou in sod., 2001; Matsumoto in sod., 2002). Tekom virusnega razmnoževanja dvRNK nastaja kot intermediat v ciklu replikacije ali pa je del virusnega RNK genoma (Jacobs in Langland, 1996). Poleg virusne dvRNK TLR3 receptor aktivira tudi endogena dvRNK, ki se sprošča iz mrtvih celic (Kariko in sod., 2004). Poliriboinozinska: poliribocitidinska kislina oziroma poli(I:C) (ang. »polyribonoinosinic: polyribocytidylic acid«) je stabilen sintetični analog dvRNK, ki se pogosto uporablja kot ligand TLR3, saj posnema virusno okužbo (Vercammen in sod., 2008).

Pred kratkim so določili terciarno strukturo receptorja TLR3 z vezanim ligandom, kar pojasnjuje strukturno osnovo mehanizma aktivacije (Liu in sod., 2008), o čemer smo bolj podrobno pisali pod točko 2.2.1. Pri endosomalnih TLR3 mora dvRNK sprva priti v znotrajcelične razdelke, da se lahko veže na receptor. DvRNK se veže na N- in C- končni mesti lateralne strani konveksne površine ektodomene TLR3, kar sproži nastanek homodimera preko C-končne regije receptorja. To sproži signalizacijo TLR3, ki poteka po signalni poti, odvisni od TICAM-1/TRIF (podrobno opisano pod točko 2.2.3.2 in predstavljeno na sliki 11) in vodi do aktivacije transkripcijskih faktorjev IRF-3, NF-κB in

AP-1. Slednji povzročijo izražanje genov za IFN tipa I (predvsem IFN- β), citokine in kemokine ter zorenje DC (Oshiumi in sod., 2003; Yamamoto in sod., 2003).

mRNK človeškega TLR3 so zaznali v placenti, trebušni slinavki, jetrih, pljučih, srcu in možganih (Rock in sod., 1998), danes pa je znano, da se izraža tudi v številnih drugih tkivih in organih (kostni mozeg, korteks nadledvične žleze, hipofiza, Leydigove celice) (BioGPS ..., 2010). Imunske celice, ki izražajo TLR3 in prispevajo k prirojenemu imunskemu odzivu so mieloidne dendritične celice oziroma mDC (ang. »myeloid dendritic cell«) (Matsumoto in sod., 2003; Muzio in sod., 2000), epitelne celice, pri katerih se TLR3 izraža tudi na površini (Matsumoto in sod., 2003), makrofagi (Heinz in sod., 2003), NK (Wang in sod., 2006) in mastociti (Orinska in sod., 2005). Znano je, da se TLR3 nahaja v specifičnih, neidentificiranih znotrajceličnih veziklih (Funami in sod., 2004), pri epitelnih celicah pa se ga del nahaja v zgodnjih endosomih (Funami in sod., 2007). Pred kratkim so pokazali, da TLR3 lahko neposredno vpliva na CD8+T celice in sicer povzroči sproščanje IFN- γ (Tabiasco in sod., 2006; Wesch in sod., 2006). To pomeni, da ima TLR3 pleiotropen potencial aktivacije prirojenega in pridobljenega imunskega sistema (Vercammen in sod., 2008).

2.2.4.2 Receptor TLR9

Bakterijska genomska DNK je imunostimulant, ki ga prepozna TLR9 (Hemmi in sod., 2000; Krieg, 2002). Stimulatorni učinek je posledica prisotnosti nemetiliranih CpG dinukleotidov, ki so v bakterijskih genomih zelo pogosti. Kasneje so pokazali, da TLR9 veže tudi virusno DNK in lastno endogeno DNK ter tako sodeluje pri protivirusni obrambi in avtoimunosti (Hemmi in sod., 2000). CpG DNK ima močno imunostimulativno aktivnost in povzroča nastanek vnetnih citokinov in Th1 imunski odziv (Akira in sod., 2006). Sintetični ODN s CpG motivi imajo prav tako močan imunostimulatorni učinek, zato imajo velik terapevtski potencial.

Bakterijska DNK mora priti v znotrajcelične razdelke, kjer kisli in reducirajoči pogoji povzročijo razgradnjo dvDNK v več enoverižnih, CpG vsebujočih regij, ki se nato neposredno vežejo na TLR9 (Ahmad-Nejad in sod., 2002; Latz in sod., 2004; Rutz in sod., 2004) in povzročijo agregacijo ektodomen receptorjev TLR9. Za sproženje signalizacije je potrebna proteolitska cepitev receptorja, kar omogoča vezavo adapterja MyD88 (Park in sod., 2008). TLR9 signalizacija poteka po MyD88 odvisni poti (podrobno opisano pod točko 2.2.3.1 in predstavljeno na sliki 11) in vodi do aktivacije transkripcijskih faktorjev NF- κ B in AP-1, ki povzročita izražanje genov za vnetne citokine (TNF- α , IL-6 in IL-12) (Akira in sod., 2006) ter transkripcijskega faktorja IRF-7, ki je odgovoren za proizvodnjo IFN tipa I (Takaoka in sod., 2005).

Človeški TLR9 se večinoma izraža v celicah B in pDC (Krieg, 2006), prisoten pa je v znotrajceličnih razdelkih, kot so ER, endosomi in lizosomi (Latz in sod., 2004).

2.2.5 Signalizacija tekom zorenja fagosomov vpliva na procesiranje in predstavitev antigenov

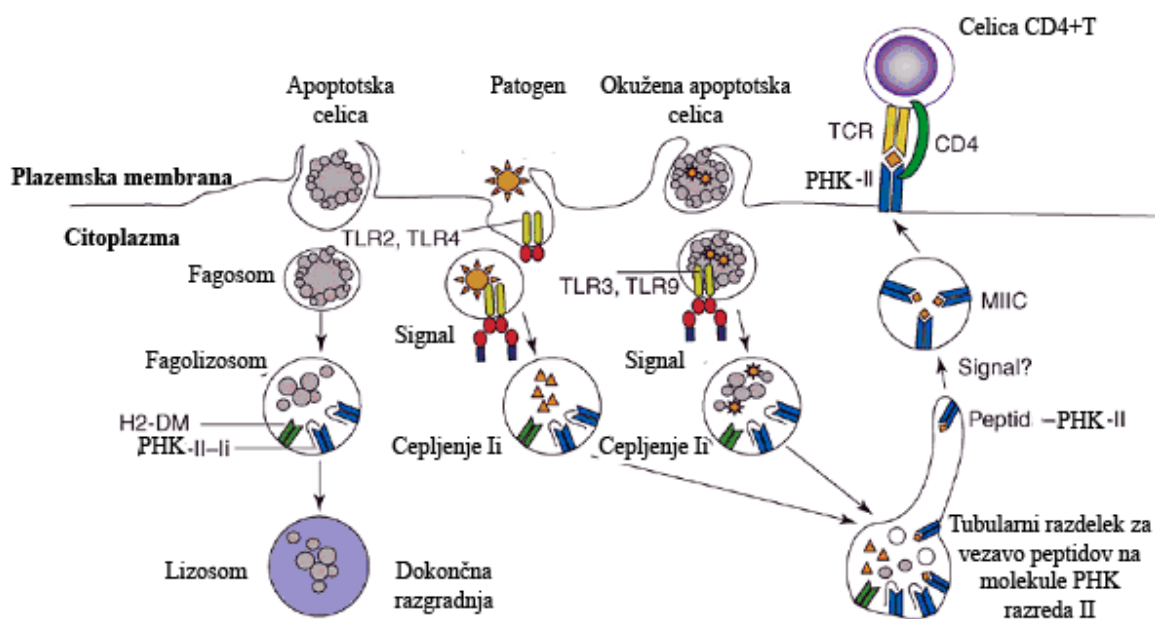
Ključni dejavnik aktivacije imunskega odziva je sposobnost internalizacije antigenov ter predstavitev antigenskih peptidov z molekulami PHK za prepoznavanje z limfociti T, za kar so odgovorne DC. Novejše raziskave so pokazale, da obstaja podcelični nivo regulacije DC, ki deluje na nivoju fagosomov in nadzoruje predstavitev antigenov z molekulami PHK razreda II. Tako v internalizaciji tovara, ki je povezan z normalnimi metabolnimi funkcijami celice kot tudi v internalizaciji patogenih mikrobov, so udeležene enake celične komponente. To pomeni, da lahko preko poti internalizacije v zaščiteno znotrajcelično nišo vdrejo mikrobní patogeni, ki se na ta način izognejo zunajceličnim mehanizmom gostiteljeve obrambe. Zaradi tega je nujen obstoj mehanizma za nadzor poteka endocitoze (Blander, 2007b). Tekom endocitotske poti se na optimalnih mestih izražajo receptorji TLR, ki zaznavajo PAMP (slika 6). Signalizacija, ki jo sprožijo TLR ob prepoznavanju ustreznih ligandov, izvirajočih iz patogena, privede do burnega imunskega odziva (Blander, 2007b).

Od tipa interakcij receptorjev in ligandov v zgodnji fazi fagocitoze je torej odvisno, ali bo prišlo do vnetne ali ne-vnetne fagocitoze (slika 13). Poleg tega je zorenje fagosoma odvisno od signalov, ki jih sprožijo receptorji TLR ob vezavi ustreznih ligandov, kar ima pomembne kinetične in funkcionalne posledice, saj tovrstna signalizacija lahko povzroči hitrejše gibanje fagosomov vzdolž mikrotubulov. Ključnega pomena pa je podcelični nivo regulacije predstavitve antigenov znotraj molekul PHK razreda II. V poznih endocitotskih in lizosomalnih razdelkih sta prisotna dva glavna razreda katepsinov oziroma hidrolitičnih encimov. TLR naj bi nadzirali aktivnost teh encimov neposredno ali posredno preko reguliranja fagosomalnega pH. Prva skupina so encimi, ki neposredno nadzirajo procesiranje invariantne verige oziroma Ii, kot so asparagin-specifične endopeptidaze oziroma AEP in katepsini S, B, D, L in F. Njihova vloga je priprava molekul PHK razreda II za vezavo peptidov. V fagosomih, ki vsebujejo mikrobní delce, pride do signalizacije TLR, ki povzroči aktivnost prve skupine hidrolitičnih encimov. Ti encimi procesirajo Ii, vezano na molekule PHK razreda II, v CLIP, ki ga potem odstrani protein HLA-DM in ga zamenja z antigenskim peptidom, prisotnim v fagosomu. Fagosomi z apoptotskimi celicami, ki ne sprožijo signalizacije TLR, dozoriijo do terminalnih lizosomov, v katerih se proteini popolnoma razgradijo, zato ne pride do PHK II prezentacije (Blander, 2007b; Blander, 2007a). Druga skupina so encimi, ki se aktivirajo tekom zorenja fagosomov in so povezani s procesiranjem proteinskega tovara in njegovo pripravo za vezavo na molekule PHK razreda II. Takšen primer je lizosomalna tiolna reduktaza GILT, ki jo inducira IFN- γ . Menijo, da signalizacija TLR inhibira to skupino encimov, kar prepreči dokončno razgradnjo proteinskega tovara (Blander, 2007b). S pozitivno in negativno regulacijo različnih podskupin hidrolitičnih encimov naj bi signaliziranje TLR vzpostavilo optimalno okolje za procesiranje antigenov, kar bi preprečilo dokončno razgradnjo antigenskih peptidov, obenem pa pripravilo molekule PHK razreda II za vezavo teh peptidov (Blander, 2007b).

Poleg aktivacije hidrolitičnih encimov signalizacija TLR uravnava pH v fagolizosomih. Tekom zorenja fagosomov po fuziji s poznimi endosomi in lizosomi že v osnovi sledi znižanje pH-ja, vendar pa TLR signalizacija lahko padec še pospeši. Znižanje pH je

pomembno za proteolitično aktivnost encimov pa tudi za sam mehanizem predstavitve z molekulami PHK razreda II, na primer, procesiranje Ii verige. Zakisanje fagolizosomov je v osnovi posredovano s sestavljanjem vakuolarne proton-adenozin trifosfataze (V-ATPaza). Aktivnost tega encimskega kompleksa bi bila lahko regulirana s signali membranskih receptorjev, kot so TLR (Blander, 2007b).

Signalizacija TLR torej omogoča avtonomno zorenje fagosoma, zato je od nje odvisna selekcija antigenov. Z molekulami PHK razreda II se predstavijo le antigenski peptidi, ki se nahajajo v fagosomih, kjer je potekla signalizacija TLR. Fiziološki pomen te regulacije je, da se tekom okužbe naivnim celicam CD4+T ustrezno predstavijo le imunogeni antigenski peptidi fagocitiranih mikrobov, ne pa tudi apoptotskih celic. Na ta način se preprečijo avtoimunski odzivi, saj v primeru fagocitiranih apoptotskih celic signalizacija TLR ne poteče, zato ti fagosomi dozoriijo do terminalnih lizosomov, v katerih se proteom povsem razgradi. V terminalnih fagosomih ni prisotnih aktiviranih specifičnih proteaz, ki bi razcepile Ii v CLIP in omogočile vezavo antigenskih peptidov, zato se molekula PHK razreda II v lizosomu razgradi (slika 13).



Slika 13: Signalizacija TLR omogoča diskriminacijo tujih in lastnih antigenov na nivoju vezikularnega transporta (Blander, 2007a: 22)

2.3 TERAPEVTSKI POTENCIAL IMUNOSTIMULATIVNIH NUKLEINSKIH KISLIN

2.3.1 Cepiva

Razvoj cepiv je eno ključnih raziskovalnih področij imunologije. V splošnem gre pri cepivih za suspenzijo mikroorganizmov ali delov mikroorganizmov, ki po injiciranju ali drugih vrstah aplikacij (na primer nazalno ali peroralno) v gostitelju sprožijo imunski odziv. Cepljenje omogoča umetno pridobljeno aktivno imunost. Profilaktično cepivo je namenjeno preprečevanju bolezni, medtem ko je terapevtsko cepivo namenjeno zdravljenju obstoječe bolezni. Primer slednjega so cepiva za zdravljenje raka, kjer obolelega cepimo z antigeni, značilnimi za raka. Namen obeh vrst cepiv je sprožiti učinkovit imunski odziv proti želenim antigenom (Abedon, 2005).

Idealno cepivo bi moralo imeti naslednje lastnosti:

Preglednica 2: Lastnosti idealnega cepiva (Abedon, 2005)

Lastnost	Razlaga
Varnost	Cepivo mora biti povsem varno. Ne sme povzročiti bolezni, pred katero naj bi varovalo, ne sme povzročiti alergijskih odzivov in pretiranega vnetja. To je problem pri oslabljenih mikrobnih cepivih.
Učinkovitost proti širokemu spektru sevov patogena	Problem cepiv je, da so učinkovita le proti določenim sevom patogena, določeni patogeni pa imajo na stotine različnih sevov. Velika težava so hitro spreminjajoči se patogeni, kot je virus HIV, ki so premična tarča.
Učinkovitost pri vseh posameznikih	Cepivo mora pri vseh cepljenih osebah učinkovito preprečiti bolezen, kar je glede na kompleksnost imunskega odziva in variabilnost med posamezniki težka naloga.
Učinkovitost delovanja	Cepivo mora že po enem cepljenju omogočiti dolgotrajno in učinkovito zaščito.
Stabilnost in enostavno shranjevanje	Cepivo mora biti stabilno tudi pri sobni temperaturi, kar je zelo pomembno za dežele tretjega sveta.
Poceni proizvodnja	To bi omogočalo, da bi bilo cepivo dostopno vsem.
Enostavnost cepljenja	Najbolje je, da se cepivo lahko vnese oralno ali preko mukoze.

Obstajata dve glavni skupini cepiv in sicer cepiva, ki vsebujejo celotne mikrobe in cepiva, ki vsebujejo le določene mikrobne komponente.

2.3.1.1 Cepiva, ki vsebujejo celotne mikrobe

Cepiva vsebujejo celotne mikroorganizme, ki so bili spremenjeni na način, da ne morejo povzročiti bolezni. Razviti tovrstna cepiva je veliko enostavnejše kot podenotna cepiva, saj je potrebnega manj znanja o delovanju patogenov. Glavna težava je nevarnost ohranjanja potenciala za povzročitev bolezni.

Ta skupina cepiv se nadalje deli v »celotna ubita« in »celotna oslABLJENA« cepiva. Prva vsebujejo mikroorganizme ki so bili kemijsko ali fizikalno inaktivirani. Glavni problem je varnost uporabe poleg tega pa so manj učinkovita kot živa oslABLJENA cepiva. Pri drugi skupini gre za genetsko oslABLJENE patogene, ki v veliki meri posnemajo naravno okužbo, le da ne povzročijo bolezni. Glavni problem je možnost, da pride do genetskih sprememb, ki lahko ponovno povzročijo razvoj bolezni (Abedon, 2005).

2.3.1.2 Podenotna cepiva, ki vsebujejo le določene mikrobne komponente

Rastoče razumevanje imunskega sistema omogoča zaobiti probleme varnosti. Možen odgovor so podenotna cepiva, pripravljena iz natančno definiranih izoliranih ali sintetičnih komponent mikroorganizmov, kot so proteini ali polisaharidi. Glavna ovira teh cepiv je učinkovitost. Za rešitev problema je potreben nov pogled na dizajn cepiv, predstavljen v naslednjem odstavku.

2.3.2 Moderna cepiva in adjuvansi

Učinkovito cepivo mora sprožiti prirojen imunski odziv, nastanek visokega titra visoko afinitetnih protiteles, močan celični odziv, vključno s Th in CTL celicami in mukozno imunost, kar vodi do dolgotrajne zaščite pred okužbami (Pulendran in Ahmed, 2006).

Za sproženje učinkovitega T in B celičnega odziva ter nadaljnjo vzpostavitev spominskega repertoarja, kar je cilj cepljenja, je potrebnih nekaj ključnih signalov: prepoznavanje antigena, internalizacija in procesiranje antigena ter kostimulacija (podrobno opisano pod točko 2.1.4).

Vloga kostimulacije pri aktivaciji celic T razlaga staro opažanje v imunologiji, da proteinski antigeni ne morejo sprožiti T celičnega odziva, če niso vneseni skupaj s substancami, ki aktivirajo DC, makrofage in ostale APC. Tovrstne substance imenujemo adjuvansi. Izraz izvira iz latinskega glagola »adjuvare«, ki pomeni pomagati, saj te snovi povečajo ali modulirajo imunogenost antigena (Guy, 2007).

Adjuvansi lahko delujejo na vsakega od zgoraj omenjenih signalov. Večina adjuvansov spada v skupino PAMP, ki jih prepoznajo celice prirojenega imunskega sistema s specifičnimi PRR, med katere sodijo tudi TLR.

Vloga receptorjev TLR v aktivaciji imunskega odziva je podrobno opisana pod točkama 2.1.4 in 2.2.2. Poleg tega TLR ne sprožijo zgolj aktivacije APC, temveč vplivajo tudi na procesiranje in predstavljanje antigenov (podrobno opisano pod točko 2.2.5) in sicer je za

optimalno predstavitev antigena potrebna prisotnost tako antigena kot agonista TLR, saj signalizacija TLR nadzira proizvodnjo ligandov (procesirani antigenski peptidi, vezani na molekule PHK razreda II) za prepoznavanje s TCR. To omogoča prednostno predstavljanje mikrobnih patogenih komponent celicam T (Blander, 2007b). Za načrtovanje modernih cepiv je to ključno dejstvo, saj pomeni, da je antigen in TLR agonist potrebno vnesti hkrati, najbolje fizično povezana. Šele to omogoča, da se antigen in agonist TLR nahajata v istem fagosomu, kar je pogoj za optimalno procesiranje in predstavitev antigena ter nadaljnjo stimulacijo T-celičnega odziva.

Identifikacija kemijske narave agonistov TLR je vodila do razvoja sintetičnih ligandov, ki natančneje in na bolj varen način kot ligandi patogenov sprožijo signalizacijo TLR. Za nekatere adjuvanse in imunostimulativne substance se je šele kasneje pokazalo, da so agonisti TLR (Guy, 2007).

Različni PRR agonisti lahko delujejo sinergistično, saj nekateri sprožijo od MyD88 odvisno, drugi od MyD88 neodvisno pot signalizacije. Cepivo, ki bi torej povzročilo aktivacijo komplementarnih poti signaliziranja TLR, bi razširilo sprožen Th celični odziv (Guy, 2007).

Lep primer sinergije je živo oslajeno cepivo zoper rumeno mrzlico 17D (YF-17D), ki je eno najučinkovitejših razvitih cepiv (Querec in sod., 2006). Cepivo aktivira več različnih receptorjev TLR na DC, kar sproži širok spekter prirojenih in pridobljenih imunskih odzivov. Natančneje, preko TLR2, 7, 8, in 9 specifično aktivira več različnih podskupin DC, kar se odraža v sproženju kombiniranega Th1/Th2 pridobljenega imunskega odziva in aktivaciji antigen specifičnih celic CD8+T (Querec in Pulendran, 2007).

Pomembno je, da že sami adjuvansi selektivno usmerijo imunski odziv v Th1 oziroma Th2 smer. Agonisti TLR, ki sprožijo polarizacijo Th1 so LPS (agonist receptorja TLR4), flagelin (agonist receptorja TLR5), dvRNK (agonist receptorja TLR3), evRNK (agonist receptorjev TLR7 in 8), nemetilirana CpG DNK (agonist receptorja TLR9). Polarizacijo Th2 sprožijo triacil lipopeptidi (agonisti receptorja TLR1-2) in diacil lipopeptidi (agonisti receptorja TLR2-6) (Guy, 2007).

Racionalno načrtovanje modernih cepiv je obetajoča pot do optimalne in varne formulacije adjuvansa in antigena, ki bi delovala sinergistično in sprožila želen imunski odziv. Nova cepiva imajo bolj definirano sestavo in vsebujejo adjuvanse, ki posnemajo in kompenzirajo manjkajoče patogene lastnosti, kar je potrebno za sproženje imunskega odziva. To pomeni, da so moderna cepiva bistveno varnejša in obenem učinkovita.

2.3.3 Terapevtski potencial aktivacije TLR3

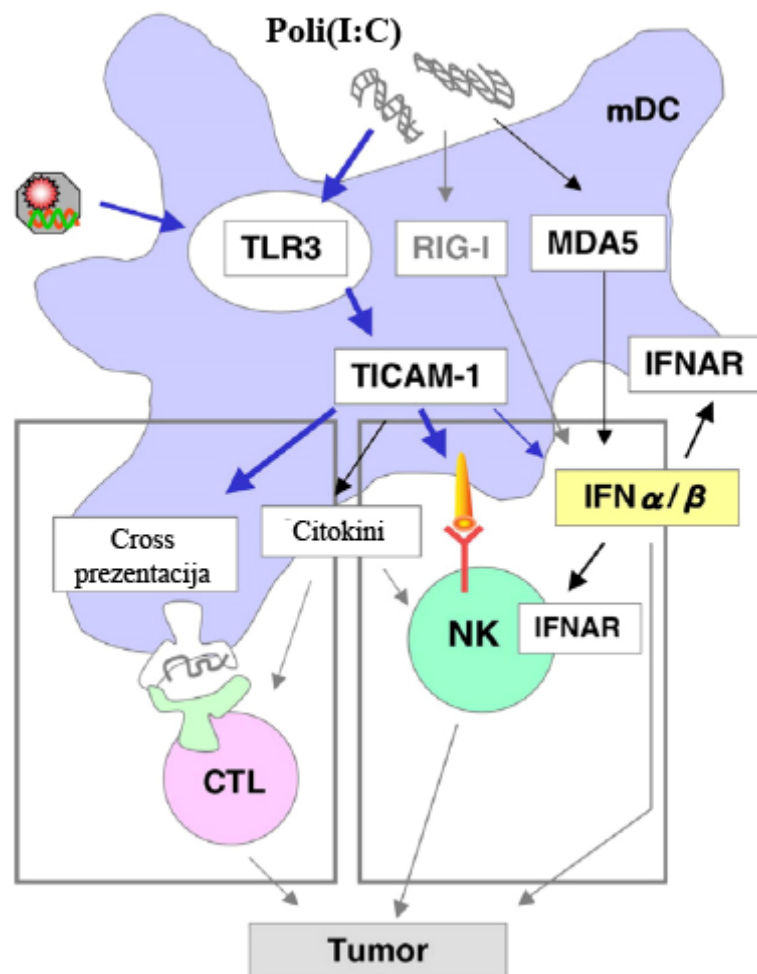
2.3.3.1 Vpliv signalizacije TLR3 na gostiteljev imunski odziv

Virusna okužba povzroči indukcijo genov za IFN in proizvodnjo IFN- α/β ter ostalih IFN, ki posredujejo protivirusni odziv (Muller in sod., 1994). Ker se TLR3 odziva na dvRNK in povzroča prepis genov za IFN- β , prevladuje mnenje, da igra ključno vlogo pri imunskem odzivu na viruse (Matsumoto in Seya, 2008). TLR3 se selektivno izraža v mDC in ne v pDC, zato predvidevajo, da je njegova glavna vloga stimulacija pridobljene imunosti in ne primarna proizvodnja IFN- α/β (Matsumoto in Seya, 2008). mDC veljajo za najučinkovitejše APC, saj imajo več poti za procesiranje antigenov (Heath in sod., 2004), poleg tega vršijo navzkrižno predstavitev antigenov, ki je bistvenega pomena za CTL odziv proti virusom, ki ne okužijo APC (slednji pojav smo podrobneje predstavili pod točko 2.1.4.3). Signalizacija TLR3 in IFN tipa I neposredno stimulirata navzkrižno predstavitev antigenov v DC in tako spodbujata aktivacijo CD8+T (Le Bon in sod., 2003). Tudi na poskusih z mišmi, ki ne izražajo TLR3 so pokazali pomembno vlogo receptorja pri navzkrižni predstavitvi antigenov (Schulz in sod., 2005).

CTL in celice NK so glavne efektorske celice protivirusnega in protitumorskega imunskega odziva (Matsumoto in Seya, 2008). Signalizacija TLR3 in TLR9 preko indukcije IFN tipa I omogoča aktivacijo celic NK. Po stimulaciji TLR3 in sproščanju IL-15 iz DC pride do potovanja celic NK v limfne vozle, sproščanja IFN- γ in citotoksičnih učinkov na tarčne celice (Lucas in sod., 2007). Pokazali so tudi, da je TLR3 adapter TICAM-1 pomemben za regresijo tumorjev, posredovano s celicami NK, induciranimi s poli(I:C) (slika 14) (Akazawa in sod., 2007).

Poleg posredovanja imunskega odziva proti virusom je TLR3 udeležen pri zaščiti imunopriviligiranih mest kot so centralni živčni sistem in jetra. Pokazali so, da TLR3 signalizacija v astrocitih ne sproža vnetnega odziva, temveč deluje nevrozaščitno (Bsibsi in sod., 2006).

Stimulacija TLR3 povzroči tudi ostale celične odzive kot so avtofagija (Jounai in sod., 2007), celične delitve (Maire in sod., 2008) in apoptoza (Ermolaeva in sod., 2008). Stimulacija mDC z dvRNK sproži aktivacijo in delitve različnih efektorskih celic, med njimi CD4+Th1, CD8+CTL, celic NK, regulatornih celic T in celic Th17 (Seya in sod., 2010).



Slika 14: Signalizacija TLR3 v mDC vodi do aktivacije CTL in celic NK (Matsumoto in Seya, 2008: 809)

2.3.3.2 Agonisti TLR3 kot adjuvansi za pripravo cepiv

Glavni prednosti uporabe agonistov TLR3 kot adjuvansov sta selektivno izražanje TLR3 v mDC in preko TLR3-TICAM-1 posredovan imunski odziv, ki sproži nastanek IFN tipa I, citokinov in kemokinov. Poleg tega signalizacija TLR3 povzroči zorenje DC ter aktivacijo celic NK in CTL (Matsumoto in Seya, 2008).

Do sedaj se je ligand TLR3 na mišjem modelu virusne okužbe izkazal kot učinkovit adjuvans (Gowen in sod., 2007; Seya in sod., 2006; Zaks in sod., 2006). Na mišjem modelu so pokazali, da je poli(I:C) učinkovit mukozni adjuvans pri pripravi cepiva zoper virus influence (Ichinohe in sod., 2005). V tej raziskavi so ugotovili, da sočasna dostava antigena in poli(I:C) povzroči povečano izražanje TLR3 in IFN- α/β .

2.3.3.3 Agonisti TLR3 v terapiji raka

Do napredovanja tumorja pogosto pride tekom vnetja, saj je celična rast tesno povezana z vnetno stimulacijo (Kono in Rock, 2008). Pri odzivu na tumor imunske celice potujejo v tumorski matriks in preko medceličnih interakcij sprožijo kompleksen protitumorski imunski odziv. V končni fazi APC zaradi vnetnih dražljajev in s tumorjem povezanih antigenov oziroma TAA (ang. »tumor-associated antigens«) dozori in potuje v limfne vozle, kjer TAA predstavijo limfocitom (Finn, 2008; Gilboa, 2004). Kljub temu je imunska odstranitev tumorja redek pojav, saj v APC ne pride do aktivacije PRR, ker ni ustreznih PAMP in posledično je efektorski imunski mehanizem zoper tumorske celice ohromljen (Melief, 2008).

Agonisti TLR3 predstavljajo velik potencial za premostitev tega problema. Če virusni antigen in dvRNK hkrati prideta v mDC, se zgodi navzkrižna predstavitev antigenov, ki omogoča predstavitev zunajceličnih antigenov v molekulah PHK razreda I za stimulacijo CTL (Akazawa in sod., 2004; Lin in sod., 2008). V mDC po stimulaciji s TLR3 agonisti pride do TICAM-1 signalizacije, ki ojača navzkrižno predstavitev antigenov, kar sproži učinkovit antigensko specifičen CTL odziv. Zato se pričakuje, da bi prišlo do podobno učinkovitega imunskega odziva tudi v primeru, ko bi mDC namesto virusnih antigenov fagocitirale TAA. To pomeni, da bi hkratna dostava TAA in agonista TLR3 lahko omogočila učinkovit CTL odziv in regresijo tumorjev, ki izražajo veliko molekul PHK razreda I (Seya in Matsumoto, 2009). V tumorjih, kjer je izražanje molekul PHK razreda I inhibirano, ključno vlogo igrajo celice NK, pri čemer imajo agonisti TLR3 spet velik terapevtski potencial. Agonisti TLR3 aktivirajo mDC, ki začnejo izražati molekule, potrebne za aktivacijo celic NK. V naslednjih korakih stimulirane mDC z medceličnim stikom aktivirajo celice NK, ki s citotoksičnim delovanjem uničijo rakaste celice, ki ne izražajo molekul PHK razreda I (slika 14) (Seya in Matsumoto, 2009).

Poli(I:C) v tumorskih celicah povzroči avtofagijo in na ta način v inflammasomu ojača aktivacijo kaspaze 1, kar vodi do intenzivne proizvodnje aktivnega IL-1 β , IL-18 in IL-33 (Shi in Kehrl, 2008). Pokazali so, da ob dodatku poli(I:C) k celicam pljučnega raka pride do apoptoze (Salaun in sod., 2006). Predklinične študije potrjujejo pomen agonistov TLR3 za ojačanje terapevtskih cepiv zoper rakasta obolenja. Imunizacija z melanomskim peptidom trp2 ter adjuvansom, sestavljenim iz kationskih liposomov, kompleksiranih s TLR3 in TLR9 agonisti, omogoča nadzor nad rastjo B16 melanomskega tumorja (Zaks in sod., 2006).

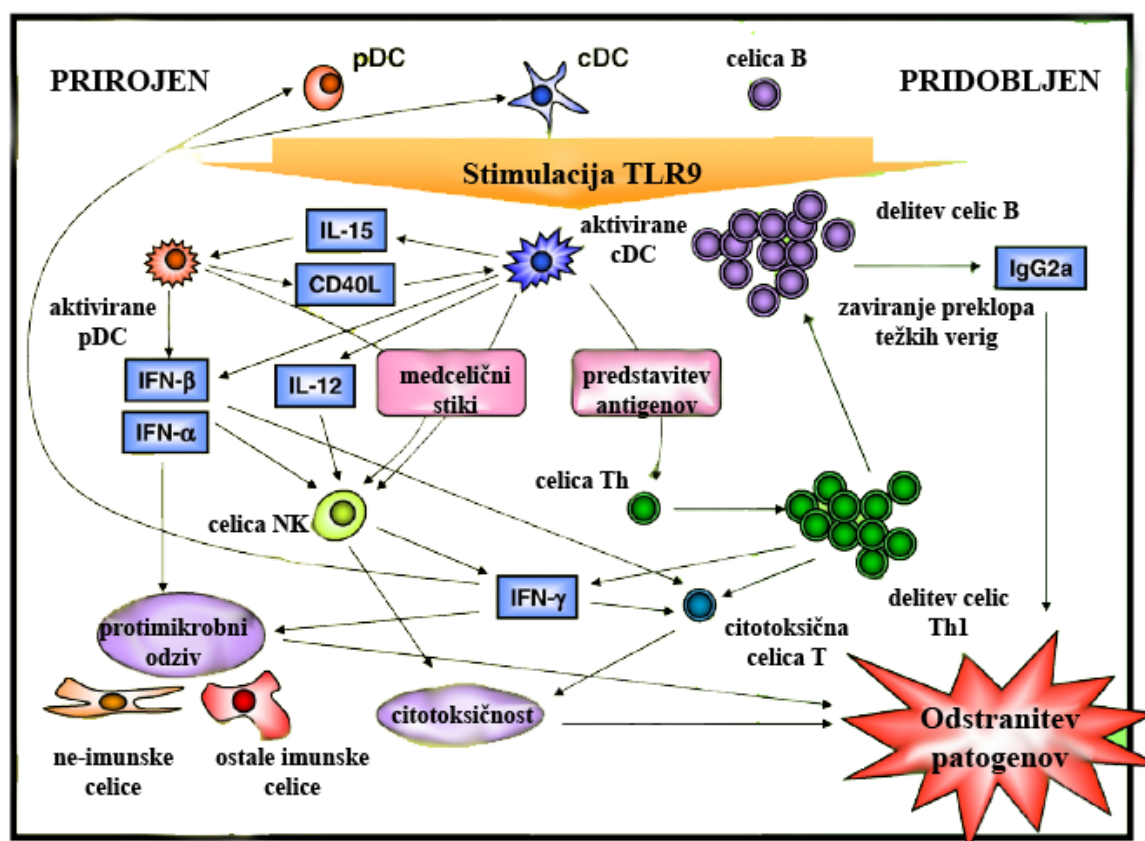
2.3.4 Terapevtski potencial aktivacije TLR9

2.3.4.1 Vpliv signalizacije TLR9 na gostiteljev imunski odziv

Po aktivaciji s CpG ODN tipa B cDC in makrofagi pričnejo zoreti, kar se odraža v proizvodnji vnetnih citokinov kot so TNF- α , IL-6 in IL-12 ter povečani ekspresiji molekul PHK razreda II in kostimulativnih molekul (CD-40, B7) (Hemmi in sod., 2003). Nasprotno se pDC na stimulacijo s CpG ODN odzovejo s proizvodnjo IFN tipa I (Liu, 2005), ki deluje neposredno na celice CD8+T (Kolumam in sod., 2005) ter celice CD4+T (Havenar-Daughton in sod., 2006). Poleg tega IFN- α povzroči migracijo preko TLR9 aktiviranih pDC v marginalno cono zunanjega T-celičnega območja limfnega vozla, kjer lahko optimalno stimulirajo pridobljen imunski sistem (Asselin-Paturel in sod., 2005). Celice B in pDC po stimulaciji z agonisti TLR9 povečajo izražanje kostimulativnih molekul, postanejo odporne na apoptozo, zvišajo nivo izražanja kemokinskega receptorja CCR7 ter pričnejo proizvajati citokine in kemokine, ki vodijo v smer Th1 imunskega odziva (Krieg, 2006). Sočasna aktivacija naivnih celic B z antigenom in TLR9 ligandom vodi do diferenciacije v celice plazmatke, ki proizvajajo protitelesa (Jung in sod., 2002). Za aktivacijo spominskih celic B je dovolj že sama stimulacija s TLR9 agonistom (Bernasconi in sod., 2002). CpG ODN je torej zelo močan adjuvans, ki usmerja imunski odziv v smer Th1 (Klinman in sod., 2010). Po stimulaciji TLR9, ki ji sledi interakcija cDC in pDC pride do sproščanja IL-12 (Kuwaitima in sod., 2006). Kot odziv na aktivacijo TLR9, cDC pričnejo izražati CD-40 in proizvajati IL-15, ki povzroči povečano izražanje CD-40 liganda na pDC. Nato pride do interakcije med CD-40 na cDC in CD-40 ligandom na pDC, kar vodi do proizvodnje IL-12 (Kuwaitima in sod., 2006). Pokazali so, da DC, aktivirane preko TLR9 delujejo na celice NK in tako povzročijo citotoksične celične odzive in proizvodnjo IFN- γ . Slednji citokin povzroči povratno aktivacijo DC in ostalih imunskih celic, kar pomeni, da TLR9 igra osrednjo vlogo v komunikaciji med DC in NK ter tako omogoča aktivacijo učinkovitega imunskega odziva (Kumagai in sod., 2008).

Celice B prav tako izražajo TLR9. Stimulacija s CpG ODN tipa B ali K neposredno povzroči delitev celic B (Krieg in sod., 1995). Prav tako signalizacija TLR9 povzroči proizvodnjo protiteles (Krieg in sod., 1995) in zavre preklap težkih verig z IgM in IgG2a na IgE in IgG1, ki sta tipa protiteles, udeležena v alergijskih reakcijah (Lin in sod., 2004; Liu in sod., 2003). To pomeni, da TLR9 igra ključno vlogo tudi pri aktivaciji celic B v kontekstu boja proti znotrajceličnim patogenom, saj usmerja imunski odziv v smer Th1 (Kumagai in sod., 2008).

Vpliv stimulacije receptorja TLR9 na imunski odziv je shematsko prikazan na sliki 15.

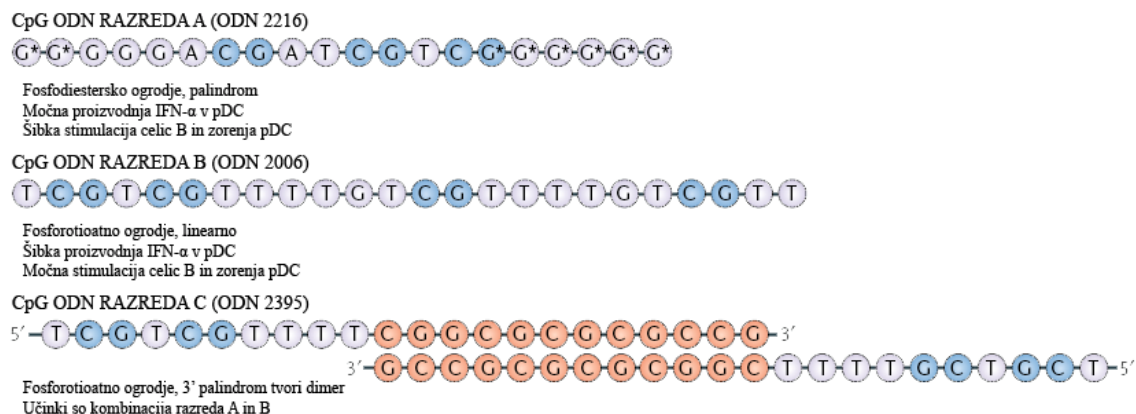


Slika 15: Vpliv signalizacije TLR9 na gostiteljev imunski odziv (Kumagai in sod., 2008: 4)

2.3.4.2 Odnos med strukturo in aktivnostjo CpG ODN

Optimalni CpG motiv za stimulacijo TLR9 se med vrstami razlikuje in je GACGTT za miš (Krieg in sod., 1995) in GTCGTT za človeka (Hartmann in Krieg, 2000). Poleg heksamernega CpG motiva imunostimulativno aktivnost ODN določa število CpG motivov (optimalno dva do štiri), razmak med CpG motivi (najmanj dve vmesni bazi, prednostno timina) in narava CpG ODN ogrodja (fosforotioatno ogrodje je stabilnejše od fosfodiesterškega, saj je odporno na razgradnjo z nukleazami) (Krieg, 2006). Poleg tega je pomembno, da je 5' konec CpG ODN prost in nemodificiran, sicer je imunostimulativni učinek bistveno slabši. To pomeni, da je konjugate s proteini ali peptidi za terapevtske namene potrebno pripravljati s povezavo preko 3' konca ODN, saj je prost 5' konec očitno pomemben za interakcijo z receptorjem (Putta in sod., 2010).

Poznani so trije tipi CpG ODN, ki se razlikujejo tako v strukturi kot v načinu delovanja in vplivu na imunski odziv (slika 16). CpG ODN razreda A (poznani tudi kot tip D) v pDC sproži sproščanje IFN- α , vendar šibko aktivira celice B. Struktura CpG ODN razreda A na 5' ali 3' koncu vsebuje poli-G motiv, kar omogoča, da se monomeri sestavijo v nanodelce. CpG ODN razreda B (poznani tudi kot tip K) ne tvori višje urejenih struktur in močno aktivira celice B, vendar pa ne sproži intenzivnega sproščanja IFN- α . CpG ODN razreda C ima vmesne imunske lastnosti in močno aktivira celice B, poleg tega sproži sproščanje IFN- α . Biološko funkcijo CpG ODN tipa C pripisujejo posebni palindromni strukturi na 3' koncu, ki naj bi v endosomu omogočala tvorjenje dimera (Krieg, 2006).



Slika 16: Različni razredi CpG ODN (Krieg, 2006: 475)

2.3.4.3 Agonisti TLR9 v terapiji kužnih bolezni

Fiziološka vloga TLR9 je stimulacija imunskega odziva zoper znotrajcelične patogene, zato je bilo pričakovano, da profilaktična ali terapevtska uporaba sintetičnih agonistov TLR9 omogoča zaščito pred znotrajceličnimi okužbami (Krieg, 2006). Študije na miših so pokazale, da aktivacija prirojenega imunskega odziva s CpG ODN lahko nudi zaščito pred širokim spektrom virusnih in bakterijskih okužb, vključno z najnevarnejšimi, kot so *Bacillus anthracis*, vaccinia virus in virus Ebole (Klinman, 2004).

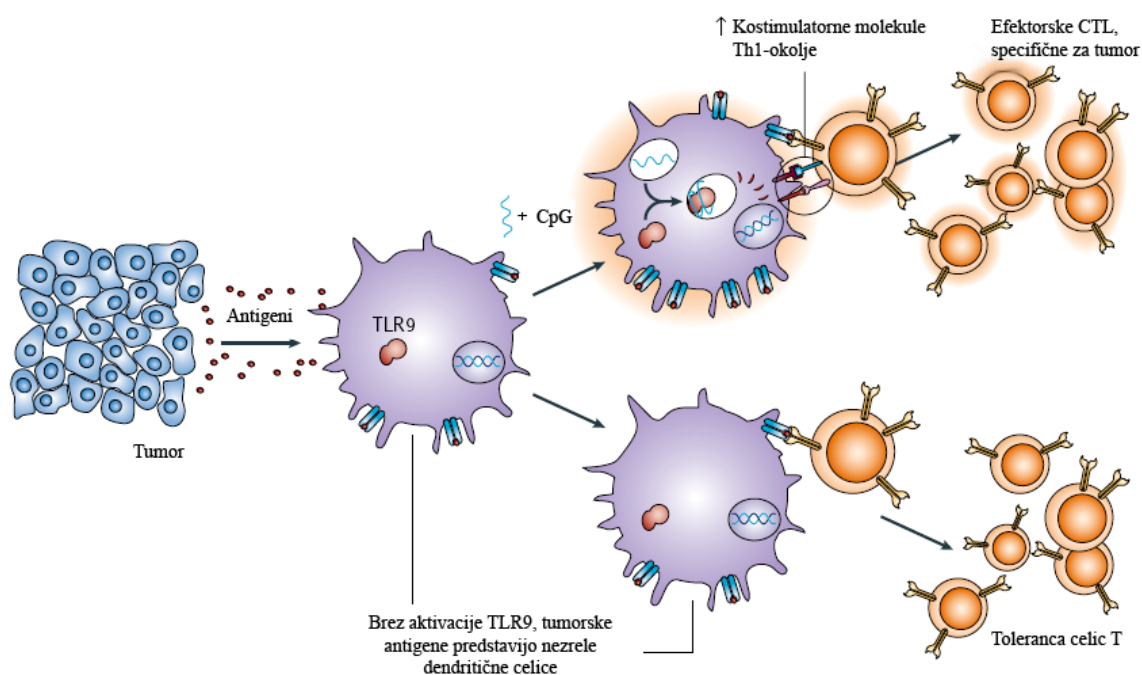
2.3.4.4 Agonisti TLR9 kot adjuvansi za pripravo cepiv

Aktivacija TLR9 pri številnih živalskih modelih ojača profilaktični ali zaščitni antigeno specifični humoralni in celični odziv na široko paleto različnih antigenov (peptidni in proteinski antigeni, živi oslavljeni ali mrtvi virusi, cepiva na osnovi DC, avtologna celična cepiva in polisaharidni konjugati) (Krieg, 2006). Mehanizem, ki je odgovoren za močno imunostimulativno aktivnost CpG ODN vključuje sinergijo med BCR in TLR9, ki prednostno stimulira antigeno specifične celice B (Krieg in sod., 1995), inhibicijo apoptoze (Yi in sod., 1998), ojačan HCCS (Liu in sod., 2003) in stimulacijo zorenja in diferenciacije DC, ki se odraža v ojačani aktivaciji celic Th1 in CTL celo ob odsotnosti pomoči celic CD4+T (Sparwasser in sod., 2000). Neposredna konjugacija CpG ODN in antigena ojača vnos antigena in imunski odziv (Tighe in sod., 2000a). CpG ODN kažejo še večjo imunostimulativno aktivnost, če so pripravljene v obliki mikrodlecev, nanodelcev, lipidnih emulzij ali podobnih formulacij, kar je še posebej pomembno v primeru, ko je antigen neimunogen (Krieg in Davis, 2001). CpG ODN se je izkazal tudi kot uspešen adjuvans za pripravo mukoznih cepiv (Moldoveanu in sod., 1998). Pri človeku so CpG ODN uporabili kot adjuvansi pri pripravi cepiva zoper hepatitis B in pokazali, da ima zelo močno imunostimulativno aktivnost, tako v kombinaciji z alumom kot tudi sam. Protitelesa, specifična za površinski antigen hepatitisa B so nastala hitreje in v višjih titrih v primerjavi s kontrolo (Cooper in sod., 2004; Halperin in sod., 2003). Uporaba CpG ODN kot adjuvansa pri miših omogoča znižanje količine antigena za dva velikostna razreda s primerljivim protitelesnim odzivom običajnega cepiva brez CpG ODN (Weeratna in sod., 2003).

2.3.4.5 Agonisti TLR9 v terapiji raka

Ključne težave pri boju zoper rakasta obolenja smo že izpostavili pod točko 2.3.3.3. V številnih mišjih modelih so pokazali, da CpG ODN učinkuje protitumorsko (Krieg, 2004). V relativno majhnih tumorjih je monoterapija s CpG ODN lahko dovolj za sproženje učinkovitega T-celičnega odziva in imunski nadzor nad tumorjem. Za učinkovitost proti večjim tumorjem je CpG ODN potrebno kombinirati z ostalimi konvencionalnimi terapijami kot so protitelesna terapija, radioterapija, kemoterapija ali operativni posegi (Krieg, 2006). Spodbudni rezultati na mišjih modelih so v letu 2005 privedli do kliničnih študij uporabe CpG ODN za terapijo raka, kjer so pokazali boljši imunski odziv in večjo verjetnost preživetja (Manegold in sod., 2008).

Vloga aktivacije receptorja TLR9 v terapiji raka je shematsko prikazana in opisana na sliki 17.



Slika 17: Učinek aktivacije TLR9 na protitumorski imunski odziv (Krieg, 2006: 479)

Običajno maligni tumorji zavrejo imunske odzive in ustvarijo okolje, ki ohranja toleranco celic T, kar onemogoča razvoj protitumorske imunosti. Aktivacija DC preko TLR9 ustvari Th1 citokinsko/kemokinsko okolje in poveča nivo izražanja kostimulativnih molekul na pDC, kar preusmeri toleranco celic T v močan citotoksičen odziv limfocitov T proti tumorskim antigenom (Krieg, 2006).

2.4 TRANSFERIN IN TRANSFERINSKI RECEPTOR

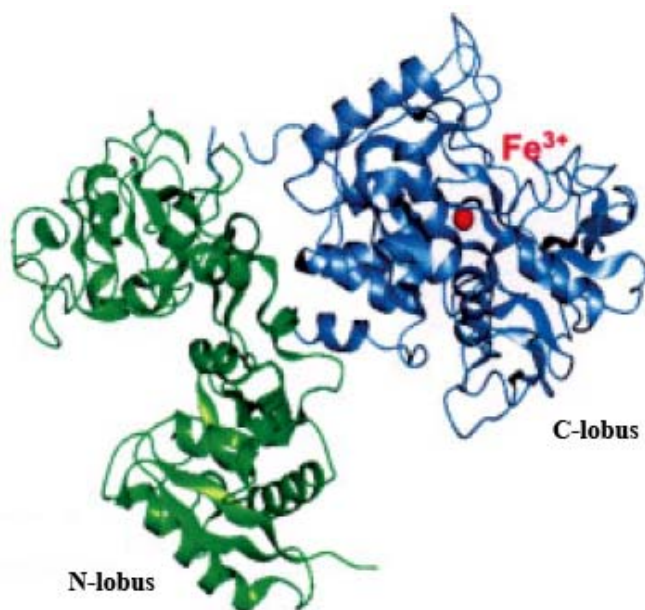
Glavni elementi pri razvoju novih zdravilnih učinkovin so kakovost, varnost in učinkovitost. Zdravilo mora imeti ustrezno farmakodinamiko in farmakokinetiko ne sme pa imeti škodljivih stranskih učinkov. Glavni problemi pri sistemski uporabi zdravilnih učinkovin so pomanjkanje specifičnosti učinkovine za tarčno mesto, nespecifična toksičnost in škodljivi stranski učinki zaradi visokih odmerkov. Privlačna strategija zvišanja terapevtskega indeksa učinkovine je mestno specifična dostava do definiranih tarčnih celic. Naravno prisotni proteini so na področju tarčne dostave učinkovin deležni velike pozornosti, saj so biorazgradljivi, netoksični in neimunogeni. Učinkovit celični vnos preko transferinske poti ima velik potencial za vnos zdravilnih učinkovin v celice. Poleg tega Tf omogoča tarčno-specifično dostavo protirakastih učinkovin, proteinov in terapevtskih genov v rakaste celice, ki izražajo več transferinskih receptorjev oziroma TfR (ang. »transferrin receptor«) (Qian in sod., 2002).

2.4.1 Transferin

Transferini so družina monomernih glikoproteinov, ki vežejo železo. Poznani so trije glavni tipi Tf, in sicer serumski Tf, ovotransferin in laktotransferin. Najbolje preučen predstavnik te družine je serumski Tf, ki ga najdemo v krvi in ostalih tekočinah sesalcev. V človeškem serumu je koncentracija Tf približno 2,5 mg/ml, 30% pa ga je zasičenega z železom (Leibman in Aisen, 1979).

2.4.1.1 Struktura

Tf so glikoproteini z eno polipeptidno verigo, dolgo 670-700 AK in molekulsko maso približno 80 kDa. Določenih je bilo veliko kristalnih struktur Tf, med katerimi je tudi človeški serumski Tf (slika 18). Polipeptidna veriga je zvita v dva strukturno podobna a funkcijsko različna lobusa, imenovana N-lobus in C-lobus, ki sta povezana s kratkim peptidom. Vsak lobus se lahko nadalje deli v dve domeni, ki obdajata globoko hidrofilno režo, kjer se nahaja vezavno mesto za železo (Li in Qian, 2002). Tf se tekom vezave in sprostitve Fe^{3+} konformacijsko spremeni, kar naj bi imelo ključen pomen za selektivno prepoznavanje s TfR (Qian in sod., 2002). Mehanizem odpiranja in zapiranja lobusov naj bi vključeval na pH občutljivo interakcijo med domenami. Vnos Tf z vezanim Fe^{3+} (holo-Tf) v kislo endosomalno okolje naj bi se odražal v protonaciji lizinskih ostankov Lys209 in Lys301, ki ležita na nasprotnih domenah, kar naj bi predstavljalo osnovo silo za odprtje domen in izpostavitve ter nadaljnjo sprostitve Fe^{3+} (Dewan in sod., 1993).



Slika 18: Kristalna struktura človeškega serumskega transferina (Li in Qian, 2002: 228)

C-lobus, ki vsebuje vezan Fe^{3+} je prikazan v zaprti konformaciji (modro), N-lobus, brez vezanega Fe^{3+} , pa je v odprti konformaciji (zeleno).

2.4.1.2 Funkcija

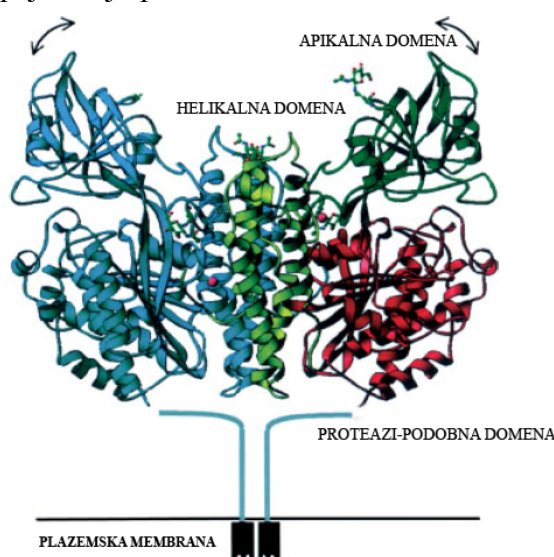
Osnovna vloga Tf je nadziranje nivoja prostega železa v telesnih tekočinah, saj veže, zbira in transportira Fe^{3+} ione. To omogoča vzdrževanje dostopnosti železa in preprečuje odlaganje netopnih agregatov železovega hidroksida. Serumski Tf transportira železo od mesta vnosa v sistemski obtok do celic in tkiv, kjer se porablja. Prav tako uravnava metabolizem železa in ščiti organizem pred toksičnimi stranskimi učinki prostega železa, ki bi s katalizo tvorbe prostih radikalov lahko poškodovalo celice (Li in Qian, 2002).

2.4.2 Transferinski receptor

Transferinski receptor 1 (TfR1) v ciklu endocitoze in eksocitoze Tf sodeluje pri vnosu železa v celice vretenčarjev (Richardson in Ponka, 1997). Izraža se na vseh celicah z jedrom, vendar pa se nivo izražanja razlikuje med celičnimi tipi. Na hitro delujočih celicah je prisotnih 10000-100000 molekul na celico, medtem ko je na ne delujočih celicah njegov nivo izražanja neznaten (Inoue in sod., 1993). V malignih celicah je nivo ekspresije zelo povišan, saj celice za hitro rast potrebujejo veliko železa (Huebers in Finch, 1987), kar ima velik potencial za tarčno dostavo učinkovin v tumorske celice preko receptorsko-posredovane endocitoze. TfR1 se izraža tudi na endoteliju možganskih kapilar, ki gradijo krvno-možgansko pregrado (Jefferies in sod., 1984). TfR1 ima večjo afiniteto do diferičnega Tf kot do apotransferina, poleg tega imajo različni TfR lahko zelo različne afinitete do Tf (Sun in sod., 1999).

2.4.2.1 Struktura

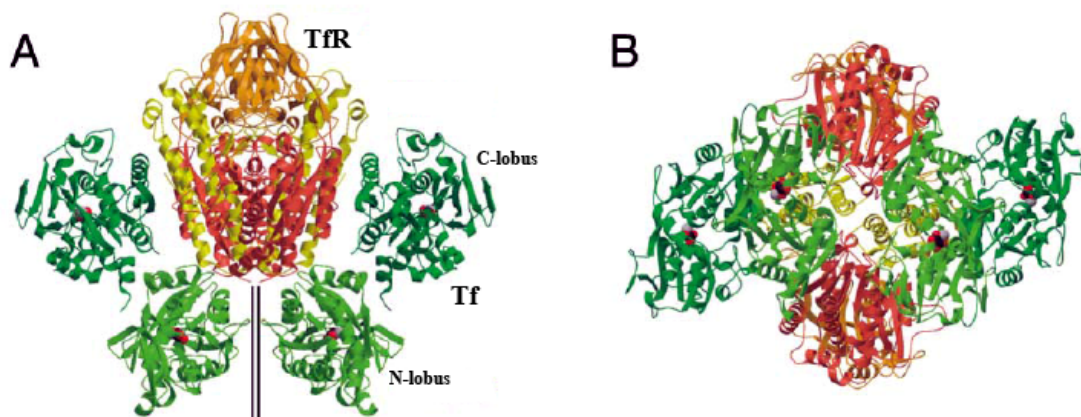
Kristalna struktura ektodomene TfR je določena (slika 19) (Lawrence in sod., 1999). TfR1 je transmembranski homodimer, ki ga sestavljata dva identična monomera z molsko maso približno 90 kDa. Protein ima kratko N-končno citoplazemsko regijo, enojno transmembransko domeno in veliko zunajcelično ektodomeno, ki vsebuje mesto za vezavo Tf. Homodimer TfR1 je organiziran v metulju-podobno obliko. Vsak monomer je sestavljen iz treh različnih globularnih domen, imenovanih proteazi-podobna, apikalna in helikalna domena, ki skupaj tvorijo površino za vezavo Tf.



Slika 19: Kristalna struktura dimerne ektodomene človeškega transferinskega receptorja 1 (Li in Qian, 2002: 228)

2.4.2.2 Vezava transferina na transferinski receptor

Homodimer TfR1 lahko veže dve molekuli Tf. S krioelektronsko mikroskopijo in kristalnimi strukturami Tf in TfR1 so določili atomski model kompleksa Tf, vezanega na TfR1 (Cheng in sod., 2004) (slika 20). Pokazali so, da je N-lobus stisnjen med membrano in ektodomeno TfR1, C-lobul pa se naslanja na helikalno domeno TfR1.

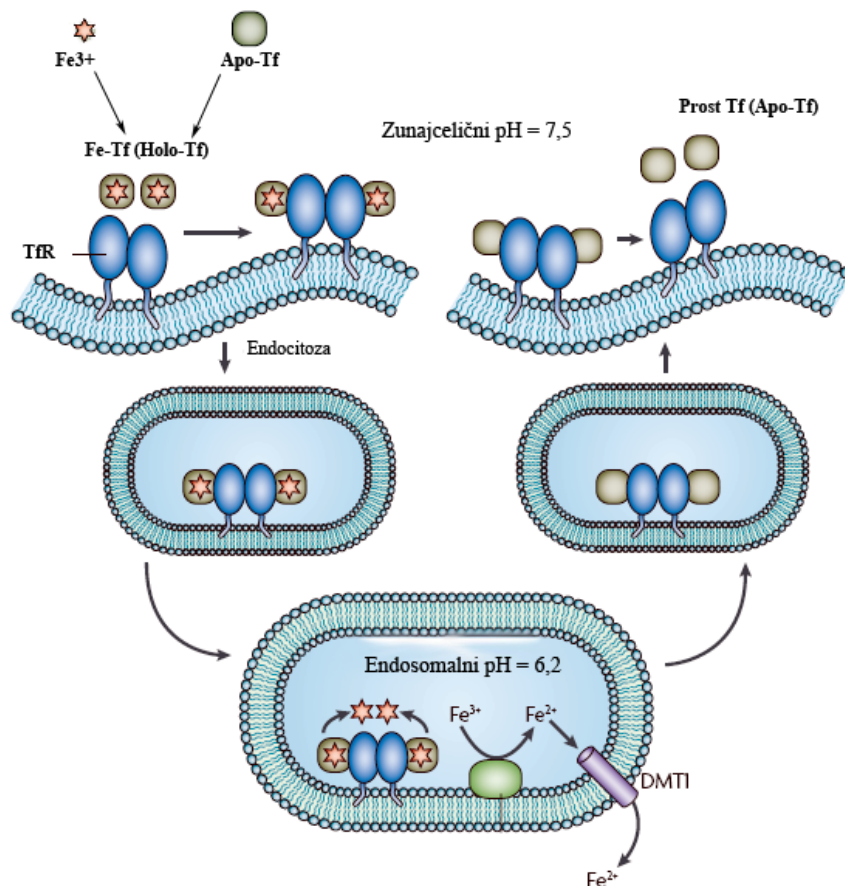


Slika 20: Atomski model kompleksa transferina in transferinskega receptorja 1 (Cheng in sod., 2004: 571)
Slika A prikazuje pogled od strani, slika B pa pogled od spodaj.

2.4.3 Vnos železa preko transferina in transferinskega receptorja

Železo je nujno za vse žive organizme, njegova koncentracija v telesu pa mora biti natančno uravnavana. Fe^{3+} iz hrane citokrom *b* v dvanajstniku reducira v Fe^{2+} (McKie in sod., 2001), ki se zatem s transportnim proteinom za železo DMT1 absorbira v enterocite (Gunshin in sod., 1997). Nato železo potuje skozi enterocite in se iz bazolateralne površine s transporterjem feroportinom 1 eksportira v kri (Donovan in sod., 2000). Tekom eksporta ga hepaestin reoksidira v Fe^{3+} (Vulpe in sod., 1999), ki ga nato veže serumski Tf (Aisen, 1998).

Celice privzemajo železo z več različnimi mehanizmi, med katerimi igra ključno vlogo receptorsko-posredovan vnos na Tf vezanega železa (slika 21). Proces se prične z vezavo $\text{Fe}_2\text{-Tf}$ na specifični TfR1. Nato pride do klatrinsko posredovane endocitoze in kompleks $\text{Fe}_2\text{-Tf-TfR1}$ se usmeri v endosom. Tekom zorenja endosoma ATPaza črpa protone in na ta način pride do zakisanja pH na približno 6,2, kar oslabi afiniteto vezave Fe^{3+} na Tf in vodi do sprostitve železa. Prost Fe^{3+} se reducira v Fe^{2+} in se preko divalentnega kovinskega transporterja DMT1 prenese iz endosoma v citosol, kjer se kot kofaktor porabi v različnih celičnih procesih ali pa se shrani kot feritin. Po sprostitvi železa iz kompleksa v endosomu ostane kompleks apo-Tf-TfR1, ki se z eksocitozo vrne na celično površino, kjer se pri pH vrednosti približno 7,5 afiniteta apo-Tf za TfR1 zmanjša, zato disociira z receptorja in se vrne v obtok za ponovno uporabo (Qian in sod., 2002).



Slika 21: Cikel celičnega vnosa železa preko transferina in transferinskega receptorja 1 pri ljudeh (Drakesmith in Prentice, 2008: 543)

2.4.4 Transferinski konjugati za tarčno specifično dostavo

V dobi modernih zdravil je zelo pomembna tarčna dostava učinkovin. Velik potencial na tem področju ima receptorsko-posredovan vnos. Tf je v obliki različnih konjugatov in hibridnih sistemov z makromolekulami ali liposomi zelo uporaben kot nosilec oziroma tarčni ligand za dostavo protirakastih učinkovin, liposomov, ki vsebujejo zdravilne učinkovine, proteinov in genov v rakaste celice, ki prekomerno izražajo TfR (Li in Qian, 2002).

2.4.4.1 Tarčno specifična dostava zdravilnih učinkovin

S Tf so povezali veliko terapevtskih učinkovin. Konjugate so pripravili bodisi s kemijsko povezavo ali s proteinskim inženiringom. Povezali so ga z doksorubicinom in tako na različnih celičnih linijah kot tudi *in vivo* pokazali, da je v konjugatu veliko učinkovitejše citotoksično sredstvo za zdravljenje raka (Singh in sod., 1998; Sizensky in sod., 1992). Tf so povezali tudi z mutiranim toksinom difterije (CRM107) in pokazali, da ima od odmerka odvisno protitumorsko učinkovitost zoper človeške gliome v miškah (Laske in sod., 1994). Tf so kemijsko povezali tudi z liposomi in vanje ujeli IFN- α ter na ta način pokazali povečan vnos in tarčno učinkovanje na tumorske celice, ki so se začele deliti počasneje (Liao in sod., 1998).

2.4.4.2 Tarčno specifična dostava genov s konjugati Tf-PLL/DNK

Učinkovitost genske terapije je odvisna od sistema za dostavo, ki mora omogočati selektiven vnos genov v zadostno število tarčnih celic, kar se odraža v dovolj visokem nivoju ekspresije in posledičnem vplivu na bolezen. Virusni vektorji so učinkoviti, vendar zaradi imunogenosti in možnosti rekombinacij potencialno nevarni. Obetajoča alternativa so nevirusni vektorji, ki vključujejo molekulske konjugate in kationske lipide, ki pa ne omogočajo učinkovite transfekcije. Receptorsko-posredovan vnos genov preko Tf/TfR omogoča tarčen vnos in večjo učinkovitost transfekcije (Qian in sod., 2002).

DNK je velika polianionska molekula, ki se sama po sebi neučinkovito vnese v evkariontske celice. Zato jo je potrebno kondenzirati in nevtralizirati negativen naboj. Za ta namen se uporablja veliko različnih polikationskih molekul, med katerimi je pogost PLL, saj je dostopen v različnih molekulskih masah in je biorazgradljiv (Duncan, 1992). PLL je sintetični polimer AK ostankov lizina, pri katerih je ϵ -amino skupina pri fiziološkem pH pozitivno nabita in zato dobra tarča za kovalentno pripenjanje Tf. Opisanih je veliko metod priprave tovrstnih konjugatov (Brinkley, 1992).

Tf-PLL konjugati so se na številnih celičnih linijah izkazali kot učinkoviti nosilci za vnos DNK. Na celični liniji K-562 so pokazali, da skoraj 100% celične populacije izraža reporterski gen (Cotten in sod., 1993). Takšen sistem so uporabili tudi za selektiven vnos nasprotnosmiselnega ODN *myb* za zdravljenje raka. Pokazali so, da pri celicah HL-60 po transfekciji s kompleksom Tf-PLL/ODN pride do inhibicije podvojevanja in izgube viabilnosti (Citro in sod., 1992).

Vnos genov preko Tf so poimenovali »*transferinfekcija*« (Wagner in sod., 1990). Ugotovili so, da je učinkovitost vnosa odvisna od sestave kompleksov in sicer je najbolje, da se DNK v konjugatu kondenzira v toroide s premerom 80-100 nm. Poleg tega je za optimalno transfekcijo pomembno, da je v enem konjugatu 10-20 molekul Tf, medtem ko premalo PLL ali preveč Tf onemogoča popolno kondenzacijo (Wagner in sod., 1991).

Vnos DNK s pomočjo Tf-PLL je v določenih pogledih lahko problematičen. Na polielektrolite se lahko vežejo serumski proteini, kar bi lahko omejevalo potovanje po krvnem obtoku in zmanjševalo učinkovitost transfekcije. DNK, ki s konjugati prispe v endosome, se lahko kasneje v lizosomih razgradi, kar bi onemogočalo učinkovito sprostitve iz znotrajceličnih razdelkov. Omenjene težave je možno rešiti z obdelavo konjugatov s polimeri, kot je, na primer, polietilenglikol (PEG), kar zmanjša površinske naboje. To se odraža v bistveno manjših interakcijah konjugatov s serumskimi proteini in posledično zvišanem celičnem vnosu in transfekcijski učinkovitosti (Ogris in sod., 1999). Težavo z razgradnjo DNK v lizosomih so rešili z uporabo sredstev, ki zavirajo zorenje lizosomov, kot je, na primer, klorokvin (Zenke in sod., 1990).

Poleg Tf-PLL/DNK kompleksov so Tf povezali tudi z lipopleksi, sestavljenimi iz pozitivno nabitih lipidnih dvoslojev, v katere so ujeli DNK in na ta način pripravili liposome, primerne za tarčno specifično transfekcijo (Cheng, 1996).

2.5 KONJUGATI IMUNOSTIMULATORNIH NUKLEINSKIH KISLIN

INK kot so CpG ODN in poli(I:C) imajo velik terapevtski potencial (podrobneje opisano pod točko 2.3), vendar obstajajo težave, ki omejujejo njihovo učinkovitost. Mednje sodita hitra razgradnja in neučinkovit vnos v znotrajcelične razdelke APC (Sands in sod., 1994). Zato je pomembno razviti način dostave, ki bi omogočal zaščito pred encimatsko razgradnjo in izboljšal tarčno dostavo v endolizosome (Krishnamachari in Salem, 2009). Poleg tega je za učinkovit imunski odziv potrebno poskrbeti za sočasno dostavo antigena in INK v isto APC (podrobneje opisano pod točko 2.2.5).

Obstaja več različnih sistemov za vnos INK, ki skušajo rešiti omenjene težave.

2.5.1 Konjugati nukleinskih kislin in proteinov

S fizično povezavo antigena in INK je omogočen sočasen vnos v APC (Blander, 2007b). Ena od možnosti je povezava CpG in antigena preko interakcij med biotinom in avidinom. Na ta način so dosegli desetkratni imunski odziv v primerjavi s samim antigenom (Klinman in sod., 2004). Pokazali so tudi, da konjugacija CpG z antigenom poveča navzkrižno predstavitev antigenov (Heit in sod., 2004; Maurer in sod., 2002). CpG so z modelnim antigenom ovalbuminom povezali tudi kemijsko in sicer z uporabo reagenta sulfo-MBS, ki omogoča nastanek kovalentne vezi. Uporabili so CpG ODN s fosforotioneatnim ogrođjem, ki je veliko bolj odporno na razgradnjo z nukleazami, kar poveča razpolovni čas v *in vivo* pogojih. Nastali konjugat je ohranil odlične imunostimulatorne lastnosti. V DC je konjugat povzročil 16-krat višjo proizvodnjo IFN- γ kot v primeru, ko so antigen in CpG dodali ločeno (Zhang in sod., 2007). V drugi študiji je kemijski konjugat CpG ODN in alergena Amb a1 za zdravljenje alergičnega rinitisa in astme pokazal najvišji titer protiteles IgG2a, najmočnejši Th1 odziv in 10-kratno proizvodnjo IFN- γ v primerjavi z ločenim dodajanjem (Tighe in sod., 2000b). Konjugati INK in antigenov imajo torej velik potencial sproženja imunskega odziva na šibke antigene ali na nizke doze antigena.

2.5.2 Konjugati nukleinskih kislin in polikationov

Kationski biorazgradljivi mikodelci imajo sposobnost vezave nukleinskih kislin. Adsorbcija je posledica elektrostatskih interakcij negativno nabitega ogrođja nukleinskih kislin in pozitivnega naboja mikodelca. Primer je polimer PLGA (ang. »polylactic-co-glycolic acid«), ki so ga uporabili kot nosilec za CpG ODN pri pripravi cepiva zoper antraks, formuliranega z alumom. Cepivu so dodali CpG ODN, adsorbiran na PLGA, kar je povzročilo 50-krat višji titer specifičnih protiteles IgG2a in višjo toksin-nevtralizirajočo aktivnost v primerjavi z dodatkom prostega CpG ODN. Rezultate so potrdili tudi s testi *in vivo*, kjer je bilo preživetje miši, imuniziranih s cepivom in CpG ODN, adsorbiranim na PLGA kar 80-odstotno. Nasprotno je bila umrljivost miši ob imunizaciji s cepivom in prostim CpG ODN 90-odstotna (Xie in sod., 2005).

Obstaja tudi veliko drugih kationskih mikrodelcev, ki omogočajo dostavo antigenov in INK. Primer je PLL, ki je sintetični polimer pozitivno nabitih AK ostankov lizina. PLL se v celicah enostavno razgradi in je komercialno dostopen v najrazličnejših molskih masah (od 0.5 do 300 kDa) (Capan in sod., 1999c; Capan in sod., 1999b). Pokazali so, da PLL učinkovito zaščiti DNK pred razgradnjo z DNazo I (Capan in sod., 1999a).

Prednost uporabe polikationov kot nosilcev za INK je možnost postopnega sproščanja. Gre za nadzirano sproščanje učinkovine v različnih časovnih intervalih in ob različnih pogojih. Tak sistem je lahko zelo učinkovit, saj profil sproščanja bolje posnema naravno dogajanje v telesu. Ponuja možnost priprave manj toksičnih cepiv, kjer bi bila integriteta antigena in INK ohranjena do samega sproščanja, kar bi omogočalo maksimalen antigensko specifičen imunski odziv (Powell, 1996).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Uporabljene kemikalije

Preglednica 3: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti

Proizvajalec	Kemikalija
Bender MedSystems	Komercialni komplet za ELISO
BioWhittaker	Toplotno deaktiviran FBS
Fermentas	DNK bakteriofaga lambda, standard za NaDS-PAGE Page Ruler™
Fluka	NaDS, DMSO, etanol, akrilamid, N, N-metilen-bis-akrilamid
Invitrogen	Gojišče za celične kulture DMEM + GlutaMAX-I, gojišče brez seruma za celične kulture Opti-MEM I, fluorescenčno barvilo za lizosome LysoTracker Green, fluorescenčno barvilo za jedra HOECHST 33258, Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit za osamitev plazmidne DNK ustrezne čistosti za delo na človeških celičnih kulturah.
InvivoGen	Sintetični ligand TLR3 poli(I:C), ODN10104, plazmidni vektor pUNO-hTLR3, Blasticidin S,
Lonza	Osnovno gojišče za celice HMVEC-dLy Ad EBM-2 in dodatki SingleQuots
Lux	D-luciferin, CoA, benzyl coelenterazine
Merck	NaCl, bakteriološki agar, ledocetna kislina, 2-propanol, etanol, ocetna kislina, metanol
Polyplus transfection	Transfekcijski reagent JetPEI
Promega	Pufer za pasivno liziranje sesalskih celic (Passive Lysis Buffer), RNaza ONE
Sigma Aldrich	Holo-Transferin, poli-L-lizin (Mw = 70-150 kDa), ODN 10104, označen s fluorescenčnim barvilom Alexa 633, agaroz, mešanica bromfenolmodrega in ksilencianola, bromfenolmodro, gojišče LB po Millerju, EDTA, ampicilin, Tris, etidijev bromid, NaDS, glicin, NaH ₂ PO ₄ , KCl, glicerol, β-merkaptotanol, raztopina tripsina z EDTA, glukoza, klorovodikova kislina, APS, TEMED, ATP, DTT, HEPES, NaCO ₃ , Coomassie Brilliant Blue G250, gvanidinijev hidroklorid
Thermo Scientific	SPDP (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate)

3.1.2 Uporabljena laboratorijska oprema in potrošni material

Preglednica 4: Laboratorijska oprema in potrošni material

Proizvajalec	Laboratorijska oprema in potrošni material
Agilent Technologies	Aparatura za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HP 1100 Series HPLC system)
Amersham Biosciences	PD-10 kolone za razsoljevanje
Applied Photophysics	CD spektrometer Chirascan
Beckman	Centrifuga J2-HS
Berthold Detection Systems	Luminometer mikrotitrskih plošč Orion II in pripadajoč računalniški program Simplicity 4.2
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture
Bio-Imaging Systems	Sistem za slikanje elektroforeznih in NaDS gelov
BioRad	Aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (Mini Protean II), aparatura za agarozno elektroforezo DNK
BioTek	Čitalec mikrotitrskih plošč PowerWave in pripadajoč računalniški program KC Junior
Brand	Handy step pipeta za pipetiranje pri izvajanju ELISA testa, PD-Tipsi za handy step pipeto
Canon	Fotoaparat EOS 1000D za slikanje elektroforeznih in NaDS gelov
Chemass	Spektrofotometer in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
Corning	96-luknjične mikrotitrskie plošče za merjenje luminiscence, primerne za gojenje celičnih kultur CoStar
Eppendorf	Namizna centrifuga MiniSpin, centrifuga 5415R, avtomatske pipete, multikanalna avtomatska pipeta, mikrocentrifugirke
Euromax	Svetlobni mikroskop
Gilson	5 ml, 1 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl pipete, avtomatske pipete, nastavki za pipete
Greiner	Plošče za test ELISA Bio One Micro-assay 96-well plates
Hanna instruments	Magnetno mešalo
Hettich	Centrifuga Universal 32R

se nadaljuje

nadaljevanje

Proizvajalec	Laboratorijska oprema in potrošni material
Horizon	Kadička za elektroforezo
IBIDI	Mikroskopske 8-luknjične komore za celične kulture
IKA	Magnetno mešalo
Invitrogen	Naprava za avtomatsko štetje celic, barvilo tripan modro, števne ploščice
Iskra PIO d.o.o.	Biološka brezprašna komora M 18
Kambič	Parni sterilizator A-500/700, stresalnik za bakterijske kulture, inkubator za bakterijske kulture
Leica Mycosystems	Konfokalni mikroskop TCS5 SP5
Moulinex	Mikrovalovna pečica SYBIO
Novagen	Dializne epice (3,5 kDa)
Nunc	Mikrotitrne plošče (96-well)
Perkin Elmer	UV/VIS spektrofotometer Lambda 25
Phenomenex	Kolona za gelsko filtracijo BioSep-SEC-s3000
Privileg	Aparatura za varjenje vrečk
Sarsted	Mikrocentrifugirke, centrifugirke, nastavki za pipete
Sartorius	Filtri s premerom por 0,2 µm, Vivaspin koncentracije (MWCO 5kDa in MWCO 30kDa), tehnica 1712 MP8 Silver edition
Tehtnica Železnik	Tehtnica ET-111, vibracijsko mešalo
Telestar industrial	Biološka brezprašna komora BIOULTRA 4
Thermo Scientific	Centrifuga Sorvall RC5C Plus, spektrofotometer NanoDrop 1000
TPP	Plastični potrošni material za delo s celičnimi kulturami (gojitvene posodice, centrifugirke, serološke pipete)

3.1.3 Uporabljene raztopine, pufri in standardi

Preglednica 5: Raztopine in pufri, uporabljeni pri sintezi konjugatov

Pufer/raztopina	Sestava
Reakcijski pufer	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
Redukcijski pufer	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, pH 7,5

Preglednica 6: Raztopine in pufri, uporabljeni pri izolaciji konjugatov

Pufer/raztopina	Sestava
Pufer za gelsko filtracijo	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM NaCl, 1,5 M gvanidinijev hidroklorid, pH 7,5
Dializni pufer	20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,5

Preglednica 7: Raztopine in pufri, uporabljeni pri delu s celičnimi kulturami

Raztopina/pufer	Sestava
10 X PBS	1,7 M NaCl, 34 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , 18 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
NaCl za transfekcijo z JetPei	150 mM NaCl

Preglednica 8: Pufri, uporabljeni za testiranje aktivnosti z dvojnimi luciferaznim testom

Pufer	Sestava
Substrat za kresničkino luciferazo	16,67 mM HEPES, 3,33 mM MgCl ₂ , 0,08 mM EDTA, 1,67 mM NaF, 0,23 mM CoA, 16,67 mM DTT, 0,44 mM ATP, 0,39 mM luciferin (raztopljen v DMSO), pH 8
Substrat za luciferazo <i>Renilla</i>	7,5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 250 mM NaCl, 5 mM CDTA, 0,01% metanol, 0,001 mM koelenterazin (raztopljen v metanolu), pH 5

Preglednica 9: Raztopine in pufri, uporabljeni za biokemijsko dokazovanje konjugatov

Pufer/raztopina	Sestava
10% ločitveni gel za NaDS-PAGE	0,375 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,1% (m/v) NaDS, 10% (m/v) akrilamid/bisakrilamid, 50 mM APS, 3,3 mM TEMED
4% vstopni gel za NaDS-PAGE	0,375 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,1% (m/v) NaDS, 4% (m/v) akrilamid/bisakrilamid, 50 mM APS, 3,3 mM TEMED
4 X reducirajoči pufer za nanašanje vzorcev na NaDS-PAGE z NaDS	0,138 M NaDS, 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 40% (v/v) glicerol, 10% (v/v) β -merkaptotanol, 0,1% (m/v) bromfenolmodro
4 X ne-reducirajoči pufer za nanašanje vzorcev na NaDS-PAGE z NaDS	0,138 M NaDS, 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 40% (v/v) glicerol, 0,1% (m/v) bromfenolmodro
10 X elektroforezni pufer z NaDS	24,8 mM Tris, 3,5 mM NaDS, 192 mM glicin
Proteinski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Vsebuje proteine velikosti 250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa, 11 kDa
Barvilo Coomassie Brilliant Blue za barvanje NaDS gelov.	Barvilo Coomassie Brilliant Blue (50%), očetna kislina (10%)

3.1.4 Uporabljeni plazmidi

Preglednica 10: Seznam plazmidov, uporabljenih za testiranje aktivnosti z dvojnim luciferaznim testom

Vir	Plazmid/fragment	Opis
Invitrogen	pUNO-hTLR3-HA	Plazmidni vektor z zapisom za človeški TLR3 in z zapisom za odpornost proti blasticidinu.
Promega	phRL-TK	Sesalski ekspresijski in poročevalni plazmidni vektor z zapisom za luciferazo iz <i>Renilla reniformis</i> pod kontrolo konstitutivnega promotorja.
John Hiscott (McGill University, Montreal, Quebec, Kanada)	pIFN β -FLUC	Plazmidni vektor z vstavljenim genom z zapisom za luciferazo <i>Photinus pyralis</i> pod IFN- β odzivnim promotorjem človeškega gena za IFN- β .
Terje Espevik	pELAM-LUC/pcDNA3	V plazmidni vektor pcDNA3 vstavljen gen z zapisom za luciferazo <i>Photinus pyralis</i> pod NF- κ B odzivnim promotorjem človeškega gena za selektin E.

3.1.5 Uporabljeni organizmi

3.1.5.1 Bakterijski sevi

Preglednica 11: Uporabljen bakterijski sev

Sev	Genotip	Vir
<i>E. coli</i> DH5 α	F-/supE44, Δ lacU169 (N80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96, thi-1, relA1	Zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana

DH5 α je najpogostejše uporabljen sev za transformacijo v raziskovalnih laboratorijih. Prednosti seva za pomnoževanje plazmidne DNK so številne. Med drugim ne proizvaja endonukleaze I, kar preprečuje nespecifično razgradnjo plazmidne DNK in ima delečijo dela α gena za β -galaktozidazo, kar omogoča modro-belo selekcijo.

Sev DH5 α izvira iz oslabiljenega seva K12, ki ni sposoben kolonizirati človeka in ni patogen niti za človeka niti za živali. Glede na dolgoletno varno uporabo sevov K12 v laboratorijih brez negativnih vplivov na zdravje ljudi, živali in rastlin in brez vplivov na okolje, so ti sevi uvrščeni v 1. varnostni razred bioloških dejavnikov.

3.1.5.2 Celične kulture

Preglednica 12: Uporabljene celične kulture

Celična kultura	Vir	Uporaba	Opis
HEK293	Carsten Kirschning (Technische Universität München; Nemčija)	Preverjanje biološke aktivnosti z dvojnimi luciferaznimi testom	HEK293 je celična linija, nastala s transformacijo kulture človeških zarodnih ledvičnih celic z DNK adenovirusa 5.
HeLa	Darilo dr. Irene Oven (Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo)	Preverjanje internalizacije kompleksov Tf-PLL z ODN 10104-Alexa 633	Človeška celična kultura HeLa je trajna celična linija, pripravljena z izolacijo celic cervikalnega raka bolnice Henriette Lacks, po kateri je dobila ime. Ker je rakasta linija, izraža visok nivo TfR.
HMVEC-dLy Ad	Lonza	Preverjanje sposobnosti aktivacije z ligandi TLR3.	HMVEC-dLy Ad (ang. »human lymphatic microvascular endothelial cells«) so človeške celice mikrovaskularnega limfatičnega endotelija, pridobljene iz kože. Ker so celice primarne, imajo omejeno število delitev ter zahtevajo prilagojena gojišča, vendar pa testi na njih omogočajo pridobitev rezultatov z večjim biološkim pomenom.

3.2 METODE

3.2.1 Sterilizacija pufrov, raztopin in materiala za delo s celičnimi kulturami

Pufre, raztopine in steklovino, ki so odporni na toplotno obdelavo, smo sterilizirali po ustaljenem postopku avtoklaviranja (20 min, 120 °C, $1,2 \times 10^5$ Pa) v parnem sterilizatorju Kambič. Toplotno občutljive raztopine smo sterilizirali s filtriracijo skozi filtre s porami 0,2 µm.

3.2.2 Gojenje bakterijske kulture *E. coli* DH5a

Bakterijska kultura *E. coli* DH5a izvira iz zbirke bakterijskih sevov Kemijskega inštituta. Kompetentno kulturo smo uporabili za pomnoževanje in pridobivanje sesalskih plazmidnih vektorjev, ki smo jih očisti tako, da ne vsebujejo endotoksina in so primerni za transfekcijo sesalskih celičnih kultur.

3.2.2.1 Gojenje na agarnih gojiščih

Agarna gojišča z blasticidinom smo pripravili z uporabo komercialno dostopnih vrečk Fast-Media Blas Agar po navodilih proizvajalca InvivoGen. Na pripravljene plošče smo razmazali transformirano kulturo in jo inkubirali 18 ur pri temperaturi 37 °C.

3.2.2.2 Gojenje v tekočih gojiščih

Večje količine transformirane kulture *E. coli* DH5a smo gojili v tekočem gojišču LB (25 g/L), ki smo mu tik pred nasaditvijo dodali blasticidin (100 µg/ml).

Za izolacijo manjših količin plazmidne DNK smo kulturo precepili v 10 ml gojišče. To smo storili s sterilnim zobotrebcem, s katerim smo aseptično prenesli eno kolonijo z agarne plošče v tekoče gojišče.

Kulturo v tekočih gojiščih smo gojili z 18 urnim stresanjem pri 120 obr./min in temperaturi 37 °C.

3.2.3 Metode molekulskega kloniranja

Metode molekulskega kloniranja so podrobno opisane v priročnikih s tega področja (Ausubel in sod., 2002), v nadaljevanju pa so opisane le tiste, ki smo jih uporabili.

3.2.3.1 Kemijska transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH5 α

Za vnos plazmidov v kompetentne bakterijske celice *E. coli* DH5 α z namenom pomnoževanja smo uporabili metodo s toplotnim šokom.

Kompetentne bakterijske celice *E. coli* DH5 α so shranjene na -80 °C. V 30 do 45 min smo jih na ledu odtajali in dodali 10 ng plazmidne DNK. Nato smo jih inkubirali na ledu še dodatnih 30 minut. Zatem smo izvedli toplotni šok, ki je ključen za uspešno transformacijo: 4 minute na 42 °C in takoj zatem 2 minuti na ledu. Po toplotnem šoku smo celicam dodali 1 ml gojišča LB in jih 1 uro stresali pri 350 obr./min na 37 °C. Po končani transformaciji smo celice zbrali s centrifugiranjem (7000 obr./min, 3 minute) in odstranili gojišče do 50 μ L. Nato smo celice v preostanku gojišča resuspendirali in jih razmazali na agarno gojišče LB z blasticidinom.

3.2.3.2 Priprava plazmidne DNK za transfekcijo celičnih kultur

Plazmidna DNK mora imeti za delo s človeškimi celičnimi kulturami ustrezno kvaliteto in čistost.

3.2.3.2.1 Osamitev plazmidne DNK s komercialno dostopnim kompletom

Kulturo za osamitev plazmidne DNK smo pripravili v 10 ml gojiščih, kot je opisano pod točko 3.2.2. Za izolacijo smo uporabili komercialno dostopen komplet PurelinkTM Quick Plasmid Miniprep Kit, ki omogoča izolacijo visoko kvalitetne plazmidne DNK. Liza celic temelji na alkalnem/NaDS postopku. Lizat se nato prenese na kolono s silika membrano, ki selektivno veže plazmidno DNK. Nečistoče se odstrani s pufrom za izpiranje.

3.2.3.3 Določanje koncentracije nukleinskih kislin

Koncentracijo izolirane plazmidne DNK smo določili z merjenjem absorbance pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm s spektrofotometrom NanoDrop 1000. Razmerje absorbanc A_{260}/A_{280} nam pove, kakšna je čistost DNK glede na prisotnost proteinov. DNK ustrezne kakovosti ima to razmerje med 1,7 in 1,9.

3.2.4 Priprava konjugata Tf-PLL

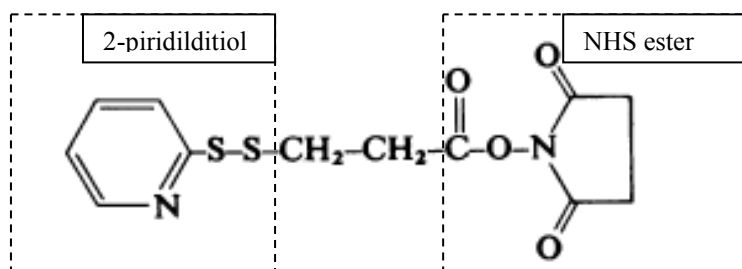
Tf smo s PLL povezali preko disulfidne vezi z uporabo komercialno dostopnega reagenta SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate) (Thermo Scientific) (slika 22). SPDP je amino- in sulfhidril- reaktiven heterobifunkcionalen reagent. Uporablja se za povezavo molekul preko amino-amino ali amino-sulfhidril skupine. Reagent povzroči nastanek disulfidne vezi, ki jo lahko naknadno cepimo z dodatkom reducirajočega sredstva, kot je ditiotritol (DTT), kar smo uporabili v postopkih dokazovanja uspešnosti sinteze konjugata.

Amino-reaktivna komponenta reagenta SPDP je N-hidroksisukcinimidni (NHS) ester, ki v reakciji z aminskimi skupinami proteinov in drugih molekul povzroči nastanek amidne vezi. Reakcijo se običajno izvede v fosfatnem ali karbonatnem pufru pri pH 7-8. Pomembno je, da reakcijski pufr ne vsebujejo primarnih aminov. Hitrost reakcije in hidrolize narašča z zviševanjem pH. Ker so reagenti, ki vsebujejo NHS estre omejeno vodotopni, jih je potrebno pred dodatkom v reakcijsko mešanico raztopiti v organskem topilu kot je dimetilsulfoksid (DMSO) (Hermanson, 2008).

Sulfhidril-reaktivna komponenta reagenta SPDP je 2-piridilditiolna skupina, ki v reakciji s sulfhidrilnimi ostanki povzroči nastanek disulfidne vezi. Reakcija povzroči zamenjavo piridin-2-tionske skupine, ki absorbira pri valovni dolžini 343 nm, zato lahko spektrofotometrično spremljamo njeno koncentracijo, kar smo uporabili za oceno uspešnosti reakcije. Reakcijski pufr s pH vrednostjo 7-8 ne sme vsebovati tiolov ali disulfid reducirajočih sredstev (Hermanson, 2008).

Proteine lahko s SPDP reagentom povežemo na dva osnovna načina glede na to, ali poleg primarnih aminov vsaj eden od proteinov vsebuje proste sulfhidrilne (-SH) skupine. Če eden od proteinov že vsebuje sulfhidrilne skupine, potem je potrebno s SPDP modificirati le drugega in nato izvesti reakcijo konjugacije. Če noben protein ne vsebuje prostih sulfhidrilnih skupin, jo lahko vnesemo z istim reagentom, ki ga naknadno reduciramo z redukcijskim sredstvom (na primer DTT), kar povzroči sprostitve piridin-2-tionske skupine in nastanek prostih sulfhidrilnih skupin. V drugem primeru je torej sprva potrebno oba proteina modificirati s SPDP, nato pa enega izmed SPDP-modificiranih proteinov reducirati, da pride do nastanka prostih sulfhidrilnih skupin, ki v naslednji reakciji omogoča nastanek konjugata (Carlsson in sod., 1978).

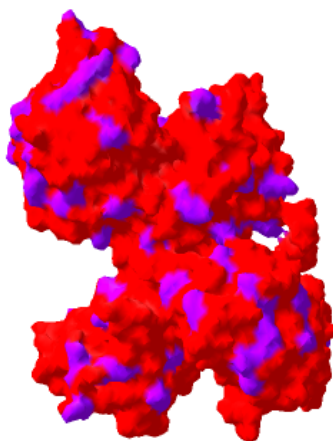
Uporaba SPDP ni omejena zgolj na povezovanje proteinov, saj lahko s tem reagentom povezujemo katerekoli molekule, ki vsebujejo primarne amine in sulfhidrilne skupine.



Slika 22: Struktura bifunkcionalnega reagenta SPDP (Carlsson in sod., 1978: 728)

3.2.4.1 Sinteza konjugata Tf-PLL

Tf in PLL smo povezali preko primarnih aminov, saj noben ne vsebuje prostih sulfhidrilnih skupin. Za reakcijo povezovanja proteinov z reagentom SPDP je najprimernejša reaktivna skupina proteinov alifatski ϵ -amin aminokisline lizina (Brinkley, 1992). Tf vsebuje precej površinsko izpostavljenih lizinskih ostankov (slika 23), PLL pa je polimer AK ostankov lizina.

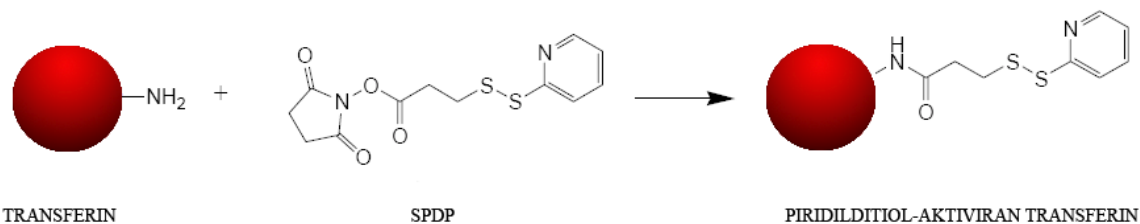


Slika 23: Površinsko izpostavljeni lizinski ostanki v molekuli transferina
Molekula je predstavljena z uporabo programske opreme Swiss-PdbViewer (Guex in Peitsch, 1997) in PDB strukture 2HAV. Svetlo modra barva predstavlja AK ostanke lizina.

Sprva smo Tf in PLL v dveh ločenih reakcijah modificirali z reagentom SPDP (slika 24 in 25).

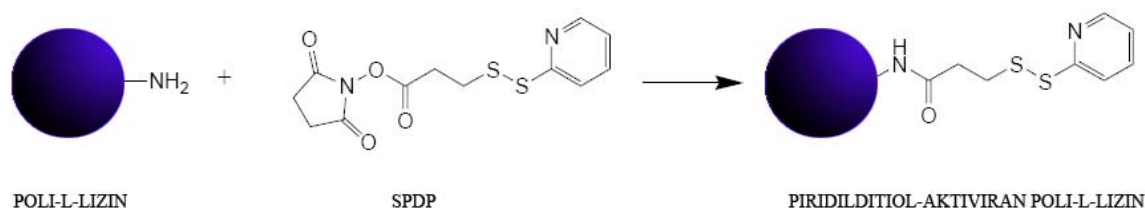
1 mg reagenta SPDP (3,2 μmol) smo raztopili v 160 μL DMSO in tako pripravili 20 mM raztopino.

10 mg (0,13 μmol) Tf (Sigma Aldrich) smo raztopili v 1 ml reakcijskega pufru (sestava je opisana v preglednic 5). Tej raztopini smo dodali 65 μL 20 mM raztopine (1,3 μmol) SPDP in nežno premešali. Po 1 uri inkubacije na sobni temperaturi smo s SPDP modificiran Tf očistili s PD-10 kolono za razsoljevanje (postopek je opisan pod točko 3.2.4.1.1) in se tako znebili stranskih produktov reakcije in nezreagiranega SPDP. V 2,5 ml raztopine po čiščenju smo dobili 0,1 μmol Tf, modificiranega z 0,7 μmol SPDP, kar pomeni, da se je na eno molekulo Tf v povprečju vezalo 7 molekul SPDP (nivo modifikacije Tf s SPDP smo določili s piridin-2-tionskim testom, ki je opisan pod točko 3.2.4.1.2). Modifikacija Tf s SPDP je shematsko prikazana na sliki 24.



Slika 24: Modifikacija transferina s SPDP

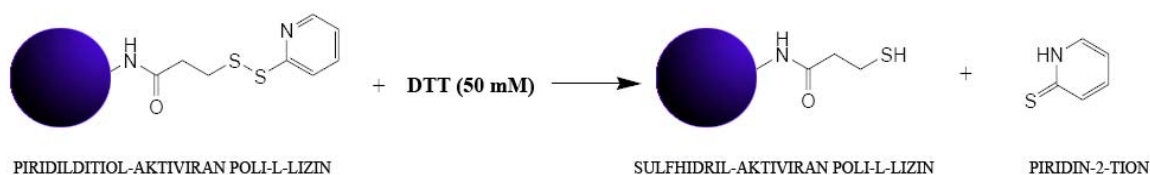
PLL smo modificirali na enak način kot Tf. 5 mg (0,045 μ mol) PLL, s povprečno molsko maso 110 kDa (Sigma Aldrich) smo raztopili v 1 ml reakcijskega pufru (sestava je opisana v preglednic 5). Tej raztopini smo dodali 45 μ L 20 mM raztopine (0,9 μ mol) SPDP in nežno premešali. Po 1 uri inkubacije na sobni temperaturi smo s SPDP modificiran PLL očistili s PD-10 kolono za razsoljevanje (postopek je opisan pod točko 3.2.4.1.1) in se tako znebili stranskih produktov reakcije in nezreagiranega SPDP. V 2,5 ml raztopine po čiščenju smo dobili 0,028 μ mol PLL, modificiranega z 0,45 μ mol SPDP, kar pomeni, da se je na eno molekulo PLL v povprečju vezalo 16 molekul SPDP (nivo modifikacije PLL s SPDP smo določili s piridin-2-tionskim testom, ki je opisan pod točko 3.2.4.1.2). Modifikacija PLL s SPDP je shematsko prikazana na sliki 25.



Slika 25: Modifikacija poli-L-lizina s SPDP

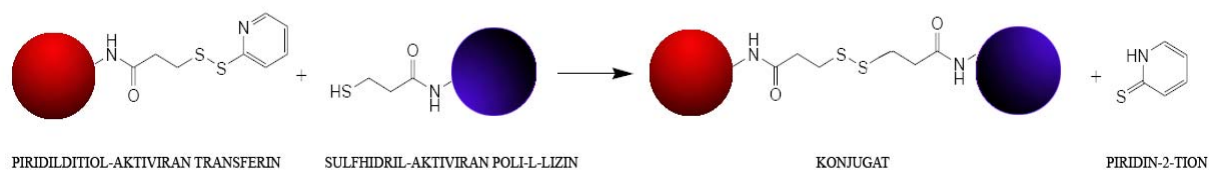
Nato smo izvedli redukcijo s SPDP aktiviranega PLL. PLL smo izbrali za redukcijo zato, ker njegova struktura ni pomembna za vezavo nukleinskih kislin, kar je njegova funkcija v konjugatu.

2,5 ml s SPDP modificiranega in očiščenega PLL smo skoncentrirali na 1 ml. Nato smo dodali 0,5 ml 150 mM raztopine DTT (končna koncentracija DTT je torej 50 mM). Vzorec smo premešali in 30 minut inkubirali na sobni temperaturi. Vzorcju smo dodali 1 ml reakcijskega pufru in ga očistili z uporabo PD-10 kolone za razsoljevanje (postopek čiščenja je opisan pod točko 3.2.4.1.1). Reakcija redukcije je shematsko prikazana na sliki 26.



Slika 26: Redukcija SPDP v poli-L-lizinu

V zadnjem koraku sinteze smo združili s SPDP modificiran Tf in s SPDP modificiran ter naknadno reduciran PLL. Vzorce smo zmešali v 3 različnih molarnih razmerjih in sicer $n(\text{Tf}): n(\text{PLL}) = 1: 0,1/ 1: 0,2$ in $1: 1$, pri čemer je bilo število molov Tf vedno enako. Vzorce smo 18 ur stresali (100 obr./min) na sobni temperaturi. Reakcija konjugacije je shematsko prikazano na sliki 27.



Slika 27: Konjugacija aktiviranega transferina in poli-L-lizina

3.2.4.1.1 Čiščenje vmesnih stopenj v sintezi konjugata s PD-10 kolono za razsoljevanje

Po modifikaciji proteinov s SPDP ali po reakciji redukcije je potrebno očistiti vmesni produkt, da se znebimo stranskih produktov reakcije, nezreagiranega SPDP ali DTT, kar omogoča uspešno nadaljnjo sintezo konjugata.

Za čiščenje smo uporabili komercialno dostopno PD-10 kolono za razsoljevanje (Amersham Biosciences), ki deluje na osnovi gelske filtracije in omogoča ločitev molekul z visoko molsko maso ($M_w > 5$ kDa) od molekul z nizko molsko maso ($M_w < 1$ kDa).

Pri delu smo sledili navodilom proizvajalca. Kolono smo sprva uravnotežili s 25 ml reakcijskega pufru (sestava je opisana v preglednic 5). Zatim smo na kolono nanesti točno 2,5 ml vzorca proteina in zavrgli volumen, ki je pritekel skozi kolono. Nato smo na kolono nanesti 3,5 ml reakcijskega pufru in zbrali celotno elucijo, v kateri se je nahajal naš protein. Stranski produkti reakcije, nezreagiran SPDP in DTT pri reakcijah redukcije, se eluirajo pri kasnejših elucijskih volumnih.

3.2.4.1.2 Preverjanje količine piridilditiolnih linkerjev v modificiranem proteinu

Za preverjanje uspešnosti modifikacije Tf in PLL s SPDP smo izvedli piridin-2-tionski test. Test temelji na dejstvu, da se v reakciji 2-piridilditionone skupine reagenta SPDP s sulfhidrilno skupino proteina sprosti piridin-2-tionske skupina, ki absorbira pri valovni dolžini 343 nm, zato lahko njeno koncentracijo spremljamo spektrofotometrično.

100 μ L s SPDP modificirane in očiščene raztopine Tf oziroma PLL smo razredčili do 1 ml z reakcijskim pufrom. Nato smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco vzorca pri 343 nm. Zatim smo dodali 10 μ L raztopine DTT s koncentracijo 15 mg/ml in premešali. Natanko po 15 minutah smo ponovno določili absorbanco pri isti valovni dolžini. Spremembo absorbance smo izračunali po formuli (1).

$$\Delta A_{343} = (\text{povp. } A_{343} \text{ po DTT}) - (\text{povp. } A_{343} \text{ pred DTT}) \quad \dots (1)$$

Molarno razmerje SPDP glede na protein smo izračunali po formuli (2), kjer število 8080 predstavlja ekstinkcijski koeficient piridin-2-tionske skupine pri 343 nm.

$$\frac{\Delta A}{8080} \times \frac{M_w \text{ proteina}}{\text{konc. proteina (mg / ml)}} = \text{št. molov SPDP na mol proteina} \quad \dots (2)$$

3.2.4.2 Izolacija konjugata z gelsko filtracijo

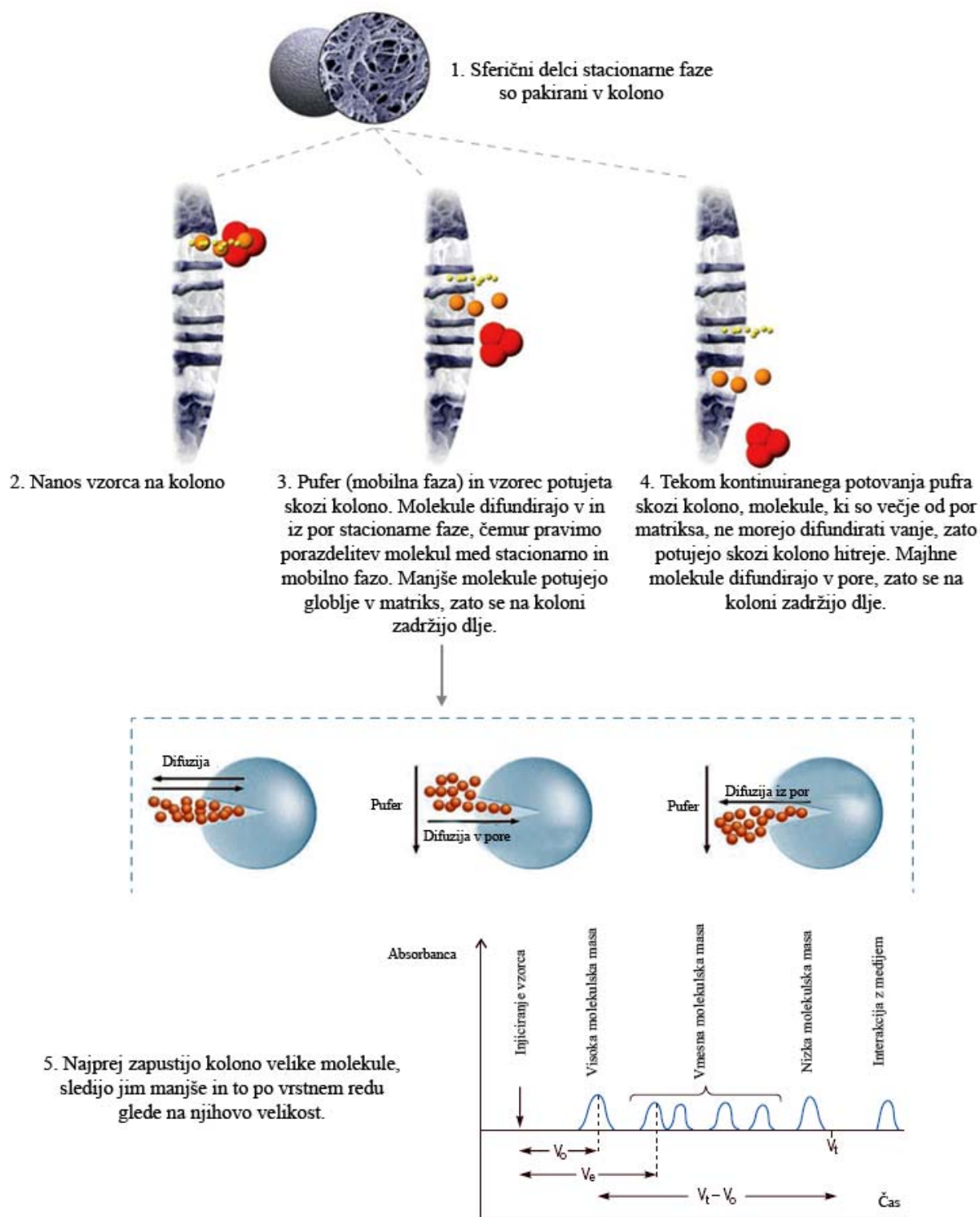
Gelska filtracija ločuje molekule na osnovi njihove velikosti oziroma molekulske mase. Stacionarno fazo kolone predstavlja polnilo, sestavljeno iz poroznih sferičnih delcev z definirano velikostjo por. Ločitev temelji na dejstvu, da dovolj majhne molekule lahko difundirajo v notranjost poroznega delca, medtem ko dovolj velike molekule ne morejo preiti v notranji volumen stacionarne faze. Molekule vmesnih velikosti delno difundirajo v notranjost por. Posledica je, da se majhne molekule na koloni zadržijo dlje časa, velike pa potujejo hitreje. Proces gelske filtracije je shematsko predstavljen na sliki 28.

Pri sintezi konjugatov Tf-PLL so nastali naslednji stranski produkti: prost Tf, ki se ni povezal s PLL, prost PLL, ki se ni povezal s Tf in prosta piridin-2-tionska skupina, ki se je sprostila ob nastanku disulfidne vezi. Ker smo v nadaljevanju preučevali funkcionalnost in biološko aktivnost kompleksov, smo želeli imeti vzorce čistih konjugatov, zato smo izvedli gelsko filtracijo. Uporabili smo napravo za visoko-tlačno tekočinsko kromatografijo oziroma HPLC (ang. »High pressure liquid chromatography«).

Ločevanje smo izvedli s kolono BioSep-SEC-s3000, ki ima stacionarno fazo pripravljeno na osnovi silikatov. Kot mobilno fazo smo uporabili pufer za gelsko filtracijo (sestava je opisana v preglednici 6), pri čemer smo nastavili konstanten pretok 0,5 ml/min. Na kolono smo v posameznem teku ločevanja nanesti 100 µg vzorca, ki smo ga pred tem 12 ur inkubirali v 200 µL pufera za gelsko filtracijo (sestava je opisana v preglednici 6). Pufer vsebuje 1,5 M gvanidinijev hidroklorid (GndCl). Ločevanje smo spremljali z merjenjem absorbance pri 280 nm, pri čemer smo zaznali le Tf, saj PLL nima AK s funkcionalnimi skupinami, ki bi absorbirale pri tej valovni dolžini. Zelene frakcije smo zbrali avtomatsko tako, da smo v programu določili, v katerem časovnem intervalu naj zbira vzorce.

Ko smo izvedli toliko separacij, da smo pridobili dovolj čistega konjugata, smo združili vse frakcije, kjer se je nahajal Tf-PLL. Nato smo vzorce dializirali z uporabo dializnih epic z MWCO 3,5 kDa (Novagen) proti dializnemu pufru (sestava opisana v preglednici 6).

Po dializi smo vzorce skoncentrirali z uporabo koncentradorjev Vivaspin z MWCO 5 kDa (Satorius) in jih shranili v hladilniku na 4 °C.



Slika 28: Shematski prikaz procesa gelske filtracije (Gel filtration ..., 2010: 10)

3.2.4.3 Preverjanje uspešnosti sinteze in izolacije konjugata s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

NaDS-PAGE smo izvajali z uporabo vertikalnega sistema Mini-Protean II. Sistem smo sestavili po navodilih proizvajalca (BioRad).

3.2.4.3.1 Vlivanje gelov NaDS

NaDS gele smo vlivali med dve, med seboj 0,75 mm oddaljeni, navpično vpeti stekelci. Najprej smo vlili 10-odstotni ločitveni gel (sestava je opisana v preglednici 9), ga prelili s 100 μ L izopropanola in pustili 45 minut, da je polimeriziral. Zatem smo s filtrirnimi papirčki odstranili izopropanol in na predhodno polimerizirani ločitveni gel vlili še 4-odstotni vstopni gel (sestava je opisana v preglednici 9), v katerega smo takoj vstavili 0,75 mm glavniček, s katerim naredimo 10 žepkov za nanos vzorcev. Vstopni gel smo pustili polimerizirati 1 uro. Na koncu smo iz gela previdno potegnili žepke in vanje nalili MQ. Gele smo uporabili takoj ali pa smo jih ovite v navlaženo papirnato brisačko in alu folijo shranili na 4 °C največ za 10 dni.

3.2.4.3.2 Priprava, nanos vzorcev in potek NaDS-PAGE

Ker so pripravljeni konjugati Tf in PLL med seboj povezani z disulfidno vezjo, smo za dokazovanje uspešnosti sinteze in izolacije izvajali NaDS-PAGE v reducirajočih in v ne-reducirajočih pogojih.

Sprva smo vzorcem dodali ustrezen volumen 4-kratnega reducirajočega oziroma ne-reducirajočega NaDS nanašalnega pufru (sestava obeh je opisana v preglednici 9), da je bila končna koncentracija NaDS v vzorcu 1-kratna. Zatem smo izvedli še toplotno denaturacijo proteinov (95 °C, 3 minute). Po denaturaciji smo vzorce centrifugirali 5 minut pri 13200 obr./min. Medtem smo po navodilih proizvajalca sestavili aparaturo za izvedbo NaDS-PAGE. Nato smo v žepke nanесли vzorce in velikostni standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas), s pomočjo katerega lahko določimo velikost proteinov v vzorcu. Elektroforeza je potekala v 1-kratnem NaDS elektroforeznem pufru (sestava je opisana v preglednici 9) približno 90 minut pri konstantni napetosti 200 V.

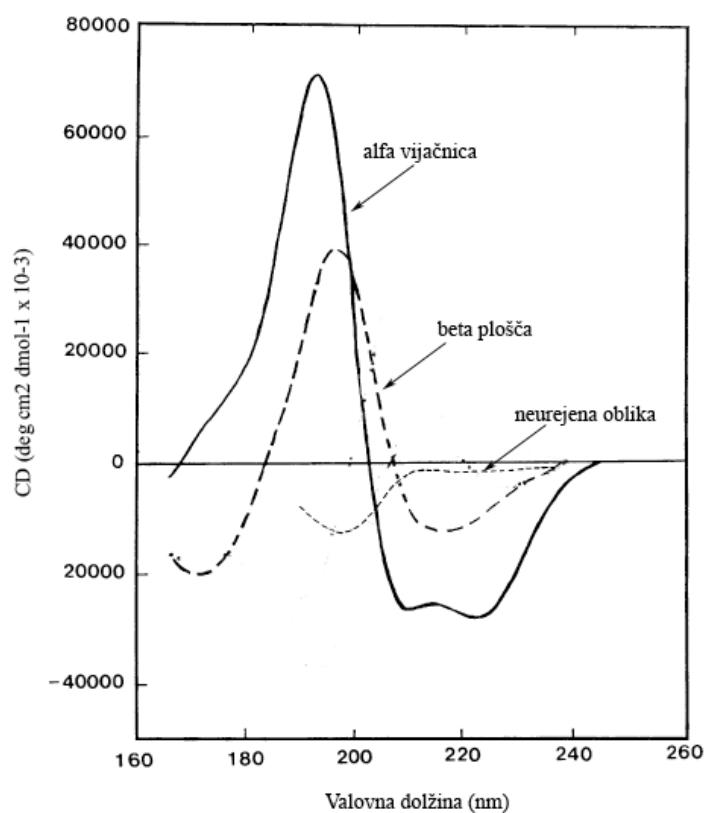
3.2.4.3.3 Barvanje NaDS gelov z barvilom Coomassie Brilliant Blue

Po končani NaDS-PAGE smo aparaturo in stekelca razstavili ter gel previdno prenesli v banjico z destilirano vodo in ga nekajkrat sprali. Zatem smo pripravili proteinsko barvilo Coomassie Brilliant Blue tako, da smo Coomassie zmešali z 20-odstotno očetno kislino v volumskem razmerju 1: 1. Barvilo smo dodali k spranemu gelu in gel pustili barvati približno 10 minut. Zatem smo ozadje razbarvali z dodatkom mešanice 30-odstotnega etanola in 10-odstotne očetne kisline. Korak spiranja smo ponovili 3-krat. Barvanje in razbarvanje gela smo izvajali pri sobni temperaturi in stresanju 100 obr./min.

3.2.4.4 Preverjanje konformacije Tf po postopkih sinteze in izolacije

Konformacijo Tf smo preverjali z metodo cirkularnega dikroizma oziroma CD.

CD je oblika spektroskopije, ki je osnovana na različni absorpciji levo- in desno-sučne cirkularno polarizirane svetlobe. Pojav merimo kot funkcijo valovne dolžine svetlobe, temperature ali kemijskega okolja s CD spektrofotometrom. CD je značilen za optično aktivne molekule, med katere sodijo tudi proteini. Uporabljamo ga lahko za določanje sekundarne strukture proteinov, saj imajo alfa vijačnica, beta plošča in neurejena oblika specifični cirkularni dikroizem (slika 29).



Slika 29: CD spektri različnih sekundarnih struktur proteinov (Kelly in sod., 2005: 121)

Spektre CD smo posneli, da smo ugotovili, kakšna je sekundarna struktura samega Tf, PLL ter izoliranega in dializiranega konjugata Tf-PLL. V prvi vrsti pa so bile meritve CD namenjene ovrednotenju vpliva 1,5 M GndCl na strukturo Tf. V ta namen smo primerjali spektre samega Tf in Tf v prisotnosti GndCl. Izvedli smo tudi toplotno denaturacijo istih vzorcev, da smo ocenili ali Tf v prisotnosti GndCl ohranja sekundarno strukturo.

3.2.4.4.1 Merjenje spektrov cirkularnega dikroizma

CD spektre Tf, PLL ter konjugatov Tf-PLL smo posneli pri valovni dolžini od 200 do 260 nm s CD spektrofotometrom Chirscan (Applied Photophysics) pri konstantnem toku dušika. Dolžina uporabljenih kivetov je bila 1 mm, koncentracija vzorcev 0,1 mg/ml. Vzorci

so bili pripravljene v reakcijskem pufru (sestava opisana v preglednici 5) oziroma v reakcijskem pufru z dodanim 1,5 M ultra-čistim GndCl. Rezultati so povprečje treh spektrov, izmerjenih pri konstantni temperaturi 23 °C.

3.2.4.4.2 Spremljanje toplotne denaturacije samega Tf in Tf z dodatkom GndCl s cirkularnim dikroizmom

CD spektre Tf in Tf z dodanim 1,5 M GndCl smo spremljali v odvisnosti od temperature in sicer pri valovni dolžini 215 in 222 nm. Uporabili smo CD spektrofotometer Chirascan (Applied Photophysics) pri konstantnem toku dušika. Izbrali smo metodo, ki je omogočala postopno segrevanje vzorca od 23 °C do 95 °C in sicer s hitrostjo 1 °C na minuto. Vzorci so bili pripravljene v reakcijskem pufru (sestava je opisana v preglednici 5) in sicer v koncentraciji 0,1 mg/ml. Rezultati za posamezno valovno dolžino so povprečje treh spektrov, končni rezultat pa smo podali v obliki povprečja spektrov pri obeh valovnih dolžinah.

3.2.5 Ugotavljanje tvorjenja kompleksov med konjugatom Tf-PLL in nukleinskimi kislinami

INK so polianionske molekule, zato smo pričakovali, da se bodo preko elektrostatskih interakcij vezale na pozitivno nabit PLL iz konjugata. Sposobnost vezave in ustrezno masno razmerje konjugata Tf-PLL glede na nukleinske kisline smo preverjali z metodo zmanjšane mobilnosti na agaroznem gelu.

Poleg preverjanja funkcionalnosti kompleksov smo s tem testom določili tudi približno masno razmerje med Tf-PLL oziroma PLL in INK, ki smo ga uporabili pri nadaljnjem testiranju biološke aktivnosti.

3.2.5.1 Metoda zmanjšane mobilnosti na gelu

Ob tvorbi kompleksov se negativni naboji nukleinskih kislin nevtralizirajo s pozitivnimi naboji PLL v konjugatu (Kim in sod., 2004). Zato pride do upočasnjene potovanja nukleinskih kislin na agaroznem gelu, kar se odraža v zamiku lise na agaroznem gelu.

3.2.5.1.1 Priprava kompleksov

Sprva smo v MQ pripravili raztopino ODN 10104 z masno koncentracijo 100 ng/μL in poli(I:C) z masno koncentracijo 25 ng/μL. Zatem smo odpipetirali po 10 μL (1 μg ODN 10104 oz 0,25 μg poli(I:C)) pripravljenih raztopin v epice ter jim dodali različne količine kompleksov Tf-PLL oziroma samega PLL in nežno premešali. Količine smo prilagodili tako, da so masna razmerja med Tf-PLL oziroma PLL in nukleinskimi kislinami znašala od 0,25 do 2. Vzorce smo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi.

3.2.5.1.2 Elektroforeza v agaroznem gelu

Agarozni gel smo pripravili z raztapljanjem ustrezne količine agaroze (glede na želeno gostoto gela) v 1-kratnem pufru TAE v mikrovalovni pečici. Za ločevanje naših fragmentov smo uporabili 2-odstoten (m/v) gel. Delno ohlajenemu (60 °C) vendar še tekočemu gelu smo dodali etidijev bromid v masni koncentraciji 10 g/l in nežno premešali ter prelili v kalup elektroforezne kadičke, v katerega smo vstavili ustrezen glavniček, ki omogoča nastanek žepkov. Počakali smo, da se gel strdi, nato pa ga prelili z 1-kratnim pufrom TAE in previdno odstranili glavničke.

Vzorcem, pripravljenim v točki 3.2.5.1.1, smo dodali tak volumen 6-kratnega nanašalnega pufru za agarozno gelsko elektroforezo, da je bila končna koncentracija 1-kratna in nežno prepipetirali. Celoten volumen smo nato prenesli v žepke gela. Poleg tega smo dodali še velikostni standard DNK bakteriofaga λ , rezane z restrikcijskima encimoma *EcoRI* in *HindIII*.

Elektroforezo smo izvajali pri konstantni napetosti 100 V z napravo za gelsko elektroforezo (BioRad) in pustili teči 15 do 30 minut.

Po elektroforezi smo gele slikali pod UV lučjo s sistemom za slikanje gelov (Bio-Imaging System).

3.2.6 Stabilnost poli(I:C) v kompleksih

3.2.6.1 Spektrofotometrično spremljanje encimske razgradnje poli(I:C) v kompleksih

Za testiranje stabilnosti poli(I:C) v kompleksih smo spremljali razgradnjo z RNazo ONE (Promega).

Test temelji na dejstvu, da pri razgradnji dvoverižnih nukleinskih kislin pride do tako imenovanega hiperkromnega efekta. Nukleotidi, ki se med razgradnjo sproščajo v raztopino, močnejše absorbirajo svetlobo pri 260 nm kot v polimeru, v katerem se baze prekrivajo in je njihova absorbanca zato nižja.

Da bi preverili ali konjugat Tf-PLL poveča stabilnost poli(I:C), smo naredili poenostavljen model, kjer smo uporabili zgolj PLL, ki je komponenta konjugata, ki veže nukleinske kisline in potencialno pripomore k njihovi stabilnosti. Skušali smo dokazati, da sam PLL v kompleksu s poli(I:C) prepreči razgradnjo nukleinskih kislin z RNazo.

V dializnem pufru (sestava je opisana v preglednici 6) smo pripravili raztopino poli(I:C) s koncentracijo 20 μ g/ml. Zatem smo raztopini dodali različno količino PLL, ki je ustrezala različnim masnim razmerjem poli(I:C): PLL (od 1: 0,025; 1: 0,1; 1: 0,25; 1: 0,5 in 1: 1), močno premešali in 30 minut inkubirali na sobni temperaturi. Zatem smo k 1 ml pripravljene raztopine dodali 10 U RNaze ONE (Promega) in 20 minut s spektrofotometrom UV/VIS Lambda 25 (Perkin Elmer) spremljali absorbanco pri valovni dolžini 260 nm.

3.2.7 Biološka aktivnost poli(I:C) v kompleksih po razgradnji z RNazo

3.2.7.1 Delo s trajno človeško celično kulturo HEK293

Človeška celična kultura HEK293 (ang. »human embryonic kidney 293 cells«) je trajna celična linija, pripravljena iz normalnih celic, ki so jih imortalizirali z virusno transformacijo. V *in vitro* pogojih jih je razmeroma enostavno gojiti saj imajo visoko in teoretično neomejeno delitveno sposobnost.

Celice so shranjene v kriovialah v tekočem dušiku (-196 °C). Odmrznili smo jih po ustaljenem postopku. Iz tekočega dušika smo jih prenesli na sobno temperaturo in jih odtalili. Zatem smo jim dodali 5 ml gojišča DMEM (ang. »Dulbecco's modified Eagle medium«) z 10-odstotnim (v/v) serumom. Nato smo celice zbrali s centrifugiranjem (1200 obr./min, 5 minut), odsesali ostanek gojišča in ga nadomestili z svežim. Nato smo celice resuspendirali in jih prenesli v gojitveno posodico ter jih inkubirali pri 37 °C v atmosferi s 95-odstotno vlažnostjo in 5-odstotnim CO₂. V teh pogojih smo gojili tudi vse uporabljene človeške celične kulture.

Delo s celicami smo opravljali v biološki brezprašni komori v celičnem laboratoriju. Celično kulturo HEK293 smo hranili s komercialno dostopnim gojiščem DMEM z dodanim 10-odstotnim (v/v), toplotno obdelanim FBS (ang. »fetal bovine serum«). Celično kulturo smo gojili v obliki enosloja v gojitvenih posodicah. Ko so celice prerasle 90 odstotkov površine gojitvene posodice, smo jih razredčili in presadili v isto posodico s svežim gojiščem. Postopek je bil naslednji: celice smo sprva dvakrat sprali s 5 ml pufra PBS (sestava je opisana v preglednici 7), nato pa dodali 3 ml raztopine tripsina z dodano EDTA. Celice smo inkubirali do trenutka, ko so se začele odlepljati (običajno 1 do 3 minute), zatem smo dodali 5 ml gojišča in s pipetiranjem sprali preostale pritrjene celice. Celice smo zbrali s centrifugiranjem (1200 obr./min, 5 minut), odstranili gojišče in jih resuspendirali v svežem gojišču. Nato smo jih razredčili v razmerju 1: 4 in jih vrnili v gojitveno posodico. Presajanje smo izvajali glede na hitrost rasti celic, običajno dvakrat tedensko. Celice smo ohranjali do dvajsete pasaže, nato pa jih zavrgli in odmrznili sveže.

3.2.7.2 Preverjanje aktivacije TLR3 z dvojnimi luciferaznimi testom na trajni človeški celični kulturi HEK293

Celice HEK293 smo uporabljali za preverjanje biološke aktivnosti z dvojnimi luciferaznimi testom. Ugotavljali smo sposobnost aktivacije receptorja TLR3 s poli(I:C) v kompleksih in s samo poli(I:C) po razgradnji z RNazo.

3.2.7.2.1 Nacepitev celic HEK293

Celice HEK293 smo odlepili s podlage, jih zbrali s centrifugiranjem in resuspendirali v svežem gojišču, kot je opisano pod točko 3.2.7.1. Nato smo alikvot (10 µL) celic pobarvali z barvilom Tripan modro in jih na števnih ploščicah prešteli z uporabo naprave za avtomatsko štetje celic (Invitrogen). Nato smo jih nacepili v 96-luknjično mikrotitrsko

ploščo za merjenje luminiscence (Corning CoStar) in sicer 3×10^4 celic na posamezno luknjico v 100 μL gojišča. Celice smo inkubirali 24 ur pri pogojih opisanih pod točko 3.2.7.1.

3.2.7.2.2 Transfekcija celic HEK293

Transfekcijo celic HEK293 s plazmidno DNK smo izvedli s komercialnim transfekcijskim reagentom jetPEITM (Polyplus transfection) po navodilih proizvajalca. V dve ločeni epici smo odpipetirali ustrezno količino 150 mM NaCl. Zatem smo v eno dodali ustrezno količino transfekcijskega reagenta jetPEITM, v drugo pa ustrezno količino plazmidne DNK (preglednica 13). Obe epici smo vorteksirali 10 sekund in nato prenesli raztopino transfekcijskega reagenta jetPEITM v raztopino plazmidne DNK ter vorteksirali 15 sekund. Mešanico smo inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi in nato dodali po 20 μL v posamezno luknjico k celicam. Celice smo inkubirali 24 ur.

Preglednica 13: Sestava transfekcijske mešanice

Sestavina	Količina glede na eno luknjico
pIFN β -FLUC (opis v preglednici 10)	40 ng
phRL-TK (opis v preglednici 10)	5 ng
pUNO-hTLR3-HA (opis v preglednici 10)	20 ng
jetPEI	0,5 μL
NaCl (jetPEI)	10 μL
NaCl (plazmidna DNK)	dopolnjeno do 10 μL

3.2.7.2.3 Stimulacija celic HEK293

Da bi nedvoumno dokazali vpliv Tf-PLL na stabilnost poli(I:C), smo poleg spektrofotometričnega spremljanja encimske razgradnje poli(I:C) v kompleksih (opisano pod točko 3.2.6) preverili še biološko aktivnost z RNazo obdelanih vzorcev. Skušali smo dokazati, da PLL v kompleksu s poli(I:C) prepreči razgradnjo nukleinskih kislin z RNazo in tako omogoča aktivacijo TLR3.

V dializnem pufru (sestava je opisana v preglednici 6) smo pripravili raztopino poli(I:C) s koncentracijo 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nato smo v ločeni epici odpipetirali 30 μL pripravljene raztopine (masa poli(I:C) = 3 μg). V prvo epico smo dodali količino PLL, ki je ustrezala masnemu razmerju poli(I:C): PLL = 1: 1, močno premešali in 30 minut inkubirali na sobni temperaturi. Zatem smo v obe epici dodali 10 U RNaze ONE (Promega) in 20 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Na koncu smo v epico, kjer je bila sama poli(I:C), obdelana z RNazo, dodali enako količino PLL kot v prvo epico in inkubirali 30 minut, da sta bila vzorca po sestavi povsem enaka.

Transficiranim celicam HEK293 smo pred stimulacijo odsesali staro gojišče in dodali 90 μL svežega. Nato smo celice stimulirali tako, da smo jim dodali 10 μL posameznega vzorca v treh paralelkah (končna koncentracija poli(I:C) v luknjicah je bila torej 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Za kontrolo smo uporabili transficirane celice, ki smo jim namesto stimulanta dodali 10 μL gojišča na posamezno luknjico.

3.2.7.2.4 Merjenje luciferazne aktivnosti

Biološko aktivnost smo preverjali z dvojnimi luciferaznimi testi. Gre za reporterski test, ki temelji na kotransfekciji celic s plazmidoma phRL-TK in pIFN β -FLUC (opis v preglednici 10). Plazmid phRL-TK nosi zapis za luciferazo *Renilla reniformis* (R-LUC) in je pod kontrolo konstitutivno aktivnega promotorja gena za timidinsko kinazo virusa herpes simplex (HSV-TK). To pomeni, da se od transfekcije naprej nenehno izraža in služi za oceno uspešnosti transfekcije oziroma normalizacijo rezultatov. Plazmid pIFN β -FLUC nosi zapis za luciferazo kresničke (F-LUC) in je pod kontrolo inducibilnega promotorja, ki se odziva na transkripcijski faktor IRF3 (promotor gena za IFN- β). F-LUC začne nastajati šele po stimulaciji receptorja TLR3 in nadaljnji sproženi signalizaciji, ki vodi do nastanka IRF3. Aktivnost F-LUC je v tem primeru torej pokazatelj biološke aktivnosti liganda.

18 ur po stimulaciji celic (opisano pod točko 3.2.7.2.3) smo odstranili gojišče in celicam dodali 30 μ L 1-kratnega pufera za lizo celic (Promega). Ploščo smo rahlo pretresli in inkubirali 30 minut na sobni temperaturi, nato pa smo jo zamrznili za 24 ur na -20 °C. Luciferazno aktivnost smo izmerili z luminometrom mikrotitrskih plošč Orion II (Berthold Detection Systems). Substrat za F-LUC je luciferin, za R-LUC pa koelenterazin, aktivnost obeh encimov pa se odraža v luminiscenci, ki jo izmeri luminometer v posamezni luknjici. Reakciji potekata neodvisno, luminiscenco se meri glede na napisan program za to metodo: luminometer sprva vbrizga pufer za kresničkino luciferazo in izmeri luminiscenco F-LUC. Nato vbrizga še pufer za *Renilla* luciferazo in izmeri luminiscenco R-LUC. Pufer za R-LUC inhibira F-LUC, kar omogoča, da je izmerjena luminiscenca posledica aktivnosti R-LUC (sestava obeh pufrov je opisana v preglednici 8).

Rezultate smo obdelali s programom Excel in podali končno vrednost kot relativno luciferazno aktivnost oziroma RLU (ang. »relative light units«). RLU dobimo z normalizacijo glede na R-LUC, pri čemer delimo vrednosti F-LUC z vrednostmi R-LUC za vsako luknjico posebej. Statistično obdelavo smo naredili s programom Excel z orodjem za analizo podatkov *t*-test in sicer smo preizkušali domnevo o razliki povprečij v primeru različnih varianc (ang. »*t*-test: Two-sample assuming unequal variances«) pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$. Upoštevali smo dvostransko alternativno domnevo, uporabili pa smo tudi vrednost *P* (razlaga v prilogi A).

3.2.8 Preverjanje celičnega vnosa kompleksov

Sposobnost celičnega vnosa INK, vezanih na konjugat Tf-PLL, smo opazovali s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo. Preverjali smo ali je Tf fiziološko aktiven oziroma sposoben vezave na TfR, kar omogoča receptorsko-posredovano endocitozo in s tem nadzorovan vnos v endosomalno pot. Kot INK smo uporabili CpG ODN 10104, označen z fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor 633 (Sigma Aldrich) oziroma ODN-Alexa 633. Poleg tega smo preverjali kolokalizacijo kompleksov z barvilom za lizosome LysoTracker Green (Invitrogen). Kot dokaz, da opazujemo celice v pravi ravnini in da bi se izognili artefaktom, smo z barvilom HOECHST 33289 (Invitrogen) pobarvali tudi jedra. Potek poskusa je shematsko prikazan na sliki 30 in podrobno opisan v naslednjih odstavkih.

3.2.8.1 Delo s trajno človeško celično kulturo HeLa

Človeška celična kultura HeLa je trajna celična linija, pripravljena z izolacijo celic cervikalnega raka bolnice Henrietti Lacks, po kateri je tudi dobila ime. V *in vitro* pogojih je linijo razmeroma enostavno vzdrževati, saj ima visoko in teoretično neomejeno delitveno sposobnost.

Linijo HeLa smo uporabili zato, ker gre za rakaste celice, ki izražajo višji nivo TfR (Bleil in Bretscher, 1982; Inoue in sod., 1993), zaradi česar bi morala biti preko Tf posredovana endocitoza učinkovita. Poleg tega se celice močno držijo podlage in so zato primerne za delo z mikroskopom, saj omogočajo enostavno večkratno spiranje, kar je pomembno za doseganje relevantnih rezultatov.

Delo s celično kulturo HeLa je potekalo na povsem enak način, kot s celično kulturo HEK293 (opisano pod točko 3.2.7.1).

3.2.8.2 Analiza celic s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo

Konfokalna fluorescenčna mikroskopija je tehnika optičnega slikanja, namenjena povečanju optične ločljivosti in kontrasta mikrografa. Z uporabo laserja in sistema zaslonk pregledujemo predmet po optičnih rezinah, kjer laser vzbuja fluorescenčne molekule v vsaki točki posebej. Prva zaslonka zoži žarek in s tem omogoči večjo ločljivost, druga pa prepušča ozek snop fluorescence le iz točke, ki je bila obsevana. Tako se izognemo zaznavanju fluorescence, ki vstopa s preparata izven gorišča. Uporaba konfokalne fluorescenčne mikroskopije v vedah o življenju je zelo široka, najpogosteje pa z njo opazujemo fiksirane ali žive celice in tkiva, ki jih navadno označimo s sintetičnimi fluorescenčnimi barvili (fluorokromi) ali fluorescenčnimi proteini.

3.2.8.2.1 Nacepitev celic HeLa

Celice smo nasadili v 8-luknjične mikroskopske komore (Ibdi) in sicer 5×10^4 celic na posamezno luknjico v 300 μL gojišča. Celice smo inkubirali 24 ur pri pogojih, opisanih pod točko 3.2.7.1.

3.2.8.2.2 Dodajanje kompleksov k celicam HeLa

Komplekse Tf-PLL/ODN-Alexa 633 smo pripravili neposredno pred stimulacijo. Sprva smo pripravili 5 μM raztopino ODN-Alexa 633 v gojišču OPTIMEM. Nato smo 20 μL (0,8 μg) pripravljene raztopine dodali 2-kratno maso kompleksov Tf-PLL (1,6 μg), nežno premešali in inkubirali 1 uro na sobni temperaturi. Za kontrolo smo uporabili enako količino iste raztopine ODN-Alexa 633 pod enakimi pogoji, vendar brez dodatka konjugata Tf-PLL.

24 ur po nacepiti smo celicam odsesali staro gojišče. Pripravljene vzorce smo v gojišču DMEM z 10-odstotnim FBS razredčili do 200 μL , rahlo premešali in dodali k celicam. Končna koncentracija ODN-Alexa 633 v posamezni luknjici je bila 0,5 μM . Vzorce smo inkubirali 4 ure pri pogojih, opisanih pod točko 3.2.7.1.

3.2.8.2.3 Spiranje celic HeLa

Po 4 urah inkubacije smo celice 4-krat previdno sprali z gojiščem DMEM z 10-odstotnim FBS. Namen spiranja je odstranitev ODN-Alexa 633 in kompleksov, ki v štirih urah niso prišli v celico. Poleg tega je potrebno odstraniti ves zunajcelični ODN-Alexa 633, saj bi sicer zaradi močne fluorescence in presevanja motil samo mikroskopiranje, kar bi lahko vodilo do artefaktov.

3.2.8.2.4 Označevanje celic HeLa z barvilom za lizosome LysoTracker Green in barvilom za jedra HOECHST 33258

LysoTracker Green je fluorescenčno barvilo, ki specifično barva lizosome, zato nam preko kolokalizacije s kompleksi omogoča spremljanje vnosa v endocitotsko pot. HOECHST 33258 je prav tako fluorescenčno barvilo, ki specifično barva jedra celic. Uporabili smo ga za lažje spremljanje vnosa kompleksov v celice, saj nam omogoča opazovanje ustrezne ravnine celic, poleg tega se izognemo artefaktom, saj bi prisotnost kompleksov v jedrih pomenila, da poskus oziroma meritev ni ustrezna.

Po četrtem spiranju celic smo v luknjice dodali gojišče, v katerem smo pripravili 1 nM LysoTracker Green (Invitrogen) in 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ HOECHST 33258 (Invitrogen). Celic po dodatku barvil ni bilo potrebno spirati, zato smo po 1 uri nadaljevali neposredno z mikroskopiranjem.

3.2.8.2.5 Mikroskopiranje

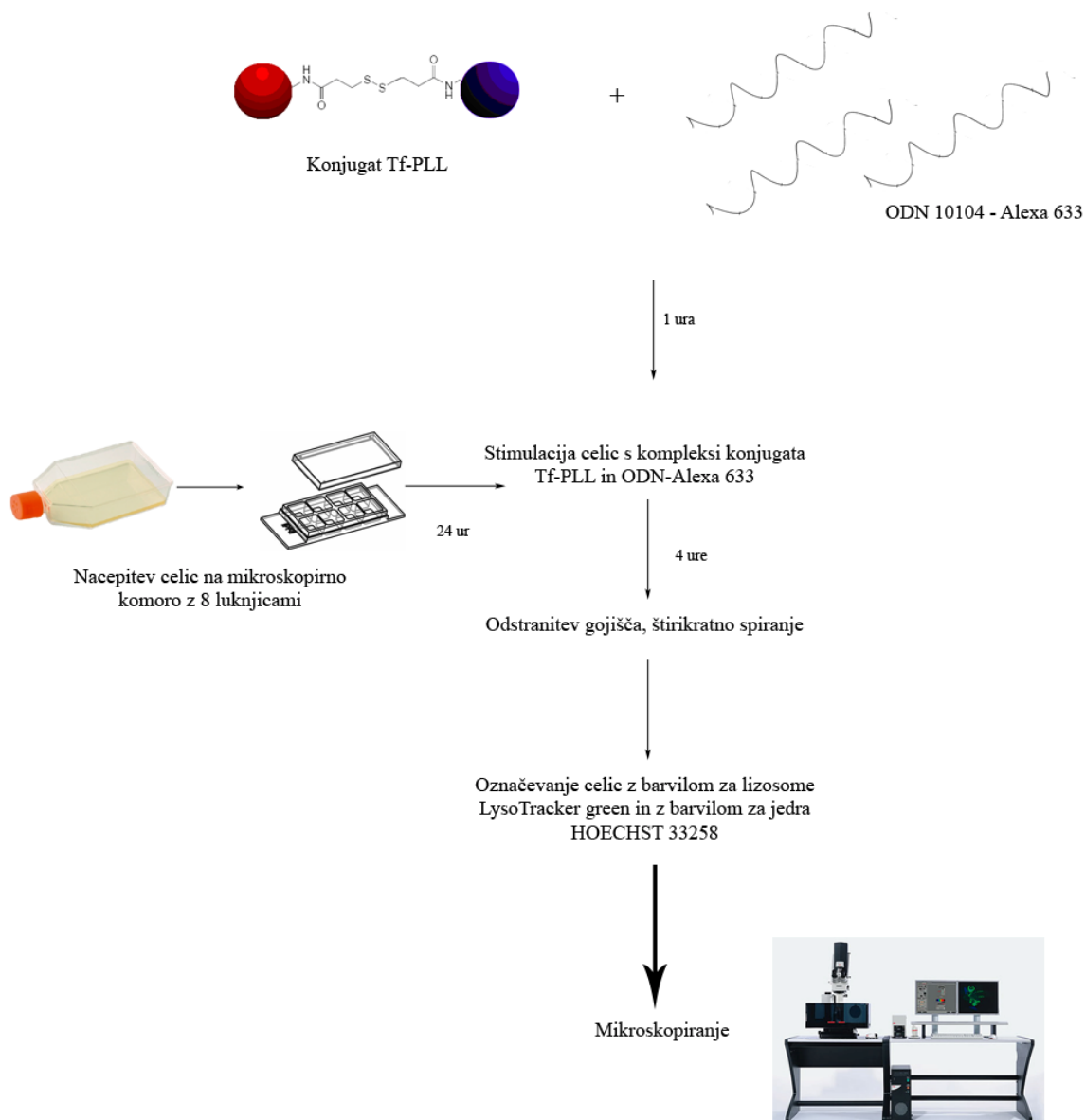
Vnos kompleksov Tf-PLL/ODN-Alexa 633 v žive celice HeLa smo po 4 urah inkubacije in 1 uri barvanja opazovali s konfokalnim invertnim mikroskopom Leica TCS SP5 (Leica Microsystems). Uporabili smo imerzijski objektiv s 63-kratno povečavo in NA 1,4.

Po vklopu laserjev smo nastavili vse potrebne parametre (intenziteta laserskega žarka, filtri, ozadje, območje detekcije emisije in način snemanja slike).

Uporaba laserjev je bila odvisna od uporabljenega fluorescenčnega barvila in valovne dolžine, pri kateri je bilo potrebno vzbujati. Za opazovanje ODN-Alexa 633 smo uporabili 10 mW HeNe laser valovne dolžine 633 nm. Jakost laserja smo nastavili na 20 odstotkov. Za opazovanje barvila LysoTracker Green smo uporabili 25 mW močni večlinijski argonski laser in vzbujali pri valovni dolžini 488 nm. Jakost laserja smo nastavili na 25 odstotkov. HOECHST 33258 smo opazovali z laserjem Diode 405 in vzbujali pri valovni dolžini 405 nm.

Ko smo v programu LAS AF 1.8.0. (Leica Microsystems) posneli slike, smo določili, kakšne barve naj bo na sliki posamezno barvilo. Za ODN-Alexa 633 smo določili rdečo barvo, za LysoTracker Green zeleno in za HOECHST 33258 modro.

Kolokalizacijo smo opazovali tako, da smo s programom pripravili prekrivajoče slike. Kolokalizacija ODN-Alexa 633 (rdeče) in LysoTracker Green (zeleno), se odraža v prekrivanju signalov in nastanku rumenih lis.



Slika 30: Shematski prikaz preverjanja celičnega vnosa kompleksov s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo

3.2.9 Preverjanje biološke aktivnosti kompleksov na primarni celični liniji HMVEC-dLY Ad

Da bi ugotovili ali pripravljene kompleksi aktivirajo imunski odziv, smo z njimi in ustreznimi kontrolami stimulirali primarno celično linijo človeškega mikrovaskularnega limfatičnega endotelija oziroma HMVEC-dLY Ad. Celična linija je komercialno dostopna in izraža receptor TLR3. Stimulacija celic s poli(I:C) sproži med drugim močno proizvodnjo IL-6, ki smo jo spremljali s komercialnim testom ELISA (Bender MedSystems).

3.2.9.1 Delo s primarno človeško celično kulturo HMVEC-dLY Ad

S primarno celično linijo HMVEC-dLY Ad smo ravnali po navodilih proizvajalca (Lonza). Gojili smo jo pri pogojih, opisanih pod točko 3.2.7.1. Ker gre za primarno celično linijo, je vzdrževanje kompleksnejše, celice pa za rast potrebujejo prilagojeno gojišče (Lonza). Celice imajo omejeno število delitev, zato smo linijo vzdrževali, dokler je imela ustrezno hitrost rasti.

Celice smo gojili v gojitvenih posodah s 15 ml prilagojenega gojišča. Gojišče smo jim menjali enkrat tedensko, ko pa so celice prerasle podlago, smo jih razredčili. Sprva smo odstranili staro gojišče in celice dvakrat sprali s 5 ml PBS. Nato smo dodali 3 ml tripsina in inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Nato smo, za razliko od celic HEK293 in HeLa, celice fizično odlepili z uporabo strgalca za odlepljanje celic. Za inaktivacijo tripsina smo dodali 3 ml gojišča, ogretega na 37 °C. Suspenzijo celic smo odpipetirali v falkonko in jih zbrali s centrifugiranjem (1200 obr./min, 5 minut). Odsesali smo supernatant in celice resuspendirali v 4 ml gojišča ter jih vrnili v gojitveno posodico s svežim, ogretim gojiščem, v razmerju 1:4.

3.2.9.2 Časovno spremljanje biološke aktivnosti kompleksov s človeškim IL-6 ELISA testom

3.2.9.2.1 Nacepitev celic HMVEC-dLY Ad

Celice smo odlepili po postopku, opisanem pod točko 3.2.9.1. Ko smo jih zbrali in resuspendirali, smo alikvot (10 µL) pobarvali z barvilom Tripan modro in jih na števnih ploščicah prešteli z uporabo naprave za avtomatsko štetje celic (Invitrogen). Nato smo jih nacepili v običajno 96-luknjično mikrotitrsko ploščo za gojenje celic (Nunc) in sicer 4×10^4 celic na posamezno luknjico v 200 µL gojišča. Celice smo inkubirali 24 ur pri pogojih, opisanih pod točko 3.2.7.1.

3.2.9.2.2 Stimulacija celic HMVEC-dLY Ad

Sprva smo pripravili komplekse konjugata Tf-PLL in poli(I:C) ter samega PLL in poli(I:C). Najprej smo v prilagojenem gojišču pripravili raztopino poli(I:C) z masno koncentracijo 50 µg/µL. Nato smo raztopino razdelili na tri dele. Prvemu smo dodali

količino kompleksov Tf-PLL, ki je ustrezala masnemu razmerju Tf-PLL: poli(I:C) = 2: 1, drugemu količino PLL, ki je ustrezala masnemu razmerju PLL: poli(I:C) = 1,5: 1, tretjemu pa samo gojišče. Zaradi natančnosti smo izenačili volumne in vzorce dopolnili do 100 μL z gojiščem nato pa rahlo premešali in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi. Nato smo vzorce dopolnili do 200 μL glede na posamezno luknjico, rahlo premešali in dodali k celicam. Koncentracija poli(I:C) v posamezni luknjici je znašala 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Pred stimulacijo celic smo zamenjali staro gojišče.

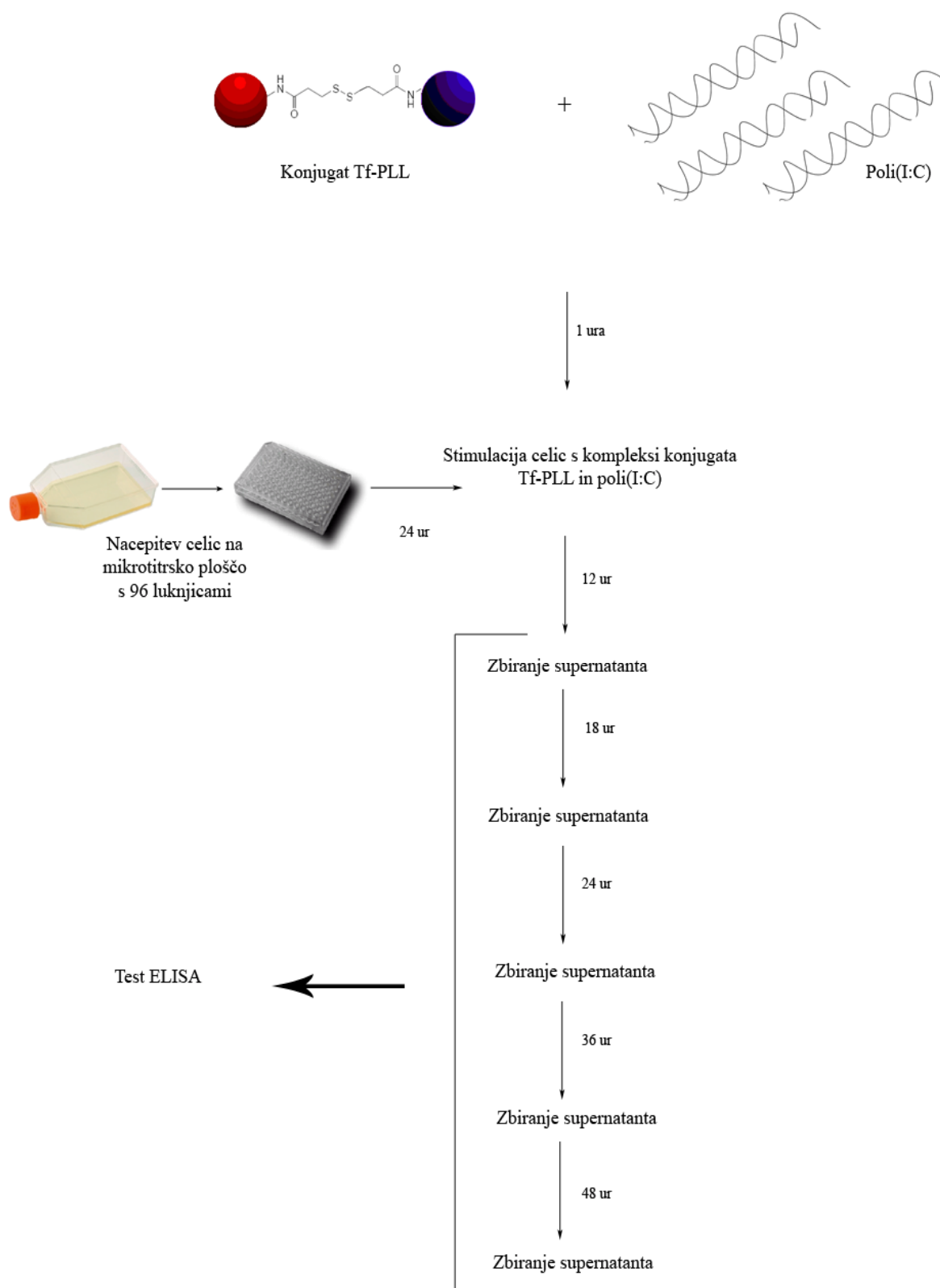
Masna razmerja konjugata Tf-PLL oziroma samega PLL proti poli(I:C) smo določili z metodo zmanjšane mobilnosti na gelu (opisano pod točko 3.2.5) in sicer smo uporabili masno razmerje, pri katerem je lisa poli(I:C) na agaroznem gelu povsem izginila, oziroma je prišlo do popolne zaustavitve potovanja na gelu.

3.2.9.2.3 Zbiranje supernatanta stimuliranih celic HMVEC-dLY Ad

Ker smo želeli spremljati časovni odziv aktivacije receptorja TLR3 s kompleksi, smo iz istih luknjic zbirali supernatante v različnih časovnih intervalih in sicer 12, 18, 24, 36 in 48 ur po stimulaciji.

Volumen gojišča v posamezni luknjici je znašal 200 μL . Pred odvzemom supernatanta smo vsebino luknjice zelo previdno trikrat prepipetirali in pazili, da se pri tem celice niso odlepile od podlage. Nato smo odvzeli 20 μL homogenega supernatanta in ga nemudoma zmrznili do analize. Po vsakem odvzemu supernatanta smo v luknjico dodali 20 μL svežega gojišča, da pri naslednjih odvzemih koncentracija IL-6 v luknjici, zaradi vedno manjšega volumna, ne bi bila vsakokrat višja, kar bi se odražalo v lažno višjih vrednosti pri testu ELISA. Pri tem smo seveda naredili napako, vendar so bili rezultati lažno nižji, poleg tega nas je zanimalo relativno razmerje med vzorci pri določenem času, ki pa bi moralo biti ne glede na količino odvzetega IL-6 enako.

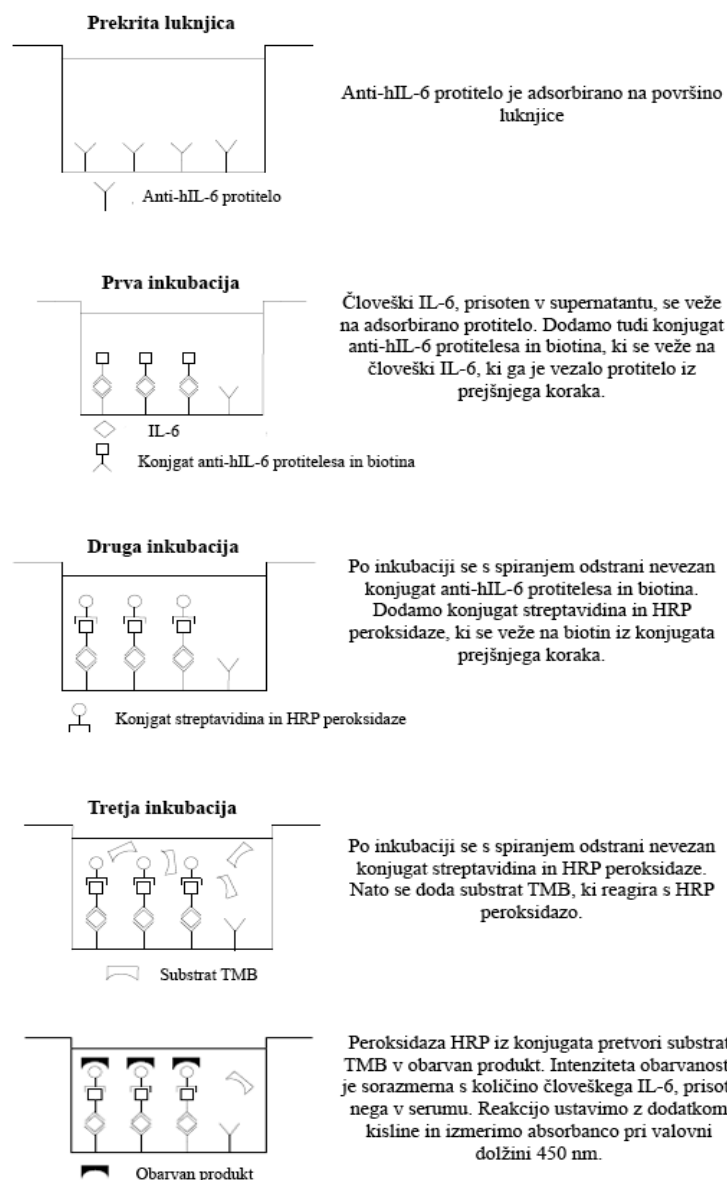
Shematski potek opisanega poskusa je predstavljen na sliki 31.



Slika 31: Shematski prikaz poteka poskusa za časovno spremljanje količine IL-6 v supernatantu celic HMVEC-dLy Ad po stimulaciji s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C)

3.2.9.2.4 Preverjanje sinteze humanega IL-6 s testom ELISA

Za preverjanje koncentracije humanega IL-6 v supernatantih celic smo uporabili komercialno dostopen komplet za test IL-6 ELISA (Bender MedSystems) po navodilih proizvajalca. Odvzete supernatante smo pred testom 10-krat redčili. Kot biološko kontrolo smo uporabili nestimulirane celice, za kontrolo testa pa smo izvedli test brez dodatka supernatanta. Pozitivna kontrola je bil standard IL-6. Princip testa je shematsko prikazan na sliki 32, izvorna navodila proizvajalca pa se nahajajo v prilogi B.

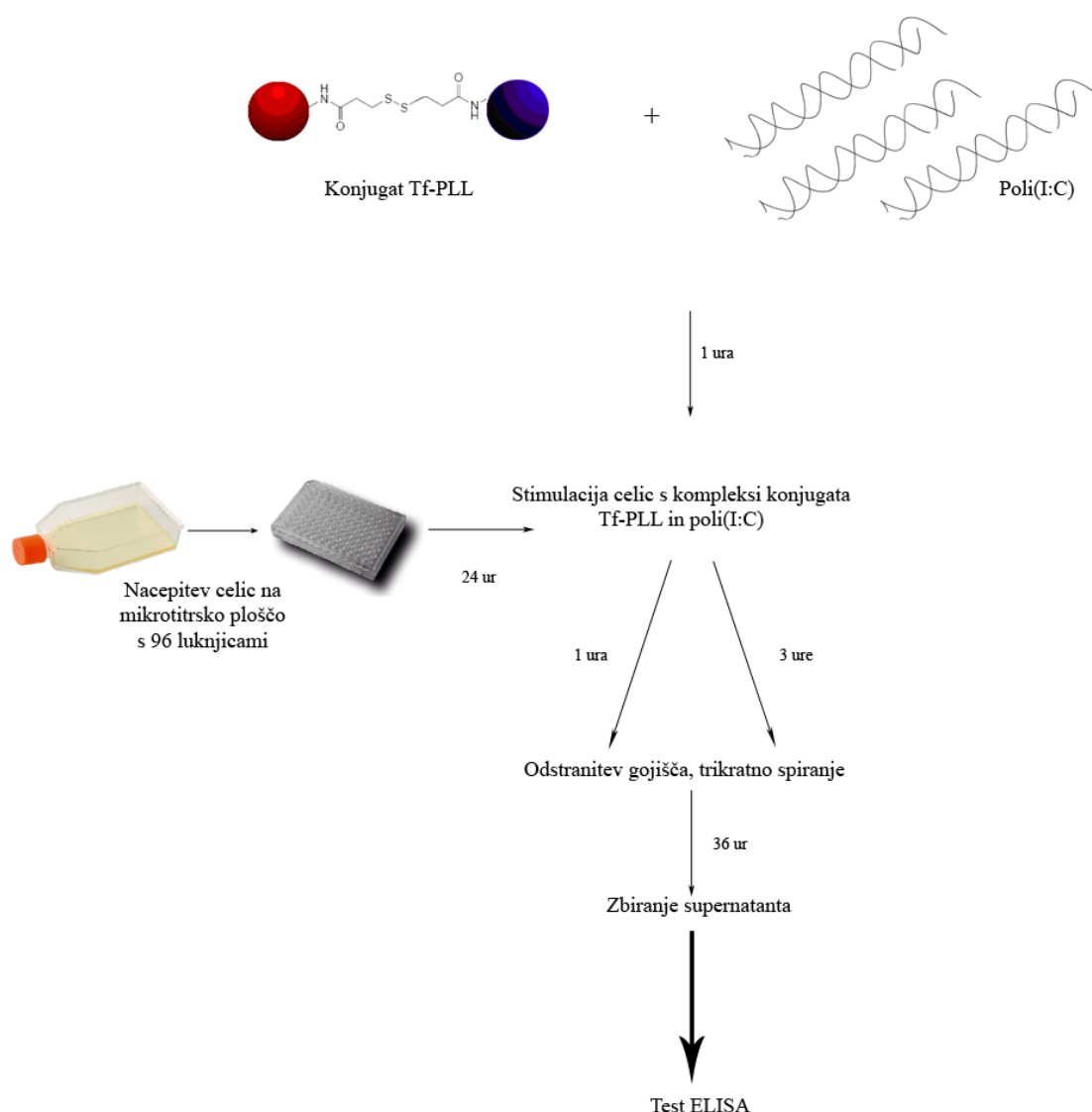


Slika 32: Shematski prikaz preverjanja sinteze človeškega IL-6 s testom ELISA (Human IL-6 ..., 2007: 5)

Statistično obdelavo smo naredili s programom Excel z orodjem za analizo podatkov *t*-test in sicer smo preizkušali domnevo o razliki povprečij v primeru različnih varianc (ang. »*t*-test: Two-sample assuming unequal variances«) pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$. Upoštevali smo dvostransko alternativno domnevo, uporabili pa smo tudi vrednost *P* (razlaga v Prilogi A).

3.2.9.3 Določanje biološke aktivnosti kompleksov s človeškim IL-6 ELISA testom ob odstranitvi gojišča po eni oziroma treh urah

Da bi preverili ali ima povečana internalizacija kompleksov tudi biološki pomen, smo spremljali proizvodnjo IL-6 v celicah HMVEC-dLY Ad po stimulaciji s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C). Test smo izvedli na povsem enak način, kot je opisano v točki 3.2.9.2, le da smo 1 oziroma 3 ure po stimulaciji celicam odstranili gojišče in jih trikrat previdno sprali s svežim gojiščem, nato pa jim dodali 200 μ L novega gojišča. Nato smo stimulirane celice inkubirali 36 ur pri pogojih, opisanih pod točko 3.2.7.1. Z odstranitvijo gojišča po kratkem času smo odstranili vso poli(I:C), ki se v tem času ni vnesla v celice. Pričakovali smo učinkovitejši vnos poli(I:C) v kompleksih s Tf-PLL, v primerjavi s prosto poli(I:C). To bi se odražalo v večji proizvodnji človeškega IL-6, kar smo spremljali s človeškim IL-6 ELISA testom. Shematski potek poskusa je predstavljen na sliki 33.



Slika 33: Shematski prikaz poteka poskusa za določanje količine IL-6 v supernatantih celic HMVEC-dLY Ad po stimulaciji s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) ob odstranitvi gojišča

3.2.9.4 Test kompetitivne inhibicije s prostim Tf

Da bi potrdili specifičnost interakcije kompleksov Tf-PLL/poli(I:C) s TfR, smo izvedli test kompetitivne inhibicije s prostim Tf. Pričakovali smo, da bo prost Tf zasedel omejeno število TfR na celicah HMVEC-dLY Ad, zato bo vnos kompleksov preko Tf-posredovane receptorske endocitoze delno inhibiran, kar bi se odražalo v nižji biološki aktivnosti poli(I:C).

Test smo izvedli na povsem enak način kot pod točko 3.2.9.2, le da smo 10 minut pred stimulacijo celic v luknjico dodali 50-kratni molarni prebitek prostega Tf, prav tako smo enako količino prostega Tf dodali še v sam vzorec. Stimulirane celice smo inkubirali 24 ur pri pogojih, opisanih pod točko 3.2.7.1 in nato zbrali supernatante ter izvedli ELISA test za določanje količine človeškega IL-6.

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA KONJUGATA TF-PLL

4.1.1 Sinteza konjugata Tf-PLL

Tf in PLL smo z uporabo bifunkcionalnega reagenta SPDP povezali preko disulfidne vezi. Sprva smo s SPDP tako v Tf kot tudi PLL vnesli piridilditiolne skupine. Nato smo iz piridilditiolne skupine v PLL z redukcijo odstranili piridin-2-tionsko skupino in tako dobili prosto sulfhidrilno skupino. Po čiščenju vmesnih stopenj sinteze z razsoljevanjem smo združili modificirana Tf in PLL ter s tvorbo disulfida prišli do končnega konjugata. Potek sinteze jo podrobno opisan in shematsko predstavljen pod točko 3.2.4 v poglavju Materiali in metode.

V preglednici 14 so predstavljene osnovne fizikalno-kemijske lastnosti Tf in PLL. PLL je sintetični polimer AK lizina in je mešanica različno velikih polipeptidov z molsko maso od 70 do 150 kDa. Zato smo njegove teoretične lastnosti predstavili na podlagi povprečne dolžine polipeptidne verige. Ker ne vsebuje AK s funkcionalnimi skupinami, ki bi absorbirale pri 280 nm (AK triptofan, tirozin ali cistein), se njegove koncentracije z UV spektroskopijo pri tej valovni dolžini ne da spremljati.

Preglednica 14: Osnovne fizikalno-kemijske lastnosti transferina in poli-L-lizina

Protein	Število aminokislin	Velikost (Da)	Teoretična izoelektrična točka	Ekstinkcijski koeficient pri 280 nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)	*A 0,1 % (=1 g/L)
Transferin	698	77050	6,81	85240	1,106
Poli-L-lizin	859	110000	12,93	0	0

*A = absorbanca pri 280 nm

S piridin-2-tionskim testom smo pokazali, da je z 1 molekulo Tf v povprečju reagiralo 7 molekul SPDP, z 1 molekulo PLL pa 16. To pomeni, da je v povprečju približno na vsakih 50 AK lizina prisotna piridilditiolna skupina, ki omogoča vezavo ene molekule Tf. Do rezultata smo prišli z uporabo enačbe (2), navedene v poglavju Materiali in metode. Rezultati so predstavljeni v preglednici 15.

Preglednica 15: Ocena modifikacije transferina in poli-L-lizina s SPDP

	Transferin	Poli-L-lizin
A ₃₄₃ pred redukcijo z DTT	0,01	0,001
A ₃₄₃ po redukciji z DTT	0,24	0,14
A ₃₄₃ po redukciji - A ₃₄₃ pred redukcijo	0,23	0,139
Koncentracija proteina (mg/ml)	0,31	0,12
n(SPDP) / n(protein)	7	16

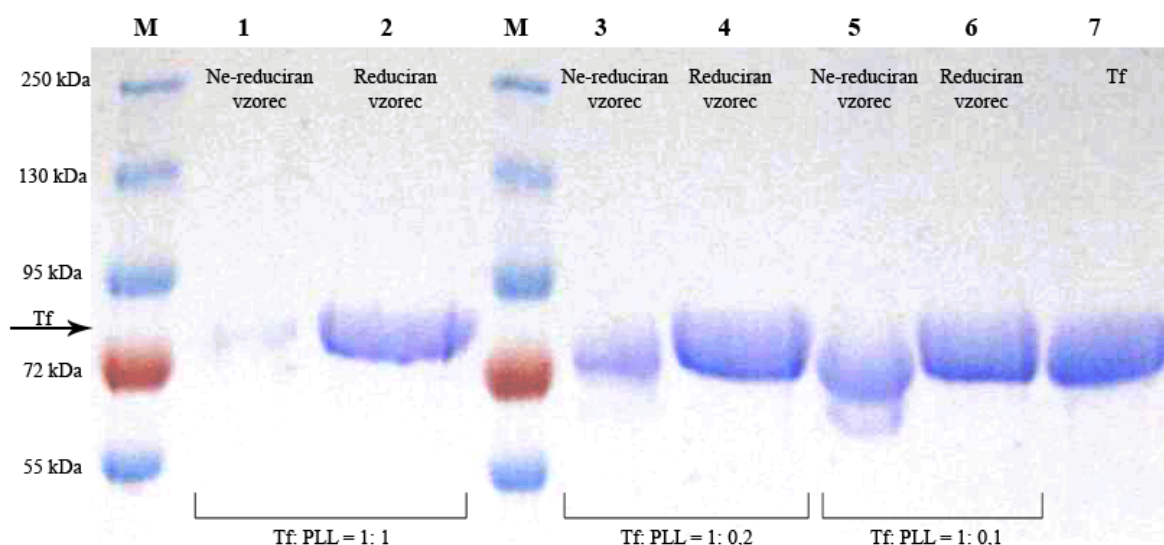
4.1.1.1 Preverjanje sinteze konjugata Tf-PLL z NaDS-PAGE

Disulfidna vez med Tf in PLL je občutljiva na redukcijska sredstva, kar smo uporabili za dokazovanje sinteze konjugata. V reducirajočih pogojih, ki prekinajo vez med Tf in PLL ter po barvanju NaDS-PAGE gela z barvilom Coomassie Brilliant Blue, pričakujemo liso pri 77 kDa, ki predstavlja Tf, medtem ko sam PLL na analitičnem NaDS gelu ni viden. Vzrok je močno pozitiven naboj PLL, ki preprečuje vstop v gel. Prav tako v vzorcih brez dodanega reducenta ne moremo opazovati konjugatov Tf-PLL, saj zaradi velike gostote pozitivnega naboja in velike molekulske mase ne potujejo v gel.

Slika 34 prikazuje NaDS-PAGE gel, na katerega smo nanesti 10 µg konjugata Tf-PLL pred čiščenjem z gelsko filtracijo ter enako maso samega Tf (vzorec 7). Lise, ki jih vidimo na gelu predstavljajo Tf. Glede na velikostni standard je njegova molekulska masa ustrezna, saj se pojavi malo nad liso standarda velikosti 72 kDa. Poleg tega se sam Tf (vzorec 7) nahaja na povsem enakem mestu.

Opazimo, da se v reducirajočih pogojih (vzorci 2, 4 in 6) pojavlja intenzivnejša lisa Tf, kot v ne-reducirajočih. Razlog je, da se Tf v reducirajočih pogojih ob prekinitvi disulfidne vezi sprost iz konjugata in potuje v gel, medtem ko v ne-reducirajočih pogojih ostaja vezan v konjugatu, ki zaradi zgoraj omenjenih razlogov ne more potovati v gel. Razlika je najbolj opazna pri molarnem razmerju Tf: PLL = 1: 1, kjer v ne-reducirajočih pogojih (vzorec 1) lise Tf skoraj ni mogoče opaziti, medtem ko je v reducirajočih pogojih (vzorec 2) zelo dobro vidna in to pri velikosti, ki ustreza Tf.

Glede na intenziteto lis Tf v ne-reducirajočih v primerjavi z reducirajočimi pogoji lahko sklepamo, kolikšen del Tf se je povezal s PLL, saj intenziteta lise predstavlja nepovezan Tf. Bolj kot je lisa intenzivna, manj Tf se je povežalo v konjugat in obratno. Pri razmerju Tf: PLL = 1: 0,1 (vzorca 5 in 6) vidimo, da je lisa Tf približno pol toliko intenzivna v ne-reducirajočih, kot v reducirajočih pogojih. To pomeni, da je približno polovica Tf ostala nepovezana. Pri razmerju Tf: PLL = 1: 0,2 (vzorca 3 in 4) je lisa v ne-reducirajočih pogojih opazno manj intenzivna kot v reducirajočih, s PLL pa sta se povezali približno dve tretjini Tf, ki na gelu nista več vidni. Pri enakem številu molov Tf in PLL (vzorca 1 in 2) vidimo, da lisa v ne-reducirajočih pogojih skoraj ni opazna, kar pomeni, da je večina Tf povezanega v konjugate s PLL. Do enakih zaključkov glede uspešnosti povezovanja smo prišli tudi z gelsko filtracijo (opisano pod točko 4.1.2).



Slika 34: NaDS-PAGE gel neočiščenih konjugatov Tf-PLL

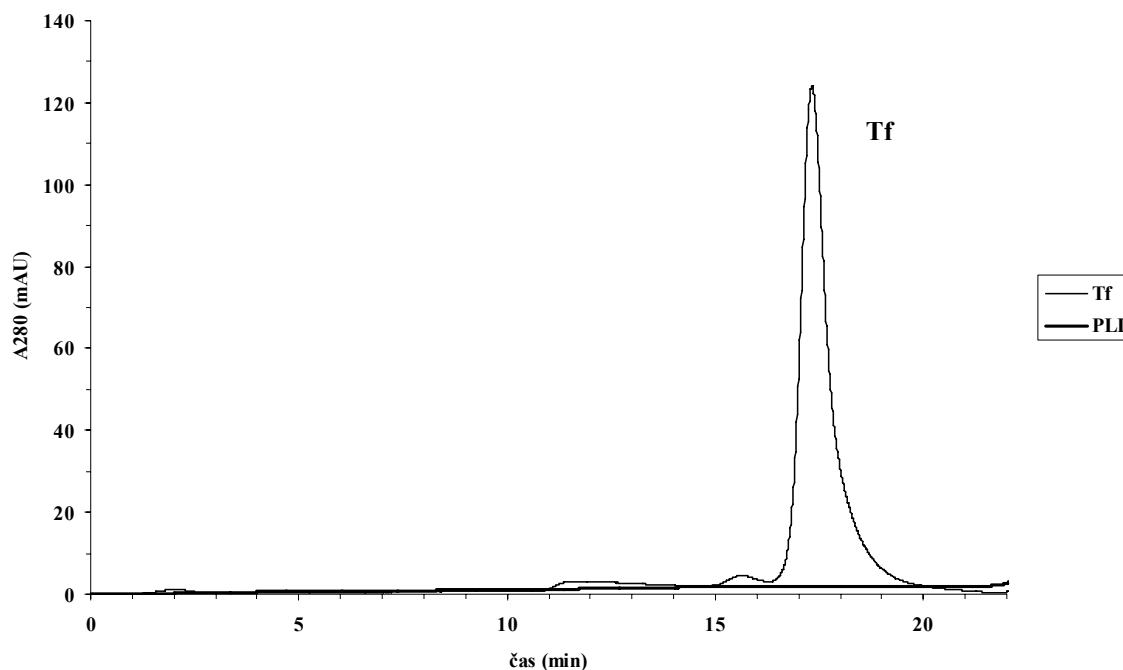
Konjugat med transferinom in poli-L-lizinom (Tf-PLL) smo pripravili z združevanjem Tf in PLL v treh različnih molarjih razmerjih, in sicer Tf: PLL = 1: 1 (vzorci 1 in 2) / 1: 0,2 (vzorci 3 in 4) / 1: 0,1 (vzorci 5 in 6), pri čemer je bila količina Tf v vseh primerih enaka (podrobno opisano pod točko 3.2.4.1 v poglavju Materiali in metode). Vsakega od treh vzorcev konjugatov Tf-PLL smo na gel nanesli v dveh različnih pogojih. V levi žepek (vzorci 1, 3 in 5) smo vsakokrat nanesli vzorec v ne-reducirajočih pogojih v 4-kratnem ne-reducirajočem NaDS nanašalnem pufru (sestava je opisana v preglednici 9), v desnega (vzorci 2, 4 in 6) pa v reducirajočih pogojih v 4-kratnem reducirajočem NaDS nanašalnem pufru (sestava je opisana v preglednici 9). Slednji pufer vsebuje 2-merkaptotetanol, ki prekine disulfidne vezi. Vzorca, označena z M, predstavljata velikostni standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus), na podlagi katerega smo določili približno velikost ostalih vzorcev, vzorec 7 pa je sam Tf za kontrolo.

4.1.2 Izolacija konjugata Tf-PLL

Pri sintezi konjugatov Tf-PLL so nastali naslednji stranski produkti: prost Tf, ki se ni povezal s PLL, prost PLL, ki se ni povezal s Tf in prosta piridin-2-tionska skupina, ki se je sprostila ob nastanku disulfidne vezi. Ker smo nadaljnje poskuse želeli opravljati s čistimi konjugati, smo jih morali izolirati. To smo storili z gelsko filtracijo na napravi HPLC. Pri tej metodi se molekule ločijo na osnovi njihove velikosti oziroma molekulske mase. Najprej kolono zapustijo velike molekule, sledijo jim manjše, in sicer po vrstnem redu glede na velikost (princip metode je podrobno opisan pod točko 3.2.4.2 v poglavju Materiali in metode).

Pufer za gelsko filtracijo je vseboval 1,5 M GndCl, saj smo ugotovili, da se ločevanja v nativnih pogojih ne da izvesti, ker pride do interakcij med PLL in stacionarno fazo kolone (ločevanje brez prisotnosti GndCl je prikazano v prilogi C). Ločevanje smo spremljali z merjenjem absorbance pri 280 nm, pri čemer smo zaznali le Tf, saj PLL ne vsebuje AK s funkcionalnimi skupinami, ki bi absorbirale pri tej valovni dolžini. Zelene frakcije smo zbrali avtomatsko, in sicer smo v programu določili, v katerem časovnem intervalu naj zbira vzorce.

Slika 35 prikazuje kromatogram separacije samega Tf in PLL. Kromatogram je namenjen kontroli ločevanja vzorcev Tf-PLL, saj je potrebno ugotoviti, kdaj kolono prepotuje sam Tf, da lahko sklepamo, kje v kromatogramu se nahajajo konjugati Tf-PLL. Pokazali smo, da zadrževalni čas Tf na koloni znaša 17,3 minute. PLL, pričakovano, ni opazen pri valovni dolžini 280 nm.

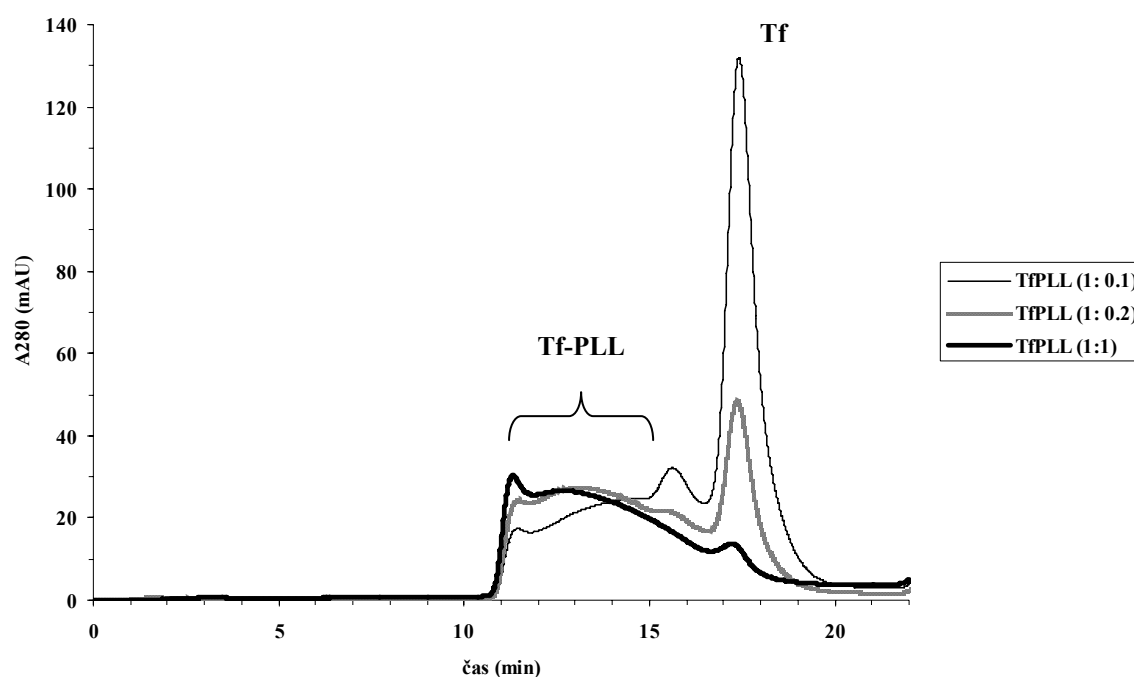


Slika 35: Gelska filtracija transferina in poli-L-lizina
Neprekinjena tanka črta predstavlja kromatogram separacije transferina (Tf), neprekinjena debela pa kromatogram separacije poli-L-lizina (PLL).

Slika 36 prikazuje kromatogram ločevanja kompleksov Tf-PLL. V postopku sinteze smo v zadnjem koraku združili s SPDP modificiran Tf in s SPDP modificiran ter naknadno reduciran PLL. Vzorce smo združili v 3 različnih molarnih razmerjih, in sicer $n(\text{Tf}):n(\text{PLL}) = 1:0,1/1:0,2$ in $1:1$, pri čemer je bilo število molov Tf vedno enako (podrobno opisano pod točko 3.2.4.1 v poglavju Materiali in metode).

Glede na sliko 35, iz katere lahko razberemo zadrževalni čas Tf z molsko maso 77 kDa, sklepamo, da se ob enakih pogojih ločevanja vrh Tf tudi na sliki 36 nahaja pri istem zadrževalnem času. Edina komponenta v vzorcu, ki absorbira pri valovni dolžini 280 nm je Tf. Zato vemo, da vrhovi, ki se nahajajo levo od Tf, predstavljajo molekule Tf, ki so povezane s PLL in imajo zato večjo molekulsko maso, kar pomeni hitrejše potovanje skozi kolono. Konjugati Tf-PLL se torej nahajajo levo od vrha Tf. Vidimo, da konjugati kolono prepotujejo v različnem času, saj ne dobimo enega samega ozkega vrha, temveč ločbo v obliki platoja. To je skladno z dejstvom, da je PLL mešanica različno dolgih polipeptidnih verig lizina z molsko maso od 70 do 150 kDa, poleg tega se je na molekulo PLL lahko vezalo različno število molekul Tf in obratno. Pri največjih konjugatih, ki kolono prepotujejo že po 11 minutah, lahko domnevamo, da je prišlo celo do premreženja molekul Tf in PLL v smislu povezave posameznih konjugatov med seboj.

Na kromatogramu je vidna odvisnost stehiometrije povezovanja konjugatov glede na molarno razmerje Tf in PLL. Ker je bila količina Tf v vseh treh primerih enaka, lahko ocenimo potek sinteze. V primeru razmerja Tf: PLL = 1: 0,1 vidimo pri zadrževalnem času 17,4 minut visok vrh, ki predstavlja prost Tf, ki se ni povezal s PLL. Vrh prostega Tf pri razmerju Tf: PLL = 1: 0,2 je že veliko nižji, pri razmerju 1: 1 pa je neznaten. Opazno je, da z nižanjem količine prostega Tf v reakcijski mešanici narašča površina, ki predstavlja konjugate Tf-PLL. Poleg tega se spreminja oblika platoja, ki se z višanjem količine PLL preveša na levo stran. To pomeni, da je v zmesi prisotnih vedno več konjugatov z višjimi molekulskimi masami.

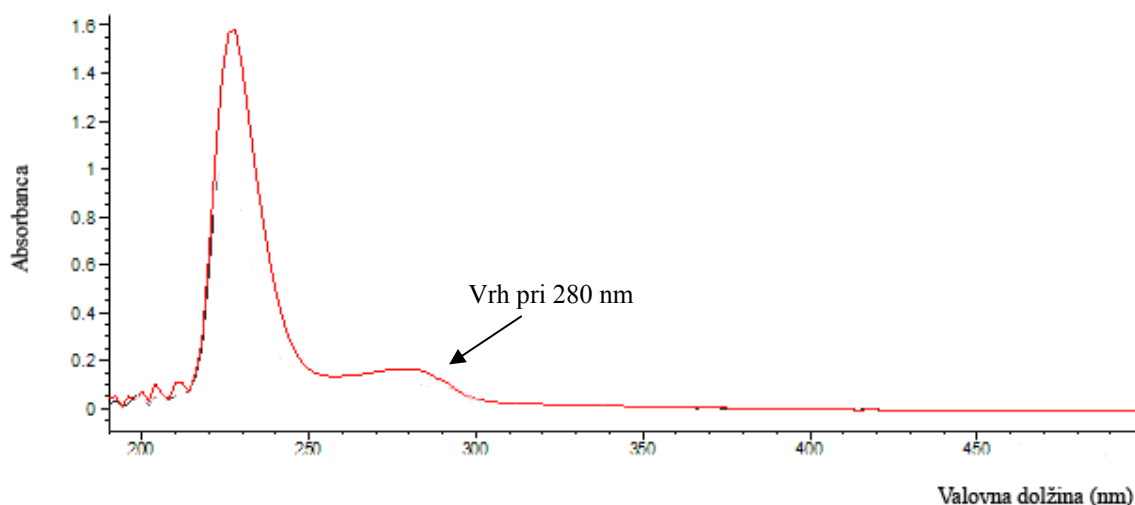


Slika 36: Gelska filtracija konjugata Tf-PLL

Aktiviran transferin (Tf) in poli-L-lizin (PLL) smo združili v različnih molarnih razmerjih, da bi ocenili stehiometrijo sinteze konjugata Tf-PLL. Količina Tf je bila v vseh treh vzorcih enaka, prilagajali pa smo količino dodanega PLL. Tanka neprekinjena črta predstavlja komplekse, kjer je bilo prisotnega desetkrat manj PLL kot Tf, srednje debela šrafirana črta predstavlja komplekse, kjer je bilo prisotnega petkrat manj PLL, debela neprekinjena črta pa predstavlja komplekse, kjer je bila količina PLL in Tf enaka. Na kromatogramu je vidna odvisnost stehiometrije povezovanja konjugatov glede na molarno razmerje Tf in PLL.

Po gelski filtraciji smo zbrali frakcije, ki so vsebovale Tf-PLL in so na sliki 36 označene z zavitim oklepajem. V programu smo nastavili časovno zbiranje frakcij v razmaku ene minute, in sicer smo zbirali od zadrževalnega časa 10,5 minut do 15 minut. Majhen vrh pri zadrževalnem času 15,5 minut smo izpustili, saj smo sklepali, da vsebuje di- oziroma tri-mere Tf (predstavljeno v prilogi C).

Po zadostnem številu izvedenih separacij smo združili vse frakcije, ki vsebujejo Tf-PLL, pri čemer smo uporabili vzorce vseh treh molarnih razmerij Tf proti PLL. Združene frakcije smo dializirali in skoncentrirali. Pridobili smo približno 120 µg konjugata Tf-PLL, preračunano glede na absorbanco Tf pri 280 nm. Vzorci so imeli ustrezen proteinski spekter (slika 37).



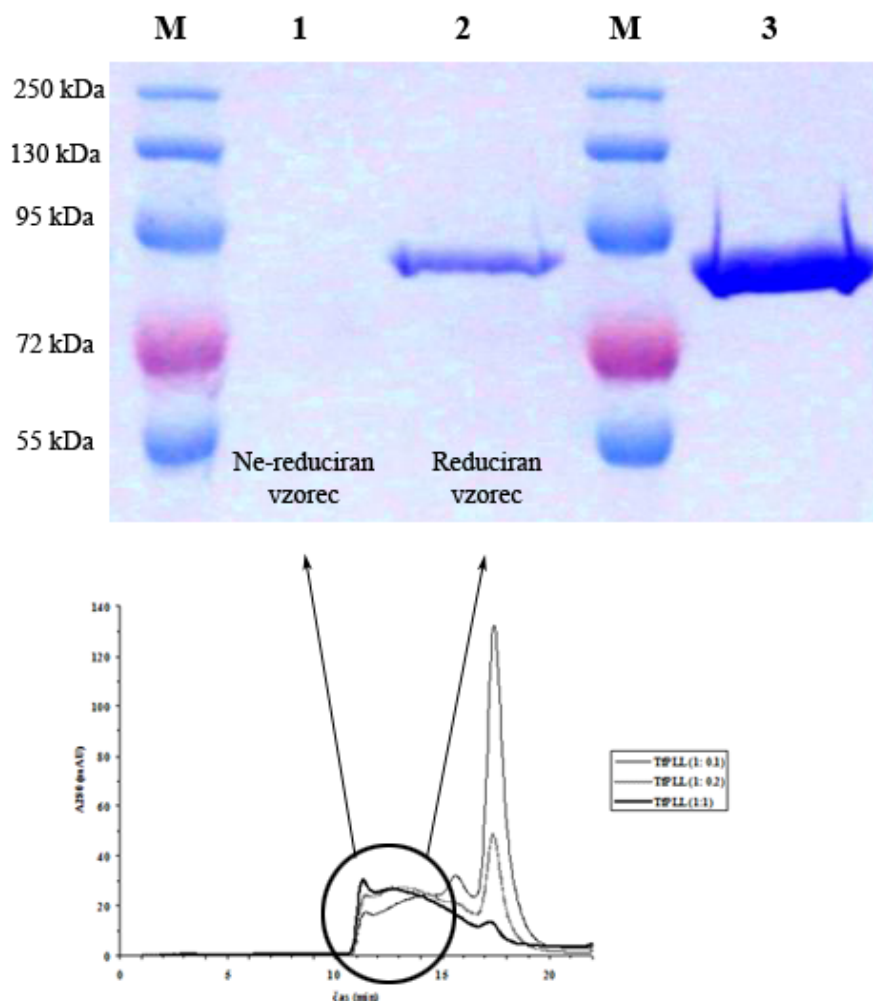
Slika 37: Proteinski spekter izoliranega konjugata Tf-PLL

Konjugat med transferinom in poli-L-lizinom (Tf-PLL) ima ustrezen proteinski spekter. Vrh pri valovni dolžini 280 nm je posledica prisotnosti transferina.

4.1.2.1 Preverjanje izolacije konjugata Tf-PLL z NaDS-PAGE

Po sintezi konjugata je v reakcijski mešanici ostal nepovezan Tf, PLL in piridin-2-tion. Nepovezan Tf je lepo viden (predvsem v vzorcih, kjer je bilo petkrat oziroma desetkrat manj PLL v primerjavi s Tf) na sliki 34, ki prikazuje NaDS-PAGE gel pred izolacijo z gelsko filtracijo. Z gelsko filtracijo smo se znebili prostega Tf in tako izolirali konjugate Tf-PLL. Ker smo tekom gelske filtracije le predvidevali, kateri vrh predstavlja katero komponento, je bilo zbrane frakcije potrebno preveriti z NaDS-PAGE. Kot smo že omenili je disulfidna vez med Tf in PLL občutljiva na redukcijska sredstva. Poleg tega konjugat Tf-PLL zaradi velike gostote pozitivnega naboja, ki je posledica prisotnosti PLL, in zaradi velike molekulske mase na potuje v gel, zato po barvanju z barvilom Coomassie Brilliant Blue lise niso vidne. V primeru dodatka redukcijskega sredstva (2-merkaptetanol) konjugat razpade in na gelu lahko opazimo liso Tf. Vsa navedena dejstva smo uporabili za nedvoumno dokazovanje konjugata.

Slika 38 prikazuje NaDS-PAGE gel zbranih frakcij, ki so obkrožene na kromatogramu gelske filtracije na spodnjem delu slike. Na gel smo nanesti približno 2 µg konjugata Tf-PLL in nekaj več prostega Tf. Vzorec 1 predstavlja komplekse Tf-PLL v ne-reducirajočih pogojih (pripravljeni v 4-kratnem ne-reducirajočem NaDS nanašalnem pufru, katerega sestava je opisana v preglednici 9). Ker na gelu ni vidne nobene lise, ni prostega Tf, saj je v celoti povezan s PLL in zato ne more potovati v gel. To pomeni, da je bila izolacija z gelsko filtracijo uspešna, saj smo se znebili nepovezanega Tf. Vzorec 2 predstavlja isti vzorec kompleksov Tf-PLL, vendar v reducirajočih pogojih v prisotnosti 2-merkaptetanola (pripravljeni v 4-kratnem reducirajočem NaDS nanašalnem pufru, katerega sestava je opisana v preglednici 9). 2-merkaptetanol povzroči razpad kompleksov Tf-PLL, zato Tf lahko potuje v gel, kar opazimo kot liso ustrezne velikosti. S tem smo dokazali, da smo z gelsko elektroforezo zbrali ustrezne frakcije in izolirali komplekse Tf-PLL.



Slika 38: NaDS-PAGE gel konjugatov Tf-PLL po izolaciji z gelsko filtracijo

Konjugate med transferinom in poli-L-lizinom (Tf-PLL) smo izolirali z gelsko filtracijo (spodnji del slike) in jih dokazali z NaDS-PAGE (zgornji del slike). Vzorec 3 je sam Tf, ki je namenjen kontroli ustrezne velikosti Tf v konjugatu. Vzorec 1 predstavlja združene konjugate Tf-PLL vseh treh ločevanj v ne-reducirajočih pogojih, vzorec 2 pa v reducirajočih pogojih. S črko M označena vzorca predstavljata velikostni standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus), na podlagi katerega smo določili približno velikost ostalih vzorcev.

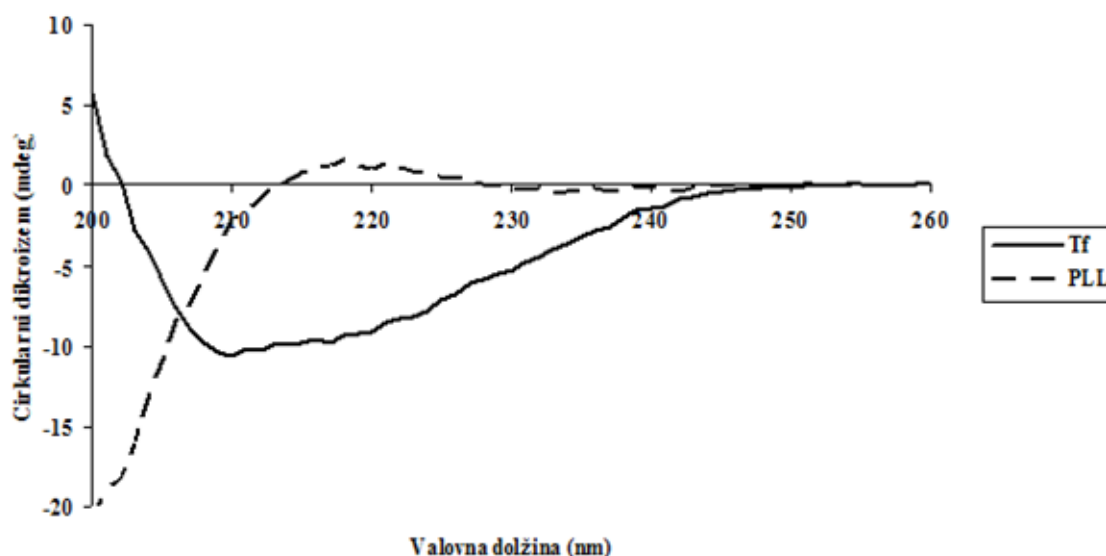
4.1.3 Preverjanje konformacije Tf

Ohranitev native strukture Tf v konjugatu Tf-PLL je bistvenega pomena za biološko aktivnost kompleksov. Ker smo v postopku izolacije z gelsko filtracijo uporabili pufer, ki vsebuje 1,5 M GndCl (sestava opisana v preglednici 6), smo se želeli prepričati, da pri teh pogojih ne pride do porušitja sekundarne strukture Tf. Sicer smo vzorce po gelski filtraciji dializirali, pri čemer bi v primeru, da se je v času izolacije Tf denaturiral, najverjetneje prišlo do renaturacije, smo vseeno želeli pokazati, da GndCl pri 1,5 M koncentraciji sploh ne povzroči denaturacije Tf.

4.1.3.1 Merjenje cirkularnega dikroizma Tf, PLL in konjugata Tf-PLL

Preden smo se lotili preiskovanja vpliva GndCl na sekundarno strukturo Tf smo pogledali, kakšna je sekundarna struktura samega Tf, PLL ter izoliranega in dializiranega konjugata Tf-PLL. Zato smo izmerili in primerjali CD spektre omenjenih vzorcev.

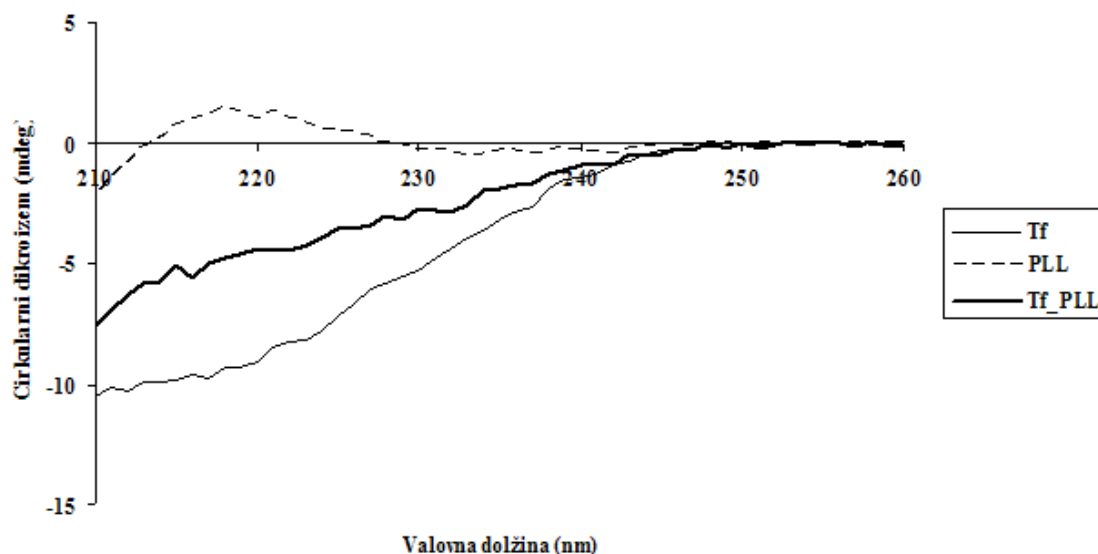
Na osnovi določene tridimenzionalne strukture 35 odstotkov sekundarne strukture Tf predstavlja alfa vijačnica, 17 odstotkov pa beta plošča. Ker je CD spekter seštevka alfa, beta in neurejene strukture, bi moral CD spekter Tf spominjati na alfa vijačnico (slika 29 v poglavju Materiali in metode), pomaknjeno navzgor in z delno zabrisanimi karakterističnimi vrhovi. Na sliki 39 je razvidno, da se CD spekter Tf ujema s pričakovanim. PLL je sintetični polimer različnega števila lizinskih ostankov, zato je pričakovati, da bo njegova struktura povsem neurejena. Na sliki 39 vidimo, da je CD spekter PLL dejansko zelo podoben tistemu, ki je značilen za neurejeno obliko (slika 29 v poglavju Materiali in metode).



Slika 39: Cirkularni dikroizem transferina in poli-L-lizina

CD spekter transferina (Tf) je označen z neprekinjeno črto, poli-L-lizina (PLL) pa s prekinjeno. CD spekter Tf spominja na alfa vijačnico, pomaknjeno navzgor in z delno zabrisanimi karakterističnimi vrhovi, CD spekter PLL pa je zelo podoben tistemu, ki je značilen za neurejeno obliko.

Slika 40 prikazuje CD izoliranega konjugata Tf-PLL, raztopljenega v dializnem pufru (sestava je opisana v preglednici 6) v koncentraciji 0,1 mg/ml glede na Tf. CD spekter je prikazan le v območju od valovne dolžine 210 nm do 260 nm, saj pri nižjih valovnih dolžinah dializni pufer moti meritev. Na tej sliki je prikazana primerjava CD spektrov konjugata v primerjavi s samim Tf in PLL, ki sta sicer že prikazana na sliki 39, vendar v celotnem območju valovnih dolžin. Vidimo, da je CD spekter konjugata Tf-PLL približen seštevku spektrov Tf in PLL, kar je bilo tudi pričakovati.



Slika 40: Cirkularni dikroizem konjugata Tf-PLL v primerjavi s samim Tf in PLL

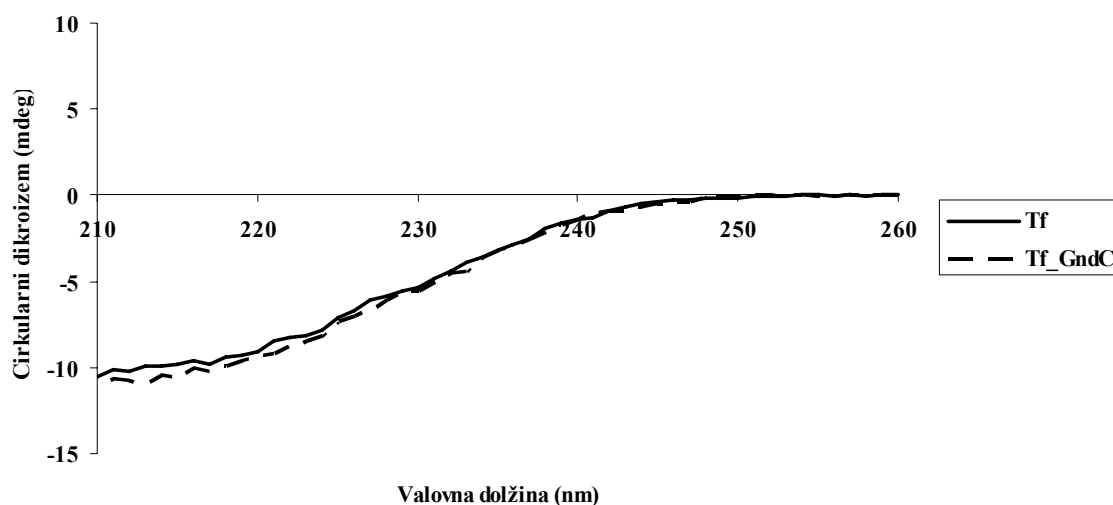
CD spekter transferina (Tf) je označen s tanko neprekinjeno črto, poli-L-lizina (PLL) s prekinjeno črto, konjugata med transferinom in poli-L-lizinom (Tf-PLL) pa z debelo neprekinjeno črto. CD spekter konjugata Tf-PLL je približen seštevek spektrov Tf in PLL.

4.1.3.2 Vpliv 1,5 M GndCl na sekundarno strukturo Tf

Da bi se prepričali, kakšen vpliv ima 1,5 M GndCl na sekundarno strukturo Tf, smo izmerili CD Tf in Tf z dodanim 1,5 M GndCl (brez dialize) ter s primerjavo spektrov ocenili vpliv prisotnosti denaturanta.

Slika 41 prikazuje CD spekter Tf in Tf z dodanim 1,5 M ultra-čistim GndCl. Spekter je posnet le pri valovnih dolžinah od 210 nm do 260 nm, saj je pri nižjih valovnih dolžinah topilo motilo meritev. Koncentracija vzorcev je bila v obeh primerih 0,1 mg/ml.

Ker se spektra na sliki 41 skoraj povsem prekrivata, lahko sklepamo, da je sekundarna struktura Tf enaka sekundarni strukturi Tf z dodanim 1,5 M GndCl. To pomeni, da se sekundarna struktura Tf pri pogojih izolacije ohranja.

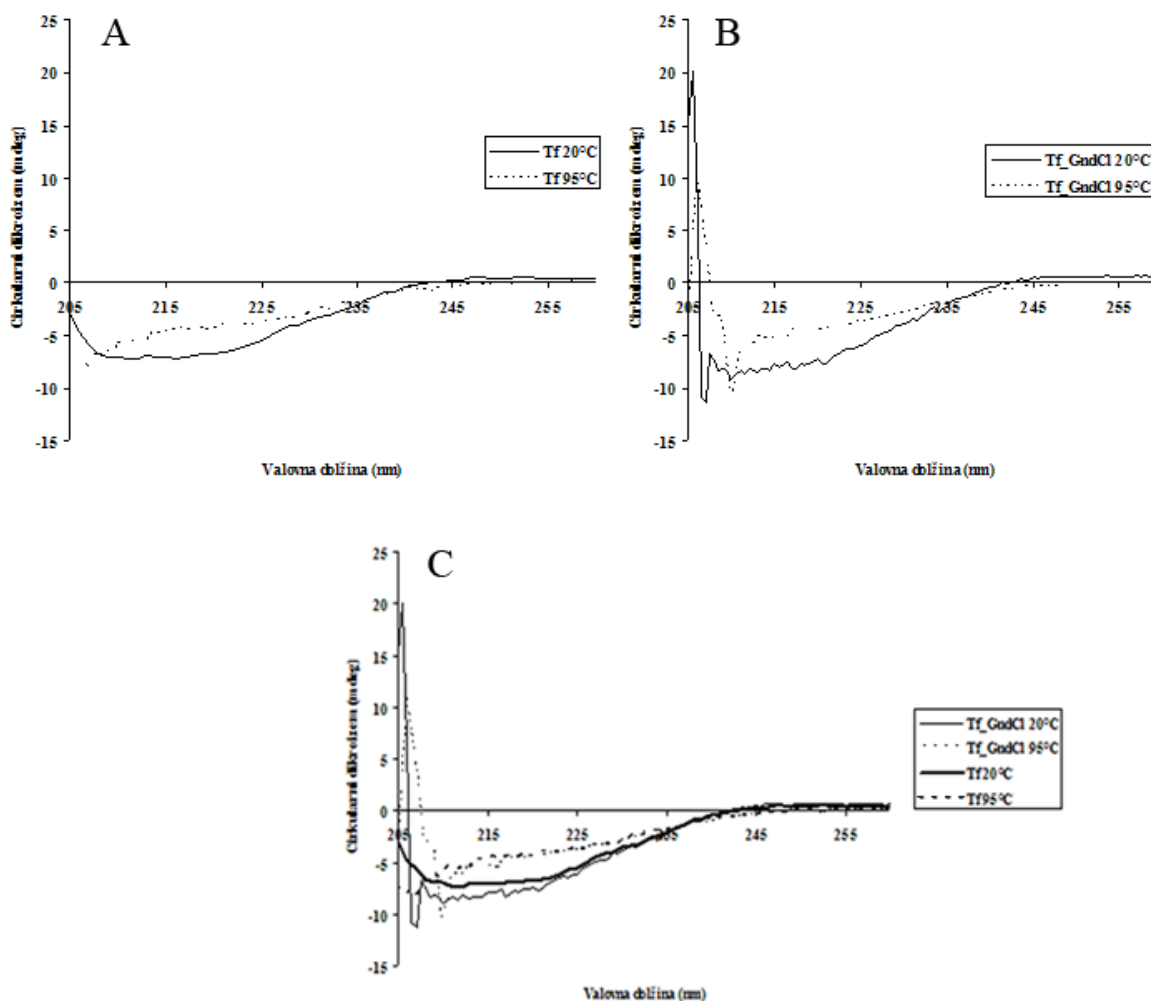


Slika 41: Cirkularni dikroizem transferina in transferina z dodanim 1,5 M GndCl
Neprekinjena črta prikazuje CD spekter transferina (Tf), prekinjena pa CD spekter Tf z dodanim 1,5 M GndCl. Spektra sta posneta pri valovni dolžini od 210 nm do 260 nm. Ker se skoraj povsem prekrivata, lahko sklepamo, da je sekundarna struktura Tf enaka sekundarni strukturi Tf z dodanim 1,5 M GndCl.

4.1.3.3 Toplotna denaturacija Tf in Tf z dodanim 1,5 M GndCl

Ker smo se želeli dodatno prepričati, da ne pride do denaturacije Tf z 1,5 M GndCl, smo izvedli še toplotno denaturacijo samega Tf in Tf z dodanim 1,5 M GndCl brez dialize in dogajanje spremljali z merjenjem CD. Če ni prišlo do denaturacije Tf ob dodatku GndCl, bi moral Tf ohraniti sekundarno strukturo, ki pa bi se porušila ob segrevanju do dovolj visoke temperature. Porušenje strukture bi se odražalo v premiku CD spektra navzgor (če opazujemo CD v odvisnosti od valovne dolžine pred in po toplotni denaturaciji), oziroma bi opazili prevoj (če opazujemo vrednost CD pri izbranih valovnih dolžinah, v odvisnosti od temperature).

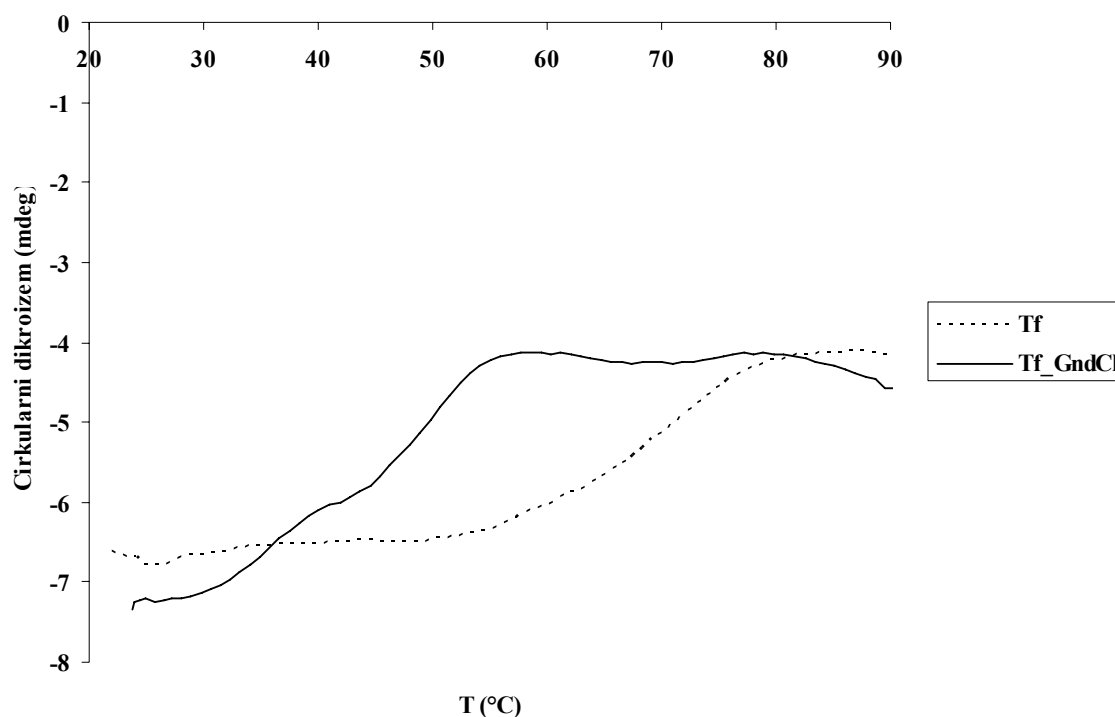
Slika 42 prikazuje primerjavo Tf (A) in Tf z dodanim 1,5 M GndCl (B) pred toplotno denaturacijo in po njej. Vidimo, da tako pri vzorcu Tf, kot vzorcu Tf z dodanim GndCl pride do premika krivulje navzgor, kar pomeni porušenje sekundarne strukture. Zato lahko sklepamo, da sam 1,5 GndCl ni porušil sekundarne strukture Tf, saj se je ta porušila šele po segretju na 95 °C. Na sliki C sta grafa A in B združena, kar omogoča lažjo primerjavo spektrov. Lahko opazimo, da sta bila spektra obeh vzorcev pred in po toplotni denaturaciji glede na obliko skoraj povsem enaka, kar pomeni, da je prišlo do podobnega porušanja sekundarne strukture. To še dodatno potrjuje, da GndCl ni povzročil denaturacije Tf.



Slika 42: Cirkularni dikroizem transferina in Tf z dodanim 1,5 M GndCl v odvisnosti od valovne dolžine pred in po toplotni denaturaciji

A: Prikaz CD spektra transferina (Tf) pred toplotno denaturacijo (neprekinjena črta) in po njej (prekinjena črta). B: CD spekter Tf z dodanim 1,5 M GndCl pred toplotno denaturacijo (neprekinjena črta) in po njej (prekinjena črta). C: Združeni slik A in B za lažjo vizualno primerjavo. Tako pri vzorcu Tf kot vzorcu Tf z dodanim GndCl pride do premika krivulje navzgor, kar pomeni porušenje sekundarne strukture.

Slika 43 prikazuje spremembo CD v odvisnosti od temperature za vzorec Tf in Tf z dodanim GndCl. S tem poskusom smo dokončno potrdili, da 1,5 M GndCl ne povzroči denaturacije Tf, saj je v obeh primerih viden prevoj, ki predstavlja prehod iz nativne v denaturirano obliko Tf. Če bi GndCl povzročil denaturacijo Tf, prevoja ne bi bilo, saj bi bila sekundarna struktura že porušena. Viden je premik k nižji temperaturi zaradi destabilizacije Tf ob dodatku GndCl.



Slika 43: Sprememba cirkularnega dikroizma transferina in Tf z dodanim 1,5 M GndCl v odvisnosti od temperature

Toplotna denaturacija transferina (Tf) je prikazana s prekinjeno črto, Tf z dodanim GndCl pa z neprekinjeno. Vrednost CD je povprečje vrednosti pri 215 nm in 222 nm. V obeh primerih je viden prevoj, ki predstavlja prehod iz nativne v denaturirano obliko Tf.

Z gelsko filtracijo smo izolirali komplekse Tf-PLL z ustrezno čistostjo. Z merjenjem CD spektrov smo pokazali, da v postopku izolacije ni prišlo do opaznih sprememb v strukturi Tf, kar je pomembno za funkcionalnost kompleksov in njihovo biološko aktivnost.

4.2 PRIPRAVA KOMPLEKSOV MED KONJUGATOM TF-PLL IN NUKLEINSKIMI KISLINAMI

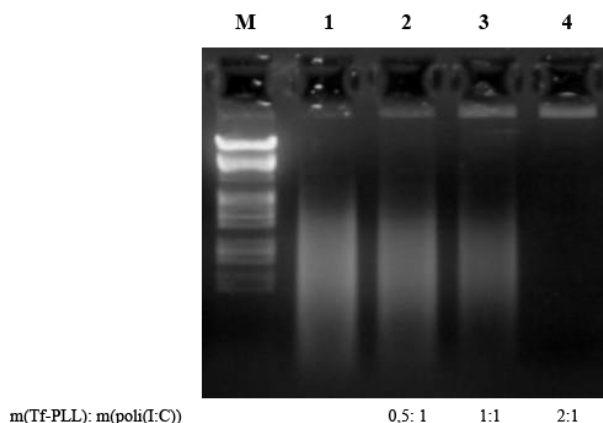
INK so polianionske molekule, zato smo pričakovali, da se bodo preko elektrostatskih interakcij vezale na pozitivno nabit PLL iz konjugata. Sposobnost vezave in ustrezno masno razmerje konjugata Tf-PLL glede na nukleinske kisline smo preverjali z metodo zmanjšane mobilnosti na agaroznem gelu.

4.2.1 Preverjanje tvorjenja kompleksov Tf-PLL in nukleinskih kislin

Ob tvorbi kompleksov pride do nevtralizacije negativnih nabojev nukleinskih kislin s pozitivnimi naboji PLL v konjugatu. Zato se potovanje nukleinskih kislin na agaroznem gelu upočasni, kar se odraža v zamiku lise na agaroznem gelu.

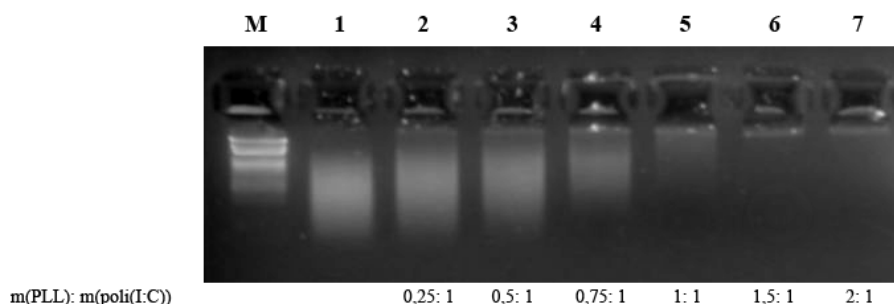
Poskus smo izvedli tako, da smo konstantni masi poli(I:C) (0,25 µg) dodali različne količine konjugata Tf-PLL oziroma samega PLL. Količine smo prilagodili tako, da so masna razmerja med Tf-PLL in poli(I:C) znašala od 0,5 do 2 oziroma od 0,25 do 2 v primeru PLL.

Slika 44 prikazuje agarozni gel zmanjšane mobilnosti poli(I:C) v kompleksih s Tf-PLL. Vidimo, da mobilnost kompleksov Tf-PLL/poli(I:C) postopno pada z večanjem količine konjugata Tf-PLL, saj so lise poli(I:C) v gelu vedno manj intenzivne, obenem pa lahko opazimo komplekse, ki ne potujejo v gel in so ostali v žepkih. Pri masnem razmerju 0,25 µg poli(I:C) in 0,5 µg Tf-PLL pride do popolne zaustavitve gibanja na gelu, kar pomeni, da je negativni naboj poli(I:C) nevtraliziran s pozitivnim nabojem PLL iz konjugata.



Slika 44: Agarozni gel zmanjšane mobilnosti poli(I:C) v kompleksih Tf-PLL/poli(I:C). Mobilnost kompleksov med konjugatom transferina in poli-L-lizina (Tf-PLL) ter poli(I:C) postopno pada z večanjem količine konjugata Tf-PLL. Vzorec 1 je sama poli(I:C) (0,25 µg), vzorci 2, 3 in 4 pa predstavljajo poli(I:C) v kompleksih z 0,125; 0,25 in 0,5 µg Tf-PLL. Vzorec M predstavlja velikostni standard λ DNK, rezane s *HindIII* in *EcoRI*.

Slika 45 prikazuje agarozni gel zmanjšane mobilnosti poli(I:C) v kompleksih s PLL. Mobilnost kompleksov PLL/poli(I:C), kot v zgornjem primeru, postopno pada z večanjem količine PLL. Pri masnem razmerju 0,25 μ g poli(I:C) in 0,375 μ g PLL pride do popolne zaustavitve gibanja na gelu, kar pomeni, da je negativen naboj poli(I:C) nevtraliziran s pozitivnim nabojem PLL.



Slika 45: Agarozni gel zmanjšane mobilnosti poli(I:C) v kompleksih PLL/poli(I:C). Mobilnost kompleksov med poli-L-lizinom (PLL) ter poli(I:C) postopno pada z večanjem količine PLL. Vzorec 1 je sama poli(I:C) (0,25 μ g), vzorci 2, 3, 4, 5, 6 in 7 pa predstavljajo poli(I:C) v kompleksih z 0,0625; 0,125; 0,25; 0,375 in 0,5 μ g PLL. Vzorec M predstavlja velikostni standard λ DNK, rezane s *Hind*III in *Eco*RI.

S tem testom smo dokončno dokazali, da smo z zbiranjem frakcij pri gelski filtraciji izolirali konjugate Tf-PLL. Z NaDS-PAGE smo namreč pokazali, da je v konjugatih prisoten Tf, z metodo zmanjšane mobilnosti na gelu pa smo dokazali prisotnost PLL. S tem testom smo pokazali tudi funkcionalnost konjugatov, saj so sposobni vezave nukleinskih kislin.

Poleg preverjanja funkcionalnosti konjugatov smo s tem testom določili tudi približno masno razmerje med Tf-PLL oziroma PLL in poli(I:C), ki smo ga uporabili pri nadaljnjem testiranju biološke aktivnosti. Razmerje smo približno določili tako, da smo ugotovili, pri katerem masnem razmerju pride do popolne zaustavitve potovanja na gelu za posamezni vzorec poli(I:C). Za konjugate Tf-PLL to razmerje znaša 2: 1, za PLL pa 1,5: 1.

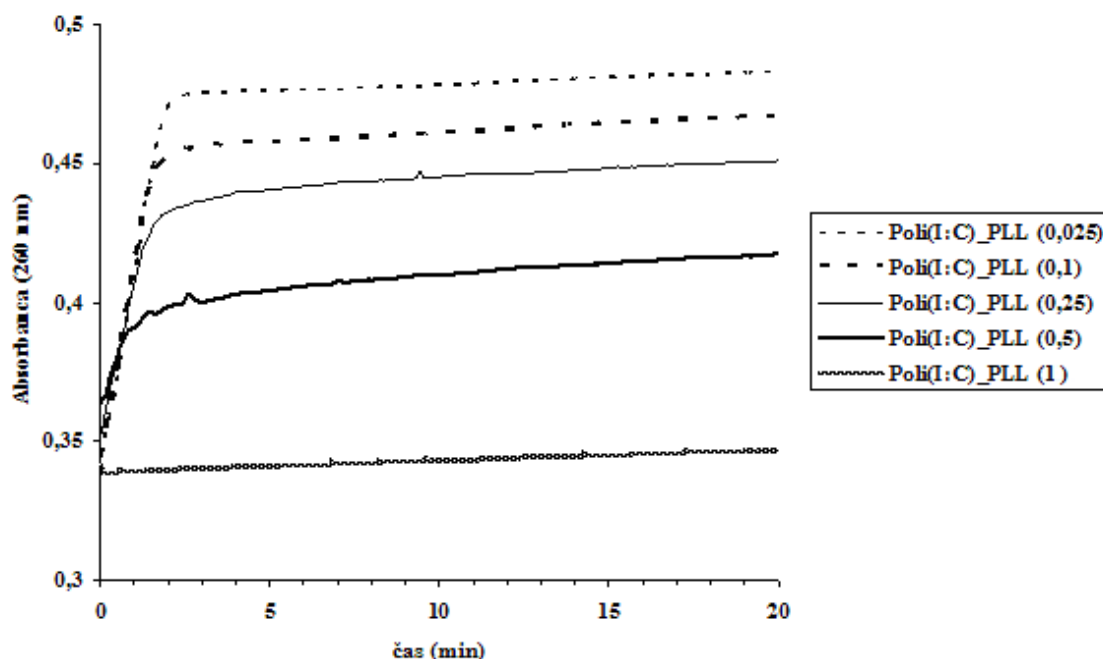
4.3 STABILNOST POLI(I:C) V KOMPLEKSIH

Nukleinske kisline so občutljive na razgradnjo z DNK in RNK nukleazami, ki so prisotne tako v serumu kot v celicah. Poli(I:C) je dvRNK molekula, zato je občutljiva na razgradnjo z RNazami, ki so zelo stabilni in povsod prisotni encimi. Zato smo želeli dokazati, da konjugat Tf-PLL omogoča zaščito poli(I:C) pred razgradnjo in na ta način poveča njeno stabilnost.

4.3.1 Spektrofotometrično spremljanje encimske razgradnje poli(I:C) v kompleksih

Da bi preverili, ali konjugat Tf-PLL poveča stabilnost poli(I:C), smo naredili poenostavljen model, kjer smo uporabili zgolj PLL, ki je komponenta konjugata, ki veže nukleinske kisline in potencialno pripomore k njihovi stabilnosti. Skušali smo dokazati, da PLL v kompleksu s poli(I:C) prepreči razgradnjo nukleinskih kislin z RNazo. Pri razgradnji dvoverižnih nukleinskih kislin pride do tako imenovanega hiperkromnega efekta. Nukleotidi, ki se tekom razgradnje sproščajo v raztopino, močneje absorbirajo svetlobo pri 260 nm kot v polimeru, v katerem se baze prekrivajo, in je njihova absorbanca zato nižja. Zato smo razgradnjo poli(I:C) lahko spremljali spektrofotometrično.

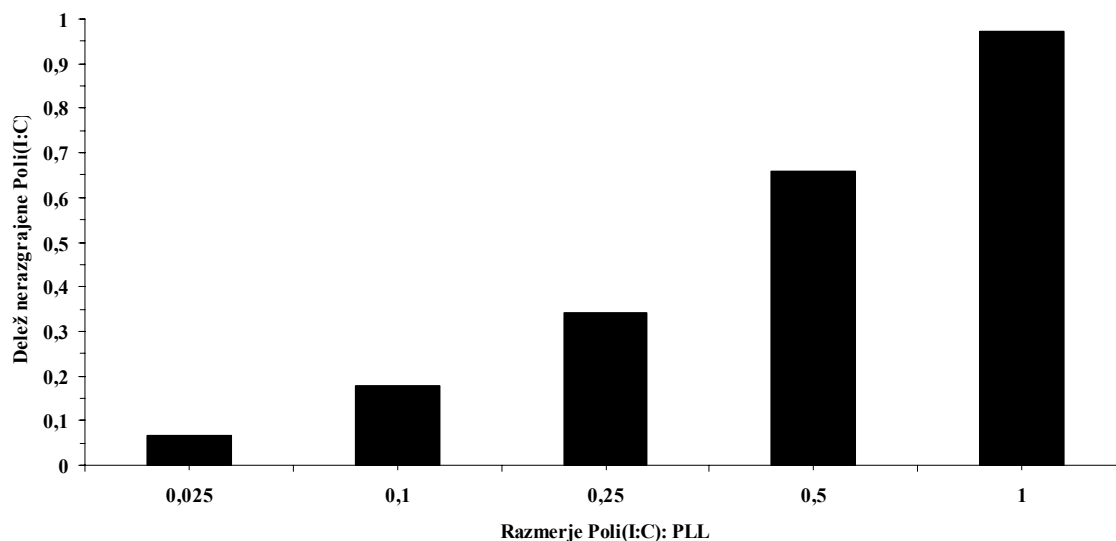
Slika 46 prikazuje 20 minutni potek razgrajevanja PLL/poli(I:C) z RNazo ONE (Promega). Raztopini poli(I:C) smo dodali različno količino PLL, ki je ustrezala različnim masnim razmerjem poli(I:C): PLL, in sicer 1: 0,025; 1: 0,1; 1: 0,25; 1: 0,5 in 1: 1. Ko masa PLL predstavlja le 2,5 odstotka mase poli(I:C) (tanka prekinjena črta), vidimo, da že po manj kot treh minutah pride do popolne razgradnje poli(I:C). Z naraščanjem količine PLL enakomerno narašča količina nerazgrajene poli(I:C), kar lahko opazujemo z nižanjem nivoja platoja, kjer se absorbanca ustali. Ko masa PLL predstavlja 50 odstotkov mase poli(I:C) (debela neprekinjena črta) vidimo, da je približno pol RNK ostalo nerazgrajeno. Pri enaki masi poli(I:C) in PLL (debela šrafirana črta) je vsa RNK ostala nerazgrajena, saj se absorbanca v 20 minutah skoraj ni zvišala. To pomeni, da PLL uspešno zaščiti poli(I:C) pred razgradnjo z RNazo, in sicer v odvisnosti od masnega razmerja med poli(I:C) in PLL. Ko je v kompleksih prisotna dovolj velika količina polikationa (masno razmerje 1: 1), se nanj veže vsa RNK, ki je zato zaščitena pred encimsko razgradnjo. V vseh ostalih vzorcih je količina PLL premajhna, da bi imela kapaciteto vezave vse RNK, zato zaščitena ostane le RNK, ki se je povezala s polikationom. Mehanizem zaščite pred razgradnjo verjetno temelji na strukturi poli(I:C), ki je v kompleksih najbrž bolj kompaktno zvita in zato za RNazo nedostopna, saj pride do steričnega oviranja.



Slika 46: Zaščita razgradnje RNK ob dodatku poli-L-lizina v različnih stehiometričnih razmerjih

Tanka prekinjena črta predstavlja graf razgradnje poli(I:C) v kompleksih z 2,5-odstotnim masnim deležem poli-L-lizina (PLL) glede na maso poli(I:C), debela prekinjena z 10-odstotnim deležem, tanka neprekinjena s 25-odstotnim deležem, debela neprekinjena s 50-odstotnim deležem in šrafirana debela s 100-odstotnim deležem. V prvih štirih vzorcih vidimo, da je razgradnja z RNazo zelo hitra, saj se manj kot v treh minutah razgradi vsa prosta poli(I:C). Pri razmerju 1: 1 ne pride do razgradnje poli(I:C), saj je kapaciteta PLL dovolj velika, da veže in s tem zaščiti vso RNK. PLL torej omogoča uspešno zaščito poli(I:C) pred razgradnjo z RNazo, in sicer v odvisnosti od masnega razmerja med poli(I:C) in PLL.

Na sliki 47 smo s histogramom prikazali delež nerazgrajene poli(I:C) v odvisnosti od masnega razmerja med poli(I:C) in PLL. Rezultate smo izračunali na podlagi podatkov iz slike 46, in sicer smo primerjali absorbance posameznih vzorcev pri valovni dolžini 260 nm, ko je bil že dosežen plato ter tako določili delež nerazgrajene poli(I:C) (višja kot je absorbanca, več je razgrajene poli(I:C)). Vidimo, da delež nerazgrajene RNK narašča z večanjem količine PLL. Pri masnem razmerju 1: 1 je poli(I:C) skoraj v celoti zaščiten pred razgradnjo z RNazo. Z rezultati smo pokazali, da PLL iz konjugata Tf-PLL lahko zaščiti RNK pred razgradnjo in tako bistveno poveča njeno stabilnost, in sicer je najmanjše masno razmerje med poli(I:C) in PLL za učinkovito zaščito 1: 1. To je skladno tudi z rezultati zmanjšane mobilnosti na gelu (slika 45), kjer vidimo, da pri tem masnem razmerju kompleksi skoraj več ne potujejo v gel, saj je skoraj celotna poli(I:C) povezana s PLL.



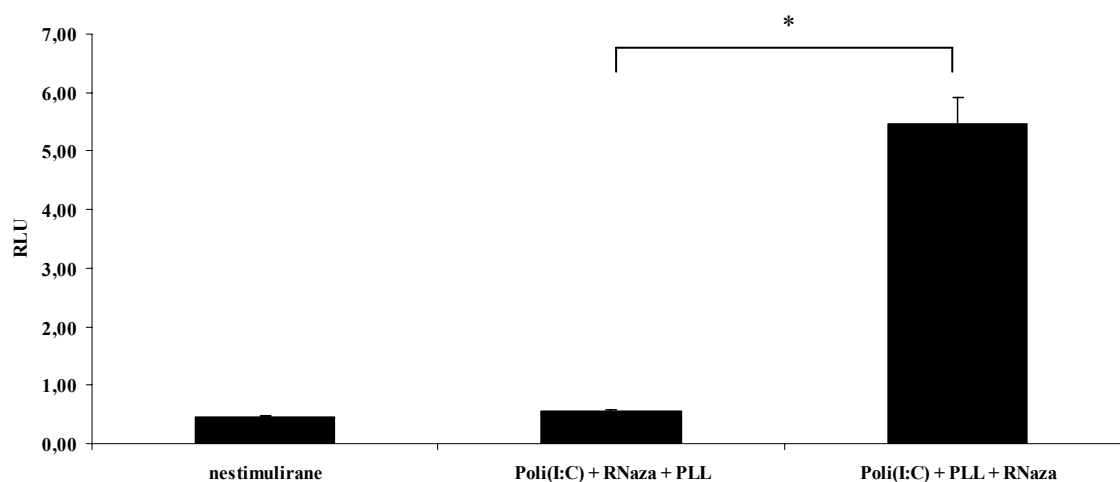
Slika 47: Delež nerazgrajene poli(I:C) v kompleksih s poli-L-lizinom v odvisnosti od masnega razmerja poli(I:C): PLL

Številka 0,025 pomeni, da masa poli-L-lizina (PLL) v kompleksih znaša 2,5-odstotka mase poli(I:C). Vidimo, da delež nerazgrajene RNK narašča z večanjem količine PLL in da pri masnem razmerju 1: 1 pride do skoraj popolne zaščite pred razgradnjo.

4.3.2 Biološka aktivnost poli(I:C) v kompleksih po delovanju RNaze

Da bi preverili ali ima zaščita poli(I:C) pred encimsko razgradnjo tudi biološki pomen, smo testirali sposobnost aktivacije receptorja TLR3 s samo poli(I:C) in poli(I:C) v kompleksih s PLL po inkubaciji z RNazo ONE. Predvidevali smo, da razgrajena poli(I:C) ne more aktivirati receptorja TLR3. Celice HEK293 smo transficirali s plazmidom, ki nosi zapis za človeški TLR3 ter z reporterskima plazmidoma phRL-TK in pIFN β -FLUC (plazmidi so opisani v preglednici 10), ki so omogočali spremljanje aktivacije TLR3.

Na sliki 48 vidimo, da sama poli(I:C) po 20 minutni inkubaciji z RNazo ne aktivira receptorja TLR3, saj je nivo aktivacije skoraj enak nestimuliranim celicam. To pomeni, da se je poli(I:C) razgradila. Nasprotno je poli(I:C) v kompleksih s PLL in po inkubaciji z RNazo vseeno biološko aktivna, saj je nivo aktivacije receptorja TLR3 več kot 10-krat višji od nestimuliranih celic. To potrjuje poskus iz točke 4.3.1, kjer smo pokazali da PLL zaščiti poli(I:C) pred razgradnjo, saj je le nerazgrajena dvRNK sposobna aktivacije receptorja.



* $P < 0,005$

Slika 48: Aktivacija receptorja TLR3 s poli(I:C) in poli(I:C) v kompleksih s poli-L-lizinom po inkubaciji z RNazo

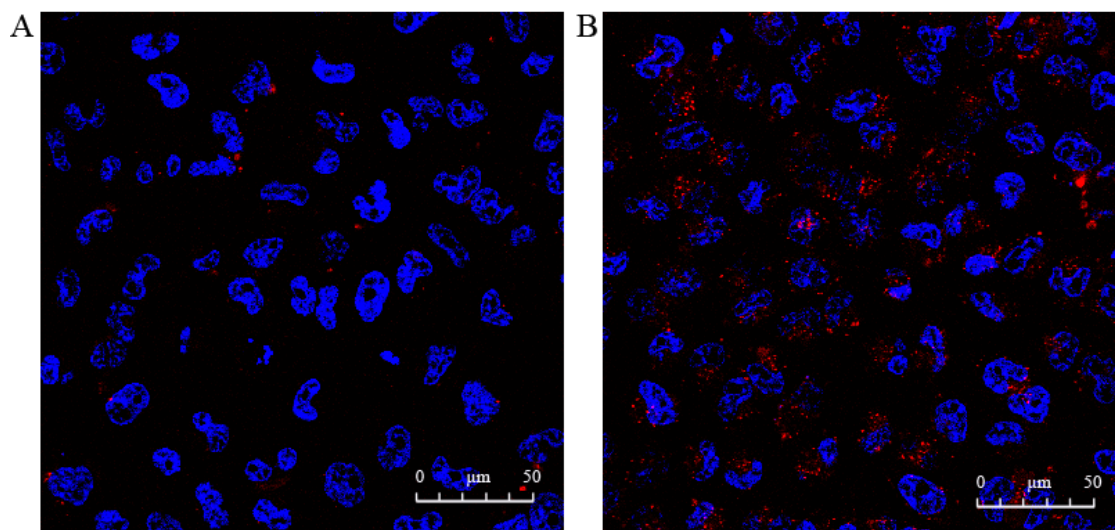
Prvi stolpec z leve predstavlja nestimulirane celice. Drugi stolpec predstavlja celice, stimulirane s poli(I:C), ki smo jo predinkubirali z RNazo in ji nato dodali poli-L-lizin (PLL). Tretji stolpec predstavlja celice, stimulirane s poli(I:C) v kompleksih s PLL in naknadno inkubacijo z RNazo. Vidimo, da PLL zaščiti poli(I:C) pred razgradnjo, saj je le nerazgrajena dvRNK sposobna aktivacije receptorja TLR3.

4.4 CELIČNI VNOS KOMPLEKSOV IMUNOSTIMULATORNIH NUKLEINSKIH KISLIN

Sposobnost celičnega vnosa INK, vezanih na konjugat Tf-PLL, smo opazovali s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo. Preverjali smo ali je modificiran Tf fiziološko aktiven oziroma sposoben vezave na TfR, kar omogoča receptorsko-posredovano endocitozo in s tem vnos v endosomalno pot. Kot INK smo uporabili CpG ODN 10104, označen s fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor 633 (Sigma Aldrich). Kot dokaz, da opazujemo celice v pravi ravnini in da bi se izognili artefaktom, smo z barvilom HOECHST 33285 (Invitrogen) pobarvali tudi jedra. Potek poskusa je podrobno predstavljen pod točko 3.2.8 poglavja Materiali in metode.

4.4.1 Primerjava celičnega vnosa ODN-Alexa 633 in Tf-PLL/ODN-Alexa 633

Slika 49 prikazuje primerjavo celičnega vnosa samega označenega ODN 10104 (A) in v kompleksih s Tf-PLL (B). Vzorca smo testirali na celicah HeLa, ki izražajo višji nivo TfR. Primerjavo smo naredili po 4 urah inkubacije, saj smo predvidevali, da bi morala biti v tem času vidna razlika hitrejšega in učinkovitejšega vnosa s konjugatom Tf-PLL v primerjavi s prostim ODN. Po 4 urah smo odstranili gojišče in celice temeljito sprali, da smo odstranili označeni ODN, ki se v tem času ni vnesel v celice. Modra barva na sliki predstavlja označena jedra, rdeče pike pa predstavljajo ODN 10104, označen s fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor 633, ki se je po 4 urah vnesel v celice. V primeru prostega ODN (A) je bil vnos po 4 urah zelo neučinkovit, saj je opaznih le nekaj rdečih pik. Nasprotno se je ODN v kompleksih s konjugatom Tf-PLL (B) po istem času zelo učinkovito vnesel v celice, saj so rdeče pike prisotne v velikem številu znotraj vseh posnetih celic.

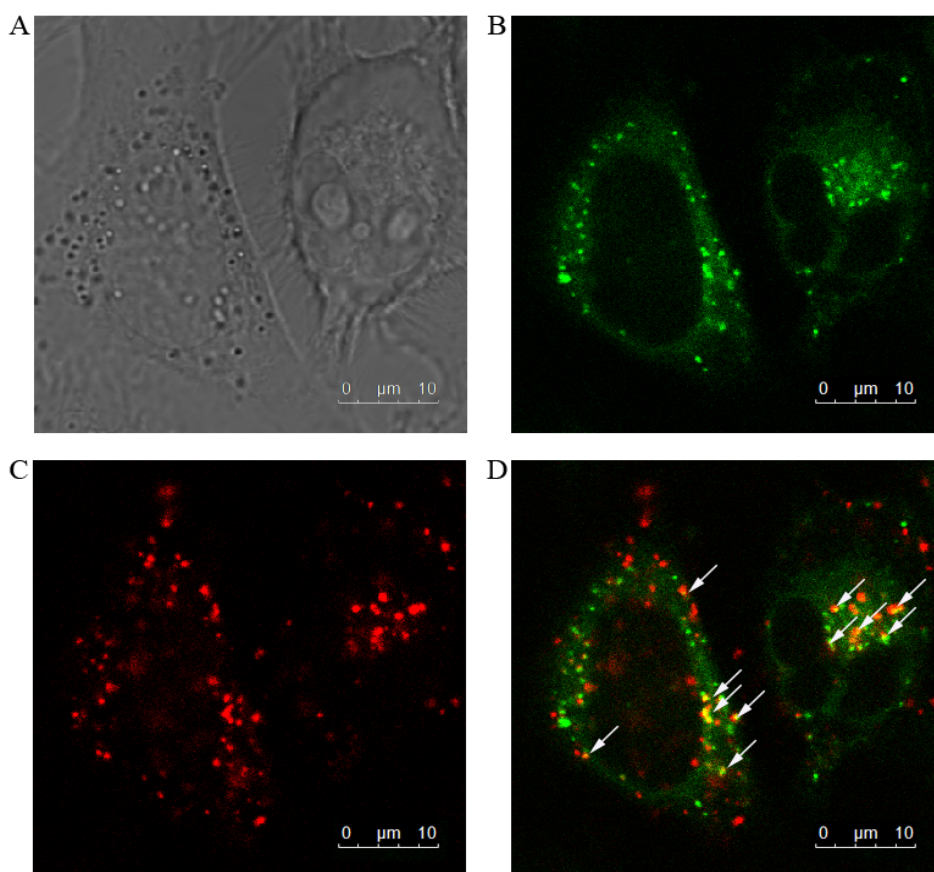


Slika 49: Primerjava celičnega vnosa prostega in s konjugatom Tf-PLL vezanega označenega ODN 10104. Slika je posneta s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo celic HeLa. ODN 10104 je označen s fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor 633 in je na sliki viden kot rdeča pika. Modra barva predstavlja jedra, pobarvana z barvilom HOECHST 33285. A: Po 4 urah vnesen prost ODN B: Po enakem času vnesen ODN v kompleksih s Tf-PLL. Razlika med količino vnesenega ODN je med slikama A in B zelo dobro vidna.

4.4.2 Kolokalizacija kompleksov Tf-PLL/ODN-Alexa 633 in lizosomov

Poleg primerjave vnosa prostega in s konjugatom Tf-PLL povezanega, označenega ODN, smo preverjali tudi kolokalizacijo kompleksov z barvilom za lizosome LysoTracker Green (Invitrogen). Kolokalizacija bi pomenila, da so se kompleksi specifično vnesli v endosomalno pot, kjer bi potencialno lahko aktivirali endosomalne receptorje TLR.

Slika 50 prikazuje 4 posnetke istih dveh celic HeLa s konfokalnim fluorescenčnim mikroskopom. Slika A prikazuje posnetek v svetlem polju. Na tej sliki so lepo vidne meje celic in jedro. Slika B prikazuje z barvilom LysoTracker Green pobarvane lizosome, ki so vidni kot zelene pike, jedra pri tem ostajajo neobarvana. Slika C prikazuje molekule ODN 10104, označene s fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor 633, ki so se v kompleksih s konjugati Tf-PLL po 4 urah uspešno vnesli v celice in so vidni kot rdeče pike. Na sliki D sta prekriti sliki B in C, zato lahko opazujemo kolokalizacijo, ki jo predstavljajo rumene pike, nastale ob prekrivanju zelenih (lizosomi) in rdečih (ODN) pik. Vidimo, da je prišlo do kar nekaj kolokalizacij, ki so na sliki označene s puščicami. To pomeni, da konjugati Tf-PLL omogočajo učinkovit vnos INK v endosomalno pot.



Slika 50: Kolokalizacija CpG ODN 10104 in lizosomov

Slika prikazuje 4 posnetke istih dveh celic HeLa s konfokalnim fluorescenčnim mikroskopom. A: Posnetek v svetlem polju. B: Lizosomi, pobarvani z barvilom LysoTracker Green (zelene pike). C: CpG ODN, označen s fluorescenčnim barvilom AlexaFluor 633 (rdeče pike). D: Prekriti sliki A in B, kjer rumene pike pomenijo kolokalizacijo ODN 10104 in lizosomov. Konjugati Tf-PLL omogočajo učinkovit vnos INK v endosomalno pot.

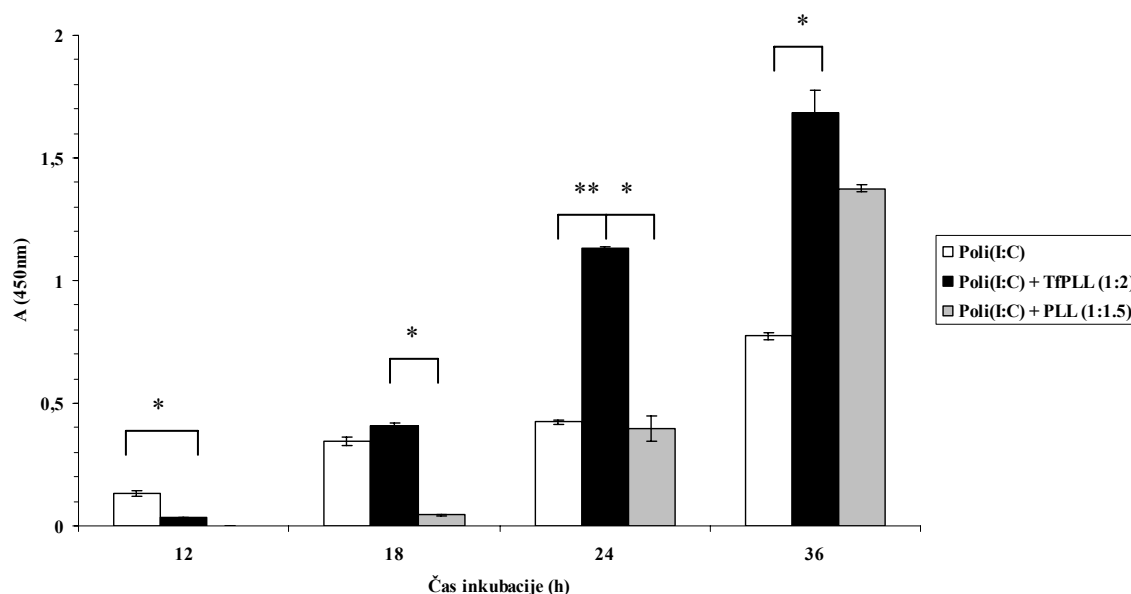
4.5 BIOLOŠKA AKTIVNOST KOMPLEKSOV

Konjugat Tf-PLL je namenjen vezavi, stabilizaciji in učinkovitemu vnosu INK v endosomalno pot. Ko so kompleksi v celici, začnejo postopno razpadati, kar vodi do sproščanja INK, ki nato aktivirajo endosomalne receptorje TLR. Aktivacijo imunskega sistema smo preučevali na kompleksih Tf-PLL/poli(I:C), ki aktivirajo receptor TLR3, kar vodi do proizvodnje IL-6 v celicah HMVEC-dLy Ad.

4.5.1 Časovno spremljanje aktivacije imunskega odziva po stimulaciji primarne celične linije s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C)

Slika 51 prikazuje časovni potek aktivacije imunskega odziva s samo poli(I:C) (beli stolpci), v kompleksih s Tf-PLL (črni stolpci) in v kompleksih s samim PLL (sivi stolpci). Masno razmerje med poli(I:C) in Tf-PLL oziroma PLL smo približno določili na osnovi testa zmanjšane mobilnosti na gelu, in sicer smo uporabili razmerje, pri katerem pride do popolne zaustavitve gibanja (podrobno predstavljeno v točki 4.2.1). K poli(I:C) smo dodali 2-kratno maso konjugata Tf-PLL glede na poli(I:C) oziroma 1,5-kratno maso PLL. Vidimo, da po 12 urah stimulacije najmočnejši imunski odziv povzroči sama poli(I:C). Aktivacija s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) je zelo nizka, s PLL/poli(I:C) pa je sploh ni. Po 18 urah je odziv na samo poli(I:C) in na komplekse Tf-PLL/poli(I:C) skoraj enak, medtem ko PLL/poli(I:C) še vedno povzroči le neznatno aktivacijo. Po 24 urah je situacija povsem drugačna. Daleč najmočnejšo aktivacijo povzročijo kompleksi Tf-PLL/poli(I:C), in sicer je približno 2,5-krat višja od same poli(I:C). Poleg tega je nivo aktivacije s samo poli(I:C) in kompleksi PLL/poli(I:C) po 24 urah zelo primerljiv. Po 36 urah je situacija podobna tisti pri 24 urah. Še vedno najvišjo proizvodnjo IL-6 povzročijo kompleksi Tf-PLL/poli(I:C), sledijo pa jim kompleksi PLL/poli(I:C). Po 36 urah najslabšo aktivacijo povzroči sama poli(I:C).

Rezultate smo podrobno komentirali v točki 5.1.5 poglavja Razprava in Sklepi.



* $P < 0,05$ ** $P < 0,001$

Slika 51: Časovno spremljanje količine IL-6 v supernatantih celic HMVEC-dLy Ad po stimulaciji s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C)

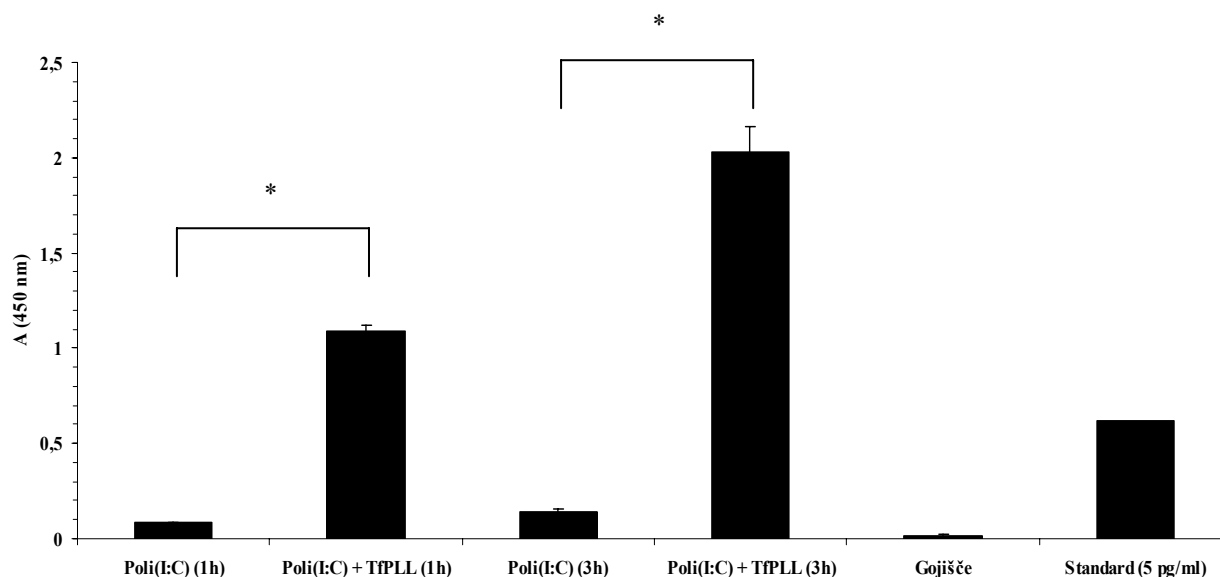
Količino IL-6 v supernatantih smo določili s testom ELISA. Supernatante smo zbirali 12, 18, 24 in 36 ur po stimulaciji. Bel stolpec predstavlja stimulacijo s samo poli(I:C). Črn stolpec predstavlja stimulacijo s poli(I:C) v kompleksih s konjugatom transferina in poli-L-lizina (Tf-PLL), pri čemer je masno razmerje med poli(I:C) in Tf-PLL znašalo 1: 2. Siv stolpec prikazuje stimulacijo s poli(I:C) v kompleksih s samim PLL, masno razmerje med poli(I:C) in PLL pa je znašalo 1: 1,5. Graf omogoča relativno primerjavo aktivacije receptorja TLR3 z različnimi vzorci.

4.5.2 Konjugat Tf-PLL omogoča učinkovit vnos poli(I:C) v primarno celično linijo ter aktivacijo imunskega odziva

V točki 4.4 smo s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo uspeli pokazati, da je vnos ODN 10104 s konjugatom Tf-PLL veliko bolj učinkovit od vnosa prostega ODN. Na tem mestu pa smo želeli potrditi in ovrednotiti biološki pomen učinkovitejšega vnosa poli(I:C) v celice HMVEC-dLy Ad.

Slika 52 prikazuje primerjavo uspešnosti aktivacije receptorja TLR3 s samo poli(I:C) in v kompleksih s Tf-PLL. Poskus smo izvedli tako, da smo celice HMVEC-dLy Ad stimulirali s samo poli(I:C) in v kompleksih s Tf-PLL, nato pa smo po 1 oziroma 3 urah odstranili gojišče in s tem vso poli(I:C), ki se v tem času ni vnesla v celice. Količino nastalega IL-6 smo po 36 urah stimulacije z vneseno poli(I:C) preverjali s testom ELISA. Pričakovali smo, da se sama poli(I:C) po 1 oziroma 3 urah ne vnese v celice, medtem ko v kompleksih s Tf-PLL pride do učinkovite receptorsko-posredovane endocitoze in posledičnega vnosa v znotrajcelične razdelke. Razlika bi morala biti vidna glede na aktivacijo receptorja TLR3 in posledično proizvodnjo IL-6. Naša pričakovanja potrjujejo rezultati na sliki 52. V primeru, ko smo odstranili gojišče po 1 uri, je aktivacija s samo poli(I:C) zelo šibka in skoraj enaka negativni kontroli (gojišče). To pomeni, da po 1 uri ne pride do vnosa proste poli(I:C) v celice. Nasprotno poli(I:C) v kompleksih s Tf-PLL že po 1 uri pride v celice in

omogoči močno aktivacijo (skoraj 13-krat višjo, kot v primeru proste poli(I:C)), kar potrjuje veliko učinkovitost vnosa s pripravljenimi konjugati. Ob odstranitvi gojišča po 3 urah je situacija zelo podobna, le da je v tem času prišlo v celice več proste poli(I:C) kot tudi poli(I:C) v kompleksih, kar je povzročilo močnejši imunski odziv. Razlika med aktivacijo s prosto poli(I:C) v primerjavi z vezano v kompleksih je po odstranitvi gojišča po 3 urah še višja (skoraj 15-kratna).



* $P < 0,05$

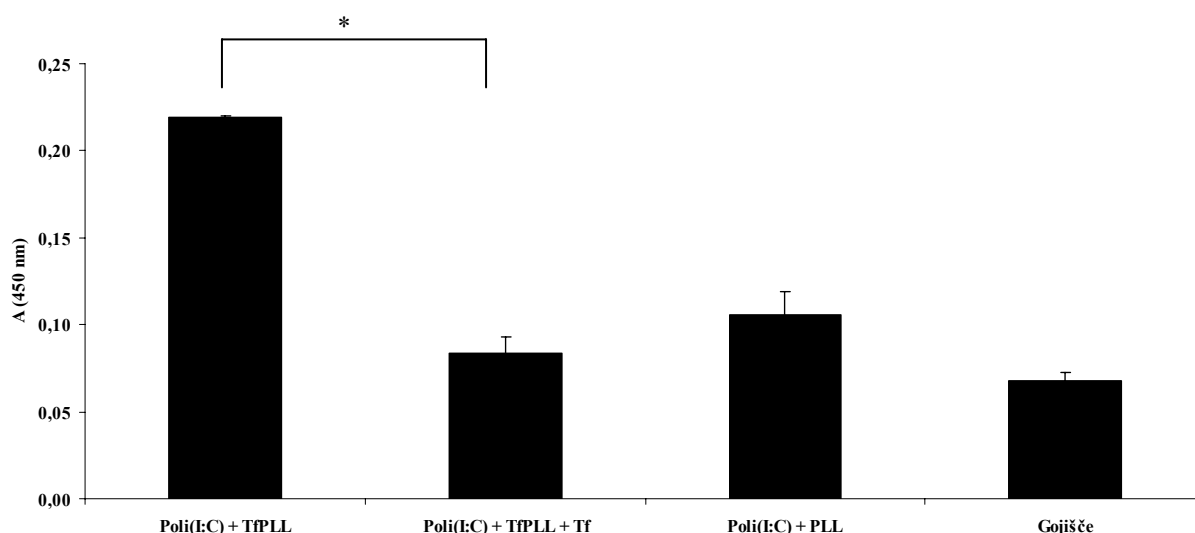
Slika 52: Količina IL-6 v supernatantih celic HMVEC-dLY Ad po stimulaciji s samo poli(I:C) oziroma v kompleksih s Tf-PLL ob odstranitvi gojišča

Količino IL-6 v supernatantih celic smo določili s testom ELISA. Po 1 oziroma 3 urah stimulacije celic smo odstranili gojišče in s tem poli(I:C), ki v tem času ni vstopila v celice. Supernatante vseh vzorcev smo zbrali 36 ur po stimulaciji celic. Kot negativno kontrolo smo uporabili supernatant gojišča celic, kot pozitivno pa standardno raztopino IL-6. Iz slike je razvidno, da konjugat med transferinom in poli-L-lizinom (Tf-PLL) omogoča učinkovit celični vnos poli(I:C).

4.5.3 Kompetitivna inhibicija s prostim Tf

Na koncu smo želeli ugotoviti ali je učinkovit vnos poli(I:C) s konjugati Tf-PLL res posledica preko Tf posredovane endocitoze. Izvedli smo test kompetitivne inhibicije vnosa kompleksov Tf-PLL/poli(I:C) s prostim Tf v 100-kratnem molarinem prebitku. Kot v točkah 4.5.1 in 4.5.2 smo spremljali odziv preko aktivacije receptorja TLR3. Količino IL-6 smo določili 24 ur po stimulaciji, saj smo predvidevali, da bi efekt po daljših časih izginil. Poleg tega je iz slike 51 razvidno, da pride kasneje do močne aktivacije tudi s kompleksi PLL/poli(I:C), medtem ko je po 24 urah aktivacija v kompleksih s Tf-PLL še vedno bistveno višja kot s PLL. Predvidevali smo, da bo prost Tf zasedel TfR, zato bo imel vnos preko Tf posredovane endocitoze slabši učinek, kar bi se odražalo v šibkejši aktivaciji receptorja TLR3.

Slika 53 potrjuje naša pričakovanja. Količina IL-6 v supernatantih celic HMVEC-dLy Ad po 24-urni stimulaciji s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) (1. stolpec) je skoraj 3-krat višja kot v primeru inhibicije enakega vzorca s prostim Tf (2. stolpec). Vidimo tudi, da je aktivacija s poli(I:C) v kompleksih s Tf-PLL in inhibiciji s prostim Tf podobno nizka kot v primeru s poli(I:C) v kompleksih s PLL (3. stolpec). To dokazuje pomen Tf za učinkovit celični vnos s kompleksi Tf-PLL.



* $P < 0,05$

Slika 53: Kompetitivna inhibicija vnosa kompleksov s prostim transferinom

S testom ELISA smo določili količino IL-6 v supernatantih celic HMVEC-dLy Ad po stimulaciji s poli(I:C) v kompleksih s konjugatom transferina in poli-L-lizina (Tf-PLL). Tekom stimulacije smo v vzorce dodali 100-kratni molarni prebitek prostega transferina (Tf), ki je s Tf iz konjugata Tf-PLL tekmoval za vezavo na TfR. Supernatante smo zbrali 24 ur po stimulaciji celic. Iz slike je razvidno, da inhibicija s prostim Tf zmanjša učinkovitost vnosa s Tf/TfR posredovano endocitozo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Določene nukleinske kisline imajo zaradi imunostimulativnih lastnosti velik terapevtski potencial. CpG ODN se uporabljajo kot adjuvansi v profilaktičnih in terapevtskih cepivih ter za zdravljenje rakastih obolenj (Klinman, 2004). Podoben terapevtski potencial ima sintetični analog dvRNK poli(I:C), agonist endosomalnega receptorja TLR3, ki sicer prepozna dvRNK, značilno za viruse (Seya in Matsumoto, 2009). Čeprav imajo INK številne obetavne lastnosti za uporabo v terapevtske namene, ki smo jih podrobno opisali pod točko 2.3 v poglavju pregled objav, obstajajo težave, ki omejujejo njihovo učinkovitost.

Ker so nukleinske kisline hidrofilni polianioni, slabo prehajajo celične membrane. Poleg tega se vežejo na serumske proteine, zato je njihov vstop v znotrajcelične razdelke manj učinkovit in posledično biološka aktivnost manjša. Receptor TLR3 aktivira dvRNK, mehanizem vstopa v organele, ki vsebujejo TLR3 pa zaenkrat ni poznan. Predvidevajo, da je za vnos dvRNK odgovorna s klatrini posredovana endocitoza (Johnsen in sod., 2006). V isti študiji so tudi pokazali, da pride do kolokalizacije Tf in dvRNK, kar je bistvenega pomena za delovanje sistema, ki smo ga razvili v raziskovalni nalogi, saj Tf omogoča vnos v ustrezne znotrajcelične razdelke. Za aktivacijo prirojenih in pridobljenih imunskih odzivov s poli(I:C) je torej potrebno najti ustrezen transportni sistem za usmerjanje v endosome, kjer se nahaja TLR3 (Matsumoto in Seya, 2008). Prav tako so pokazali, da je aktivacija receptorja TLR9 s CpG ODN odvisna od celičnega vnosa s klatrinsko posredovano endocitozo (Latz in sod., 2004). Dokaz enakega mehanizma vnosa dvRNK in CpG ODN je močno prekrivanje fluorescenčno označenih nukleinskih kislin v mDC (Johnsen in sod., 2006).

Nukleinske kisline so občutljive na razgradnjo z DNK in RNK nukleazami, ki so prisotne tako v serumu kot v celicah, zato je njihova učinkovitost lahko omejena. Še posebej to velja za poli(I:C), ki je dvRNK in zato občutljiva na razgradnjo z zelo stabilnimi in povsod prisotnimi RNazami.

Neposreden sistemski vnos prostih nukleinskih kislin v telo povzroči neenakomerno razporeditev v organih, in sicer se najvišje koncentracije pojavljajo v ledvicah, jetrih in vranici, kar ima lahko škodljive stranske učinke (Krieg, 2006).

Omenjene težave v zvezi z uporabo INK v terapevtske namene so nas spodbudile, da smo se v raziskovalnem delu osredotočili na razvoj načina tarčne dostave, stabilizacije, izboljšane vnosa in postopnega sproščanja INK, ki bodo učinkovito aktivirale prirojen in pridobljen imunski odziv. V ta namen smo pripravili konjugat Tf-PLL. Objavljenih je veliko poskusov povezave Tf in PLL kot sistema za dostavo DNK v genski terapiji (Citro in sod., 1992; Cotten in sod., 1993), o čemer smo podrobno govorili pod točko 2.4.4 v poglavju Pregled objav. Vnos genov v evkariontske celice s konjugatom Tf-PLL so celo

poimenovali »*transferinfekcija*« (Wagner in sod., 1990). Prav tako so za izboljšano učinkovitost imunostimulativnih učinkov CpG ODN že uporabili polikationske molekule, kot je PLGA in prišli do spodbudnih rezultatov (Xie in sod., 2005).

Povsem nova pa je ideja, ki smo jo razvijali in uspešno potrdili v tej diplomski nalogi. Pripravili smo konjugat Tf-PLL, ki je sposoben vezave INK in ima velik potencial premostitve težav, povezanih z uporabo INK v terapevtske namene.

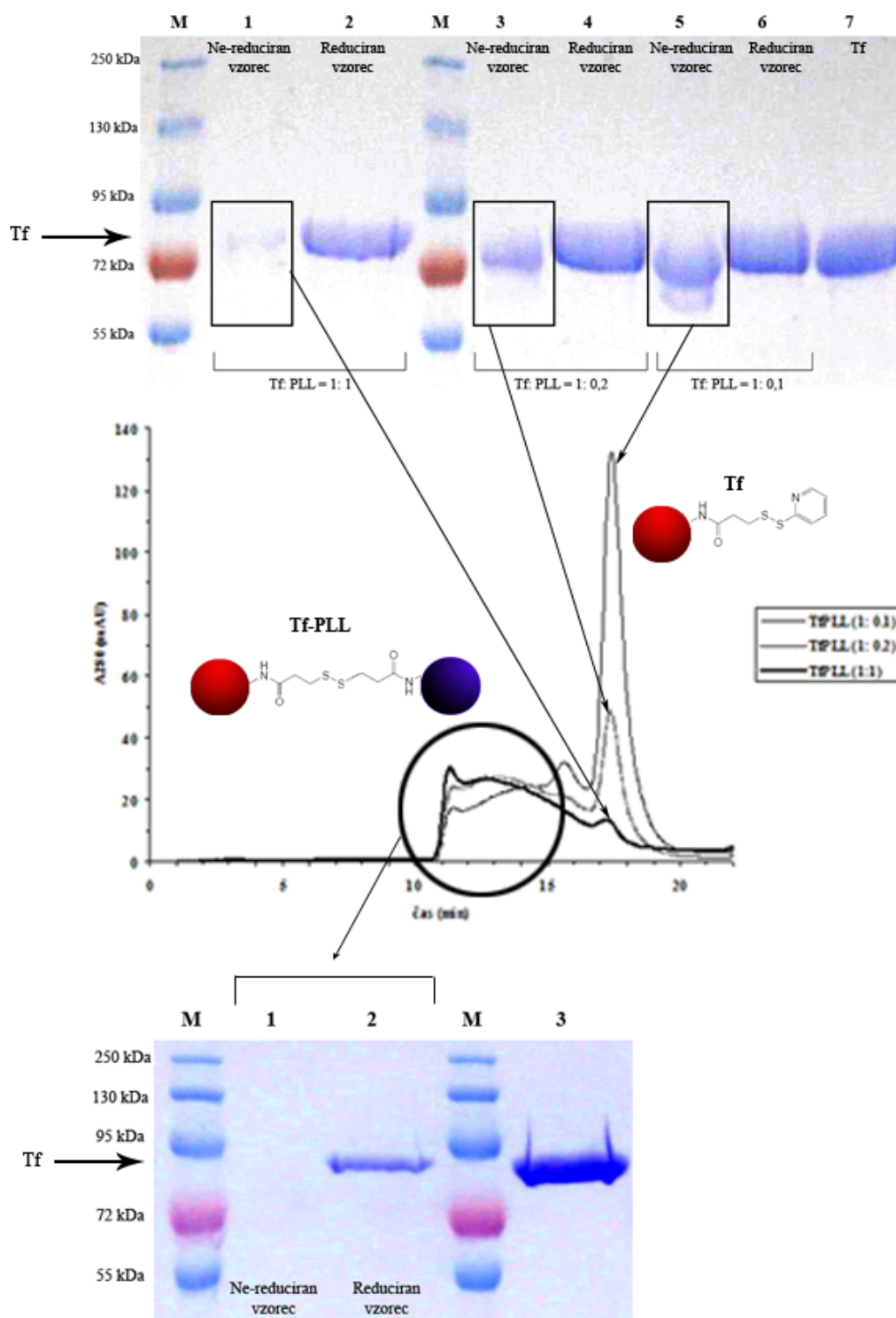
5.1.1 Priprava konjugata Tf-PLL

V diplomskem delu smo prikazali uspešno sintezo konjugata Tf-PLL. Pri pripravi smo se zgledovali po že vzpostavljenem protokolu (Wagner in sod., 1990).

V prvi stopnji smo s SPDP ločeno modificirali Tf in PLL. K Tf smo dodali 10-kratni molarni prebitek SPDP ter tako pridobili Tf, ki je imel v povprečju vgrajenih 7 piridilditiolnih linkerjev. Wagner in sod. (1990) so uporabili le 2-kratni prebitek SPDP v primerjavi s Tf in tako pridobili Tf, ki je imel v povprečju vgrajena 2 piridilditiolna linkerja. Za konjugacijo smo uporabili PLL s povprečno dolžino 859 AK in ga modificirali z 20-kratnim molarnim prebitkom SPDP, ter tako pridobili PLL, ki je imel v povprečju vgrajenih 16 piridilditiolnih linkerjev. Wagner in sod. (1990) so uporabili PLL različnih povprečnih dolžin in sicer 90, 270 in 450 AK in jih s SPDP modificirali tako, da je bil na vsakih 50 AK vgrajen en piridilditiolni linker. Povsem enako stehiometrijo povezovanja smo dosegli tudi mi (opisano pot točko 4.1.1 v poglavju Rezultati).

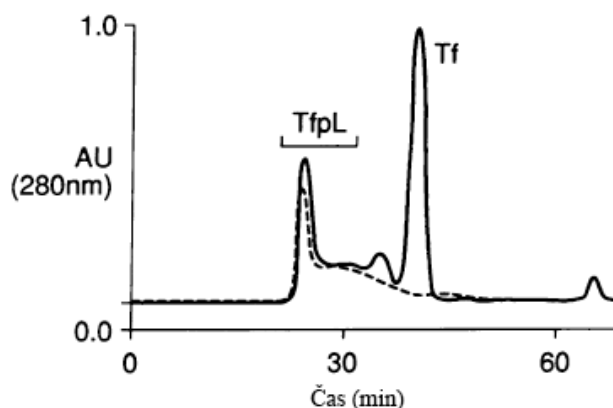
Na sliki 54 smo prikazali povzetek sinteze in izolacije konjugata, kar je bilo sicer že ločeno predstavljeno v poglavju Rezultati. Na zgornjem delu slike je prikazan NaDS-PAGE gel konjugatov takoj po sintezi. Vzorce smo pripravili v treh različnih molarnih razmerjih Tf in PLL, pri čemer je bila količina Tf vedno enaka. Pri vzorcih 1 in 2 je bila količina PLL enaka količini Tf, pri vzorcih 3 in 4 je bilo PLL 5-krat manj, pri vzorcih 5 in 6 pa 10-krat manj. Z okvirčki so označeni ne-reducirani vzorci, zato lahko iz intenzitete lise sklepamo o količini prostega Tf, ki se ni povezal s PLL, saj Tf v konjugatih ne potuje v gel. Pri razmerju Tf: PLL = 1: 1, prostega Tf skoraj ni, pri razmerju 1: 0,1 pa približno polovica Tf ostaja nepovezana. Sklepamo, da večja količina PLL v konjugatu pomeni manj prostega Tf, saj je več dostopnih piridilditiolnih skupin, na katere se lahko veže s SPDP modificiran Tf. Rezultate na zgornjem delu slike 54 lahko povežemo z rezultati srednjega dela slike, kjer je prikazana separacija konjugatov Tf-PLL z gelsko filtracijo. Vrh prostega Tf je najvišji pri razmerju Tf: PLL = 1: 0,1, kar pomeni, da se ga velik delež ni povezal s PLL. Rezultat sovпада z močno intenziteto Tf lise na NaDS-PAGE gelu v ne-reducirajočih pogojih. Nasprotno je pri razmerju 1: 1 vrh Tf nezaten, prav tako lisa na NaDS-PAGE gelu v ne-reducirajočih pogojih skoraj ni opazna. Pri razmerju 1: 0,2 je situacija vmesna. Slaba tretjina Tf se ni povezala s PLL. Spodnji del slike 54 predstavlja NaDS gel reduciranih in ne-reduciranih očiščenih vzorcev konjugata. Vidimo, da v ne-reducirajočih pogojih ni vidnega Tf, kar pomeni, da smo se ga z gelsko filtracijo povsem znebili. V reducirajočih pogojih se Tf sprosti iz konjugatov, zato se na gelu pojavi lisa pri velikosti, ki ustreza Tf. To je tudi dokaz, da smo zbrali prave vrhove, kjer se je nahajal konjugat. Dodaten dokaz, da smo izolirali konjugate, je predstavljen na sliki 40 v poglavju Rezultati. Ta slika prikazuje CD izoliranega konjugata Tf-PLL v primerjavi s samim Tf in PLL.

Vidimo, da je CD spekter konjugata Tf-PLL približen seštevek spektrov Tf in PLL, kar potrjuje ustreznost izolacije.



Slika 54: Shematski prikaz priprave konjugata med transferinom in poli-L-lizinom. Zgornji del slike prikazuje NaDS-PAGE gel takoj po sintezi konjugata med transferinom in poli-L-lizinom (Tf-PLL), srednji del kromatogram ločevanja reakcijske zmesi po sintezi konjugata z gelsko filtracijo, spodnji del pa NaDS-PAGE gel izoliranih konjugatov.

Kromatogrami ločevanja konjugatov Tf-PLL pri različnih molskih razmerjih Tf in PLL nam povedo, da se pri enaki količini Tf in PLL celoten Tf poveže s PLL, medtem ko pri nižanju količine PLL ostane precej Tf nepovezanega. Glede na to, da bi se na vsako molekulo PLL teoretično lahko vezalo 16 molekul Tf (opisano v preglednici 15), lahko sklepamo, da je učinkovitost reakcije nizka. Možna razlaga je neenakomerno vgrajevanje SPDP v molekule PLL, pri čemer bi premajhna razdalja med vgrajenimi molekulami onemogočala vezavo več molekul Tf, saj bi ob vezavi ene molekule Tf prišlo do steričnega oviranja pri vezavi druge. Možno je tudi, da PLL tvori nekakšen klobčič, pri čemer je velik delež molekul SPDP, vgrajenih v PLL, za reakcijo s Tf nedostopnih, ker se nahaja v notranjosti. Prav tako je lahko prišlo do povezovanja ene molekule Tf in ene molekule PLL z več disulfidnimi vezmi, saj je Tf vseboval v povprečju 7 molekul SPDP, ki so lahko vstopile v reakcijo s sulfhidrilnimi skupinami iste molekule PLL, ki je vsebovala v povprečju 16 molekul SPDP. To bi lahko privedlo do ovijanja Tf s polipeptidno molekulo PLL, ki bi zato vsebovala bistveno manj prostih ali dostopnih sulfhidrilnih skupin. Wagner in sod. (1990) so v primeru združevanja Tf s PLL, dolžine 450 AK, dodali 17-krat manj molov PLL v primerjavi s Tf. Z ločevanjem konjugata z gelsko filtracijo so dobili podobne rezultate kot mi pri razmerju Tf: PLL = 1: 0,1 (slika 55). Velik delež Tf je ostal nepovezan. Sama oblika kromatograma je delno drugačna od naše, predvsem izstopa visok vrh na levi strani, ki je bil pri nas bolje viden šele pri razmerju Tf: PLL = 1: 1. Poleg tega je oblika platoja konjugatov delno drugačna, in sicer je v našem primeru plato bolj izbočen, v primeru študije Wagnerja in sod. (1990) pa bolj raven. Razlike so verjetno posledica samega ločevanja, saj so Wagner in sod. (1990) uporabili kolono »Superose 12«, ki temelji na prečno povezani agarози, mi pa smo izvedli ločevanje s kolono BioSep-SEC-s3000, ki temelji na silikatih. Poleg tega so Wagner in sod. (1990) za ločevanje uporabili pufer z 1 M GndCl, mi pa z 1,5 M. Razlike pa so gotovo tudi posledica različne modifikacije Tf s SPDP, saj so Wagner in sod. (1990) pridobili Tf, ki je imel v povprečju vgrajeni 2 molekuli SPDP, naš Tf pa je bil v povprečju modificiran s 7 molekulami SPDP. Ne glede na izpostavljene razlike, so rezultati zelo primerljivi.



Slika 55: Gelska filtracija konjugatov Tf-PLL iz sorodne študije (Wagner in sod., 1990: 3412)

Neprekinjena črta predstavlja absorbanco transferina (Tf) pri 280 nm, prekinjena pa absorbanco fluorescenčno označenega poli-L-lizina (PLL) pri 520 nm.

Gelsko filtracijo smo izvajali v pufru, ki je vseboval 1,5 M GndCl (sestava opisana v preglednici 6), saj smo ugotovili, da v istem pufru brez denaturanta ločitev ni možna, ker pride do interakcij med PLL in kolono, zaradi česar se konjugat sploh ne eluira (rezultati gelske filtracije brez prisotnosti GndCl so predstavljeni v prilogi C).

Ohranitev nativne strukture Tf v konjugatu Tf-PLL je bistvenega pomena za biološko aktivnost kompleksov, saj omogoča vezavo na TfR in posledično receptorsko-posredovano endocitozo. Ker smo v postopku izolacije z gelsko filtracijo uporabili pufer, ki vsebuje 1,5 M GndCl, smo se želeli prepričati, da pri teh pogojih ne pride do porušitja sekundarne strukture Tf. Sicer smo vzorce po gelski filtraciji dializirali, pri čemer bi v primeru, da se je tekom izolacije Tf denaturiral, najverjetneje prišlo do renaturacije, smo vseeno želeli pokazati, da GndCl pri 1,5 M koncentraciji sploh ne povzroči denaturacije Tf. Z namenom izolacije podobnih konjugatov so že uporabili GndCl. V primeru konjugata Tf-PLL so uporabili 1 M GndCl (Wagner in sod., 1990), v primeru konjugata neurotenzina in PLL, pri čemer je bila struktura neurotenzina pomembna za vezavo na receptor, pa celo 2 M GndCl (Martinez-Fong in sod., 1999). V nobeni študiji niso poročali o nefunkcionalnosti konjugata zaradi prisotnosti GndCl v postopkih izolacije.

Da bi se prepričali, kakšen je vpliv 1,5 M GndCl na sekundarno strukturo Tf, smo izmerili CD Tf in Tf z dodanim 1,5 M GndCl (brez dialize) ter s primerjavo spektrov ocenili vpliv prisotnosti denaturanta. Na sliki 41 v poglavju Rezultati vidimo, da se CD spektra Tf in Tf z dodanim 1,5 M ultra-čistim GndCl skoraj povsem prekrivata, zato lahko sklepamo, da je sekundarna struktura Tf enaka sekundarni strukturi Tf z dodanim 1,5 M GndCl. To pomeni, da se sekundarna struktura Tf pri pogojih izolacije ohranja. Dodaten dokaz predstavljajo poskusi toplotne denaturacije vzorcev Tf in Tf z dodanim 1,5 M GndCl. Toplotna denaturacija povzroči porušitje sekundarne strukture in nastanek neurejene oblike, kar opazimo kot premik CD spektra navzgor. Slika 42 v poglavju Rezultati prikazuje primerjavo Tf (A) in Tf z dodanim 1,5 M GndCl (B) pred toplotno denaturacijo in po njej. Vidimo, da tako pri vzorcu Tf kot vzorcu Tf z dodanim GndCl pride do premika krivulje navzgor, kar pomeni porušitje sekundarne strukture. Zato lahko sklepamo, da sam 1,5 M GndCl ni porušil sekundarne strukture Tf, saj se je ta porušila šele po segretju na 95°C. Rezultate potrjuje tudi slika 43, kjer smo spremljali povprečno vrednost CD pri valovnih dolžinah 215 nm in 222 nm v odvisnosti od temperature za vzorca Tf in Tf z dodanim GndCl. S tem poskusom smo dokončno potrdili, da 1,5 M GndCl ne povzroči denaturacije Tf, saj je v obeh primerih viden prevoj, ki predstavlja prehod iz nativne v denaturirano obliko Tf. Če bi GndCl povzročil denaturacijo Tf, prevoja ne bi bilo, saj bi bila sekundarna struktura že porušena. Zanimivo je, da se prevoj v vzorcu Tf z GndCl zgodi že malo nad 40°C, medtem ko se pri samem Tf pojavi šele pri temperaturi malo pod 70 °C. Vzrok bi bil lahko vpliv GndCl na delno destabilizacijo Tf, ki je zaradi tega bolj dovzeten za toplotno denaturacijo. Ker smo z dializo vzorcev po gelski filtraciji odstranili GndCl, smo pričakovali ustrezno stabilnost Tf.

5.1.2 Priprava kompleksov Tf-PLL/poli(I:C)

INK so polianionske molekule, zato smo pričakovali, da se bodo preko elektrostatskih interakcij vezale na pozitivno nabit PLL iz konjugata. Sposobnost vezave in ustrezno masno razmerje konjugata Tf-PLL glede na nukleinske kisline smo preverjali z metodo zmanjšane mobilnosti na agaroznem gelu. Ob tvorbi kompleksov pride do nevtralizacije negativnih nabojev nukleinskih kislin s pozitivnimi naboji PLL v konjugatu (Kim in sod., 2004). Zato se potovanje nukleinskih kislin na agaroznem gelu upočasni, kar se odraža v zamiku lise na agaroznem gelu.

Na sliki 44 v poglavju Rezultati je prikazan agarozni gel zmanjšane mobilnosti poli(I:C) v kompleksih s Tf-PLL. Vidimo, da mobilnost kompleksov Tf-PLL/poli(I:C) postopno pada z večanjem količine konjugata Tf-PLL, saj so lise poli(I:C) v gelu vedno manj intenzivne, obenem pa lahko opazimo komplekse, ki ne potujejo v gel in so ostali v žepkih. Pri masnem razmerju 0,5 μ g Tf-PLL in 0,25 μ g poli(I:C) oziroma Tf-PLL: poli(I:C) = 2: 1 pride do popolne zaustavitve gibanja na gelu, kar pomeni, da je negativni naboj poli(I:C) nevtraliziran s pozitivnim nabojem PLL iz konjugata. Podoben rezultat prikazuje slika 45, kjer smo namesto Tf-PLL uporabili le PLL. V tem primeru pride do popolne zaustavitve gibanja na gelu že pri razmerju PLL: poli(I:C) = 1,5: 1. V sorodnih študijah, kjer so uporabili PLL drugačnih dolžin, so določili različna masna razmerja polikationa in nukleinskih kislin, pri katerih je prišlo do popolne zaustavitve gibanja na gelu. Wagner in sod. (1990) so določili masno razmerje 3: 1, pri čemer je bil PLL iz konjugata v povprečju dolg 270 AK, kot nukleinsko kislino pa so uporabili velikostni standard λ DNK, rezan s *HindIII* in *EcoRI*. Kim in sod. (2004) so določili razmerje 8: 1, pri čemer je bil PLL iz konjugata v povprečju dolg 400 AK, kot nukleinsko kislino pa so uporabili plazmidno DNK. Vidimo, da je bila količina konjugata oziroma samega PLL za popolno zaustavitev gibanja na gelu v našem primeru precej nižja. Razlog je verjetno veliko daljši PLL, ki smo ga uporabili za sintezo konjugatov (približno 850 AK), poleg tega pa smo konjugate pripravili z več dodanega PLL, kot v ostalih študijah (opisano pod točko 3.2.4.1 v poglavju Materiali in metode), zato imajo verjetno večjo kapaciteto vezave nukleinskih kislin.

S tem testom smo dokončno dokazali, da smo z zbiranjem frakcij pri gelski filtraciji izolirali konjugate Tf-PLL. Z NaDS-PAGE smo namreč pokazali, da je v konjugatih prisoten Tf, z metodo zmanjšane mobilnosti na gelu pa smo dokazali prisotnost PLL. S tem testom smo dokazali funkcionalnost konjugatov, saj so sposobni vezave nukleinskih kislin.

5.1.3 Stabilnost poli(I:C) v kompleksih

Nukleinske kisline so občutljive na razgradnjo z DNK in RNK nukleazami, ki so prisotne tako v serumu kot v celicah. Poli(I:C) je dvRNK molekula, zato je občutljiva na razgradnjo z RNazami, ki so zelo stabilni in povsod prisotni encimi. Zato smo želeli dokazati, da konjugat Tf-PLL omogoča zaščito poli(I:C) pred razgradnjo in na ta način poveča njeno stabilnost. Že so pokazali, da PLL zaščiti DNA pred razgradnjo z DNazo (Capan in sod., 1999c; Capan in sod., 1999a).

Iz slik 46 in 47 v poglavju Rezultati je jasno razvidno, da z naraščanjem količine PLL enakomerno narašča delež nerazgrajene poli(I:C), kar lahko opazujemo z nižanjem platoja absorbanca. Pri enaki masi poli(I:C) in PLL je vsa RNK ostala nerazgrajena, saj se absorbanca v 20 minutah skoraj ni zvišala. To pomeni, da PLL uspešno zaščiti poli(I:C) pred razgradnjo z RNazo in sicer v odvisnosti od masnega razmerja med poli(I:C) in PLL. Ko je v kompleksih prisotna dovolj velika količina polikationa (masno razmerje 1: 1), se nanj veže vsa RNK, ki je zato zaščitena pred encimsko razgradnjo. V vseh ostalih vzorcih je količina PLL premajhna, da bi imela kapaciteto vezave vse RNK, zato zaščitena ostane le RNK, ki se je povezala s polikationom. Mehanizem zaščite pred razgradnjo verjetno temelji na strukturi poli(I:C), ki je v kompleksih najbrž bolj kompaktno zvita in zato za RNazo nedostopna, saj pride do steričnega oviranja.

Z rezultati smo pokazali, da PLL iz konjugata Tf-PLL lahko zašiti RNK pred razgradnjo in tako bistveno zveča njeno stabilnost in sicer je najmanjše masno razmerje med poli(I:C) in PLL za učinkovito zaščito 1: 1. To je skladno tudi z rezultati zmanjšane mobilnosti na gelu (slika 45), kjer vidimo, da pri tem masnem razmerju kompleksi skoraj več ne potujejo v gel, saj je skoraj celotna poli(I:C) povezana s PLL.

Preverili smo ali ima zaščita poli(I:C) pred encimsko razgradnjo tudi biološki pomen, zato smo testirali sposobnost aktivacije receptorja TLR3 s samo poli(I:C) in poli(I:C) v kompleksih s PLL po inkubaciji z RNazo ONE. Na sliki 48 vidimo, da sama poli(I:C) po 20 minutni inkubaciji z RNazo ne aktivira receptorja TLR3, saj je nivo aktivacije skoraj enak nestimuliranim celicam. To pomeni, da se je poli(I:C) razgradila. Nasprotno je poli(I:C) v kompleksih s PLL in po inkubaciji z RNazo vseeno biološko aktivna, saj je nivo aktivacije receptorja TLR3 več kot 10-krat višji od nestimuliranih celic. To potrjuje poskus iz točke 4.3.1, kjer smo pokazali da PLL zašiti poli(I:C) pred razgradnjo, saj je le nerazgrajena, ustrezno dolga dvRNK sposobna aktivacije receptorja.

5.1.4 Celični vnos kompleksov INK

V uvodnem delu tega poglavja smo izpostavili enega ključnih omejitvenih dejavnikov uporabe INK v terapevtske namene – neučinkovit in nespecifičen celični vnos.

V raziskovalnem delu nam je uspelo pripraviti učinkovit transportni sistem za vnos INK v celice. Na sliki 49 poglavja Rezultati jasno vidimo, da je vnos označenega CpG ODN v kompleksih s Tf-PLL (B) bistveno bolj učinkovit od vnosa proste INK (A). V primeru prostega ODN je bil vnos po 4 urah zanemarljiv, saj je opaznih le nekaj rdečih pik. Nasprotno se je ODN v kompleksih s konjugatom Tf-PLL po istem času zelo učinkovito vnesel v celice, saj so rdeče pike prisotne v velikem številu znotraj vseh posnetih celic.

Za aktivacijo prirojenih in pridobljenih imunskih odzivov z INK je potreben vnos v znotrajcelične razdelke, ki vsebujejo endosomalne receptorje TLR. V ločenih študijah so pokazali, da je za vnos CpG ODN in poli(I:C) odgovorna s klatrini posredovana endocitoza (Johnsen in sod., 2006; Latz in sod., 2004). V prvi od omenjenih študij so tudi pokazali, da pride do kolokalizacije Tf in dvRNK, kar je bistvenega pomena za delovanje sistema, ki temelji na vnosu preko Tf/TfR endocitoze. V diplomskem delu smo pokazali, da se pripravljene kompleksi vnesejo v ustrezne znotrajcelične razdelke, kar omogoča aktivacijo endosomalnih receptorjev TLR. To je razvidno iz slike 50D, kjer je s puščicami označena kolokalizacija (rumene pike) lizosomov in CpG ODN. To pomeni, da konjugati Tf-PLL omogočajo učinkovit vnos INK v endosomalno pot.

5.1.5 Biološka aktivnost kompleksov

V Pregledu objav smo pod točko 2.5 že predstavili poskuse, kako izboljšati učinkovitost INK s pripravo različnih konjugatov in kompleksov. Morda velja omeniti uporabo PLGA kot nosilca CpG ODN, ki je prepričljivo izboljšal učinkovitost imunostimulativnih učinkov CpG ODN (Xie in sod., 2005). Prav tako so pomembni rezultati študije, kjer so ugotovili,

da kationski peptid LL37 veže lastno neimunogeno DNK in jo spremeni v imunostimulativno, kar vodi do proizvodnje interferonov tipa I v pDC. DNK in LL37 tvorijo agregate, ki se vnesejo in zadržijo v zgodnjih endocitotskih razdelkih pDC, kjer sprožijo signalizacijo TLR9 (Lande in sod., 2007).

Konjugat Tf-PLL, ki smo ga pripravili v raziskovalni nalogi, je namenjen vezavi, stabilizaciji in učinkovitemu vnosu INK v endosomalno pot. Ko so kompleksi v celici, začnejo postopno razpadati, kar vodi do sproščanja INK, ki nato aktivirajo endosomalne receptorje TLR. O postopnem sproščanju DNK iz kompleksov PLL so že poročali (Capan in sod., 1999c).

Iz slike 51 v poglavju Rezultati lahko sklepamo, da se poli(I:C) tako iz kompleksov s Tf-PLL kot tudi PLL sprošča postopno, kar je razvidno iz razmerja aktivacije glede na poli(I:C) po 12 urah stimulacije in pri kasnejših časih. Po 12 urah sama poli(I:C) povzroči visoko proizvodnjo IL-6, medtem ko v kompleksih s Tf-PLL in PLL aktivacije glede na prosto poli(I:C) skoraj ni. Očitno sama poli(I:C) delno prehaja v endosome in aktivira TLR3. Nasprotno poli(I:C) v kompleksih, kljub boljšemu vnosu v celice, ne aktivira TLR3, saj je verjetno bolj kompaktno zvita in zaščitena ter zaradi steričnih ovir nedostopna za interakcije z receptorjem TLR3. Po 18 urah se poli(I:C) iz kompleksov s Tf-PLL že delno sprosti in zato lahko aktivira TLR3 v podobni meri kot sama poli(I:C). Poli(I:C) v kompleksih s PLL v primerjavi s Tf-PLL po 18 urah bistveno slabše aktivira receptor TLR3, kar kaže na pomemben vpliv Tf iz konjugata. Očitno Tf omogoča učinkovit vnos preko receptorsko-posredovane endocitoze. Še bolj je vpliv Tf viden po 24 urah, ko je aktivacija s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) daleč najučinkovitejša. Verjetno je po tem času prišlo do popolne sprostitve poli(I:C) iz učinkovito vnesenih kompleksov, ki so v endosomalnih pogojih razpadli ali se razgradili, prosta poli(I:C) pa se je vezala na TLR3 in povzročila aktivacijo. Kompleksi s PLL po 24 urah povzročijo podobno proizvodnjo IL-6 kot sama poli(I:C), kar pomeni, da so delno razpadli. Predvidevamo, da se del teh kompleksov, v nasprotju s Tf-PLL, še ni nahajal v znotrajceličnih razdelkih, saj je vnos očitno bistveno manj učinkovit v primerjavi z vnosom preko TfR. Po 36 urah je situacija podobna tisti pri 24 urah, le da tudi kompleksi PLL/poli(I:C) povzročijo učinkovito aktivacijo. To verjetno pomeni, da so se kompleksi s PLL glede na komplekse s Tf-PLL zapozneno vnesli v celice, kjer so razpadli, sproščena poli(I:C) pa je učinkovito aktivirala TLR3. Aktivacija je bila celo višja od tiste s prosto poli(I:C), kar poudarja pomen učinkovitosti vnosa in stabilizacije INK za aktivacijo TLR3.

V točki 4.4 poglavja Rezultati smo s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo uspeli pokazati, da je vnos ODN-Alexa 633 s konjugatom Tf-PLL veliko učinkovitejši od vnosa prostega ODN-Alexa 633. Nato smo dokazali še biološki pomen učinkovitejšega vnosa poli(I:C). Na sliki 52 vidimo, da je po 1 oziroma 3 urah stimulacije s poli(I:C) in naknadni odstranitvi gojišča prišlo po 36 urah do učinkovitega imunskega odziva le v primeru kompleksov Tf-PLL/poli(I:C), medtem ko je bila aktivacija receptorja TLR3 s prosto poli(I:C) zanemarljiva. To pomeni, da po tem času ne pride do vnosa proste poli(I:C) v celice, nasprotno pa se poli(I:C) v kompleksih s Tf-PLL v istem času učinkovito vnese v znotrajcelične razdelke in omogoči močno aktivacijo receptorja TLR3, ki je skoraj 13-krat višja kot v primeru proste poli(I:C). Rezultati potrjujejo veliko učinkovitost vnosa s pripravljenimi konjugati.

Na koncu smo želeli ugotoviti ali je učinkovit vnos s konjugati Tf-PLL res posledica preko Tf posredovane endocitoze. Verjetno namreč že sam PLL povzroči izboljššan vnos, saj nevtralizira negativen naboj poli(I:C) s pozitivnimi naboji lizina v PLL, kar bi olajšalo endocitozo. Poleg tega PLL lahko povzroči nespecifično vezavo na celično membrano, kar bi tudi povečalo vnos. Sicer smo že s primerjavo aktivacije imunskega odziva s Tf-PLL/poli(I:C) in PLL/poli(I:C) (slika 52 v poglavju Rezultati) pokazali, da ima Tf bistven vpliv, saj predvsem po 18 in 24 urah konjugat Tf-PLL povzroči veliko močnejšo proizvodnjo IL-6. Nedvoumen dokaz pa je na sliki 53 v poglavju Rezultati, kjer vidimo da je aktivacija imunskega odziva s poli(I:C) v kompleksih Tf-PLL skoraj 3-krat višja, kot v primeru inhibicije enakega vzorca s prostim Tf. To dokazuje pomen Tf za učinkovit celični vnos s kompleksi Tf-PLL.

Prikazani rezultati biološke aktivnosti imajo velik pomen, saj smo dokazali, da pripravljeni konjugati omogočajo zelo učinkovit in hiter celični vnos, postopno sproščanje in kar je bistveno, celo izboljšajo imunostimulativni učinek same poli(I:C). To je zelo pomembno za terapevtske aplikacije, tako za zdravljenje rakastih obolenj kot tudi za pripravo adjuvantov, saj isti učinek dosežemo z bistveno manjšimi količinami INK.

5.1.6 Nadaljnje raziskave in potencialna uporaba konjugata Tf-PLL

V raziskovalnem delu smo pokazali, da je možno pripraviti konjugate Tf-PLL, ki vežejo INK in jih učinkovito vnesejo v celice. Vse poskuse smo ponovili najmanj dvakrat. Ker smo zaradi razpoložljivih materialov določene poskuse izvajali s CpG ODN (preverjanje celičnega vnosa s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo), določene pa s poli(I:C) (preverjanje biološke aktivnosti kompleksov s testom ELISA), želimo v prihodnjih raziskavah narediti celotno serijo poskusov z eno samo vrsto INK. Vsebinsko seveda pričakujemo zelo podobne rezultate ne glede na tip INK.

Zavedati se je potrebno, da smo biološko aktivnost opazovali predvsem na primarni celični liniji HMVEC-dLy Ad, pri kateri ne poznamo ravni izražanja TfR, ki pa bi jo v prihodnosti lahko določili s qRT-PCR (kvantitativna reakcija PCR v realnem času). Celični vnos kompleksov s Tf posredovano endocitozo, na kateri temeljijo naši konjugati, bi bil še boljši, če bi delali na celicah, ki so znane po visokem izražanju TfR, kot so tumorska celična linija B16F10 melanom, Nevro 2A nevroblastom in številne primarne človeške melanomske celične linije. Veliko TfR se izraža tudi na ostalih celičnih linijah, kot so K562, HeLa, CHO, Jurkat, HepG2 in COS (Polyethylenimine ..., 2004).

Glede imunskega odziva na pripravljene komplekse bi gotovo prišli do še boljših rezultatov, če bi kot modelno celično linijo uporabili APC, kot so pDC za testiranje aktivnosti Tf-PLL/CpG ODN in mDC za testiranje aktivnosti Tf-PLL/poli(I:C).

Pripravljene komplekse bi veljalo preizkusiti *in vivo* na testnih živalih, da bi lahko ovrednotili dejanski učinek na gostiteljev imunski odziv in zaščito pred okužbami ali rakastimi tvorbami. Z *in vivo* poskusi bi bilo potrebno preveriti tudi vpliv vnosa kompleksov Tf-PLL/INK v ne-tarčne celice, ki prav tako v določeni meri izražajo TfR.

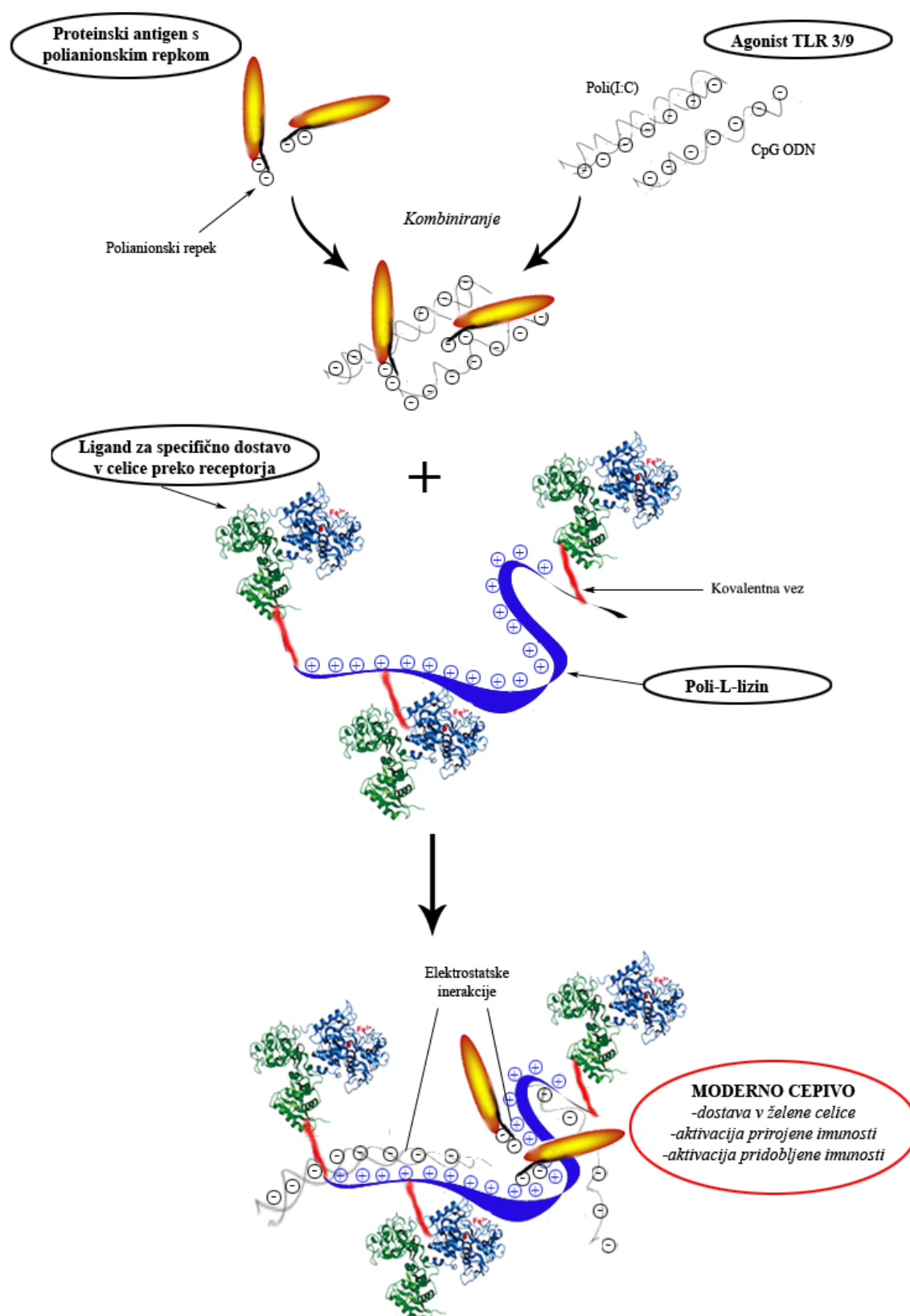
Pomembno bi bilo tudi preveriti ali konjugat Tf-PLL v celici preko elektrostatskih interakcij poleg INK nespecifično veže tudi ostale negativno nabite makromolekule in s tem povzroči škodljive stranske učinke. Pričakovali bi, da ob pripravi kompleksov v ustreznem masnem razmerju Tf-PLL: INK do tega ne bi prišlo, saj bi bili pozitivni naboji PLL iz konjugata nevtralizirani z negativnimi naboji INK.

V poglavju Pregled objav smo v točki 2.3.2 predstavili prednost aktivacije komplementarnih poti signaliziranja TLR za pripravo učinkovitih adjuvansov modernih cepiv. To dosežemo z uporabo ligandov različnih receptorjev TLR. Pripravljeni konjugati bi na zelo enostaven način, s preprostim mešanjem Tf-PLL s poli(I:C) in CpG ODN omogočali pripravo kompleksov, ki bi hkrati aktivirali receptor TLR3 in TLR9. Terapevtski potencial aktivacije TLR3 in TLR9 smo podrobno opisali v poglavju Pregled objav v točki 2.3.3 in 2.3.4, zato lahko sklepamo da bi omenjen kompleks omogočal zelo učinkovit in specifičen boj proti rakastim obolenjem, saj je na rakastih celicah izraženih veliko več TfR. Zato bi prišlo do tarčno specifične dostave adjuvansa v rakaste celice oziroma v bližino rakastih tvorbo, kjer bi ga APC fagocitirale skupaj s tumorskimi antigeni. Poli(I:C) bi preko aktivacije receptorja TLR3 v celicah mDC povzročila TLR3-TICAM-1 posredovan imunski odziv, ki sproži nastanek IFN tipa I, citokinov in kemokinov. Poleg tega signalizacija TLR3 igra ključno vlogo pri stimulaciji pridobljenega imunskega odziva, saj ojača navzkrižno predstavitev antigenov, antigensko specifičen CTL odziv, zorenje DC ter aktivacijo celic NK (Matsumoto in Seya, 2008). Obenem pa bi CpG ODN preko vezave na TLR9 povzročil aktivacijo pDC, kar bi ustvarilo Th1 citokinsko/kemokinsko okolje in povečalo nivo izražanja kostimulativnih molekul na pDC, kar bi preusmerilo toleranco celic T v močan citotoksičen odziv limfocitov T proti tumorskim antigenom. Prav tako bi prišlo do učinkovite aktivacije specifičnih celic B (Krieg, 2006). Podoben princip so že uporabili pri pripravi cepiva, kjer so kot adjuvans uporabili komplekse kationskih liposomov in TLR3/TLR9 agonistov, ter tako dosegli močan T-celični odziv proti antigenu (Zaks in sod., 2006).

Kljub velikemu potencialu aktivacije receptorja TLR3 v terapiji raka, velja opozoriti na dejstvo, da je signalizacija TLR3 v določenih primerih lahko udeležena v vnetnih reakcijah, ki pripomorejo k napredovanju tumorja, kar pomeni, da je uporaba agonistov TLR3 lahko dvorezen meč (Conforti in sod., 2010). V vsakem primeru pa je signalizacija TLR3 učinkovita za zdravljenje določenih tipov raka (Seya in Matsumoto, 2009).

Z nekaj modifikacijami bi lahko na zelo enostaven način, ki smo ga predstavili v diplomski nalogi, pripravili tudi učinkovito modularno moderno cepivo. Ideja je naslednja: Poleg kombiniranja polianionskih agonistov TLR s konjugatom bi lahko na zelo enostaven način dodali tudi antigen. Pripraviti bi morali rekombinanten antigen, ki bi na N- ali C- koncu vseboval določeno število negativno nabitih AK, ki bi omogočale elektrostatsko vezavo na PLL iz konjugata. Pomembno je tudi, da bi za namen učinkovitega cepiva morali zamenjati Tf z določenim ligandom, ki bi se specifično vezal na imunske celice, predvsem APC, kar bi omogočilo tarčno delovanje na imunski sistem. Pri tem bi bilo potrebno definirati ustrezen ligand. Primer tarčne dostave v celice T je uporaba protiteles proti kompleksu CD3-TCR (Buschle in sod., 1995), za dostavo v APC, pa se je možno usmeriti na receptorje, specifične za APC, kot je, na primer, manozni receptor, proti kateremu so že razvili protitelesa (He in sod., 2007; Ramakrishna in sod., 2004).

To pomeni, da bi lahko pripravili modularne konjugate PLL z različnimi ligandi, ki bi omogočali specifično dostavo v celice preko receptorja. Konjugatom bi dodali agoniste TLR3 in TLR9 ter različne rekombinantne antigene, proti katerim bi želeli vzbuditi imunski odziv. Takšni kompleksi so primer varnega modernega cepiva, ki bi ga lahko sestavili na poljuben, cenovno ugoden in enostaven način. Učinkovitost takšnega cepiva bi bila visoka, saj bi vsebovalo adjuvanse, ki bi specifično aktivirali endosomalne receptorje TLR, z uporabo poljubnih antigenov pa bi lahko sledili evoluciji patogenov. Ideja je shematsko prikazana na sliki 56.



Slika 56: Sestava modernega modularnega cepiva

Tako pripravljeno cepivo združuje dostavo v endosome zelenih celic, INK za aktivacijo prirojenega imunskega sistema in antigen za stimulacijo pridobljenega imunskega sistema.

5.2 SKLEPI

- Potrdili smo delovne hipoteze, postavljene v uvodu.
- Z uporabo bifunkcionalnega reagenta SPDP smo preko disulfidne vezi uspešno povezali Tf s PLL v konjugat Tf-PLL.
- Z gelsko filtracijo smo konjugat Tf-PLL uspešno izolirali.
- S cirkularnim dikroizmom smo potrdili, da je Tf pri pogojih izolacije ohranil nativno sekundarno strukturo.
- Konjugat Tf-PLL preko elektrostatskih interakcij veže INK in na ta način omogoča pripravo kompleksov.
- Za popolno zaustavitev potovanja poli(I:C) na agaroznem gelu je komplekse potrebno pripraviti v masnem razmerju Tf-PLL: poli(I:C) = 2: 1.
- Konjugat Tf-PLL zaščiti poli(I:C) pred razgradnjo z RNazo, kar smo dokazali tako spektrofotometrično kot na ravni biološke aktivnosti – aktivacije receptorja TLR3 na transficiranih celicah HEK293.
- S konfokalno fluorescenčno mikroskopijo smo pokazali, da je vnos CpG ODN v celice HeLa veliko bolj učinkovit v kompleksih s Tf-PLL kot v primeru prostega CpG ODN.
- S konfokalno fluorescenčno mikroskopijo smo pokazali, da pride do kolokalizacije kompleksov Tf-PLL/CpG ODN in lizosomov, kar potrjuje vnos v endosomalno pot.
- Konjugat Tf-PLL omogoča postopno sproščanje poli(I:C) iz kompleksov.
- Kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) aktivirajo receptor TLR3 in povzročijo proizvodnjo IL-6 v primarni celični liniji HMVEC-dLY Ad bolj učinkovito kot sama poli(I:C).
- Po 1 oziroma 3 urah stimulacije in naknadni odstranitvi gojišča kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) po 36 urah povzročijo učinkovit imunski odziv, medtem ko ga sama poli(I:C) ne. To pomeni, da je vnos s konjugatom Tf-PLL zelo učinkovit in ima biološki pomen v smislu aktivacije receptorja TLR3.
- Vnos konjugata Tf-PLL poteka z receptorsko-posredovano endocitozo.
- Pripravljeni konjugati imajo velik terapevtski potencial za zdravljenje rakastih obolenj.
- Na osnovi principa, ki smo ga pokazali v diplomski nalogi, je mogoče sestaviti modularno moderno cepivo, ki vsebuje poljuben antigen in adjuvans, poleg tega ga je z izbiro liganda možno usmeriti v želen celični tip (na primer APC).
- Pripravljeni konjugati predstavljajo način premostitve težav, povezanih z uporabo INK v terapevtske namene.

6 POVZETEK

Ključna naloga imunskega sistema je prepoznavanje ter uničevanje patogenov in rakastih celic, kar omogoča zaščito organizma pred boleznimi. Gostitelj imunski sistem se deli na prirojeno imunost, ki omogoča začetno, manj specifično obrambo zoper okužbe in pridobljeno imunost, ki je udeležena v specifični odstranitvi patogenov v kasnejših stopnjah okužbe in vključuje imunski spomin. Za učinkovito obrambo je bistvenega pomena sodelovanje med prirojenim in pridobljenim imunskim sistemom.

Prirojen imunski sistem zazna mikroorganizme z omejenim številom PRR, ki prepoznavajo visoko ohranjene PAMP. Ena glavnih skupin PRR so receptorji TLR, ki po zaznavanju patogenov sprožijo ustrezne signalne poti in na ta način omogočijo aktivacijo imunskega sistema ter nadaljnje usmerjanje pridobljenega imunskega odziva.

Med PAMP sodijo tudi določene nukleinske kisline, ki imajo imunostimulativni značaj. Receptor TLR9 v endosomih prepozna nemetilirana zaporedja CpG v evDNK, ki so značilna za bakterije. Virusno dvRNK v endosomih prepozna receptor TLR3. Zato so INK in njihovi sintetični analogi potencialno uporabni kot adjuvansi v profilaktičnih in terapevtskih cepivih ter za zdravljenje rakastih obolenj.

Čeprav imajo INK številne obetavne lastnosti za uporabo v terapevtske namene, obstajajo težave, ki omejujejo njihovo učinkovitost. Mednje sodita predvsem neučinkovit celični vnos in občutljivost na encimsko razgradnjo.

V diplomskem delu smo se osredotočili na razvoj načina tarčne dostave, stabilizacije, izboljšane vnosa in postopnega sproščanja INK, ki bodo učinkovito aktivirale prirojen in pridobljen imunski odziv. V ta namen smo pripravili konjugat Tf-PLL.

Tf in PLL smo povezali preko disulfidne vezi z uporabo bifunkcionalnega reagenta SPDP. Tf omogoča receptorsko-posredovano endocitozo in s tem boljši celični vnos, predvsem v celice, ki izražajo višji nivo TfR, med katere sodijo rakaste celice. Pozitivno nabit PLL omogoča tvorbo kompleksov, saj elektrostatsko veže polianionske INK.

Konjugat Tf-PLL smo uspešno izolirali z gelsko filtracijo. Z merjenjem CD spektrov smo pokazali, da se je sekundarna struktura Tf tekom izolacije ohranila, kar je pomembno za funkcionalnost konjugatov.

Z metodo zmanjšane mobilnosti na gelu smo dokazali, da konjugat Tf-PLL uspešno veže poli(I:C). Za popolno zaustavitev gibanja na gelu, ki kaže na nevtralizacijo negativnih nabojev poli(I:C) s pozitivnimi naboji PLL, je potrebno komplekse pripraviti v masnem razmerju Tf-PLL: poli(I:C) = 2: 1.

Dokazali smo, da PLL iz konjugata omogoča zaščito poli(I:C) pred razgradnjo z RNazo, saj je struktura poli(I:C) v kompleksih s PLL verjetno bolj kompaktno zvita in zato za RNazo nedostopna, saj pride do steričnega oviranja. Dokazali smo tudi, da ima zaščita

poli(I:C) pred razgradnjo biološki pomen, saj ima le nerazgrajena poli(I:C) sposobnost aktivacije receptorja TLR3. Sama poli(I:C) po inkubaciji z RNazo ne aktivira receptorja TLR3, v kompleksih s PLL pa je nivo aktivacije več kot 10-krat višji od negativne kontrole.

S konfokalno fluorescenčno mikroskopijo smo pokazali, da je vnos označenega CpG ODN v kompleksih s Tf-PLL bistveno bolj učinkovit od vnosa proste INK. Po 4 urah inkubacije se v celice HeLa ni vneslo skoraj nič prostega CpG ODN. Nasprotno se je ODN v kompleksih s konjugatom Tf-PLL po istem času zelo učinkovito vnesel v celice, saj je bil prisoten v velikem številu znotraj vseh posnetih celic. Poleg učinkovitega vnosa se kompleksi nahajajo tudi v ustreznih znotrajceličnih razdelkih, kjer lahko aktivirajo receptor TLR3, kar smo dokazali s kolokalizacijo kompleksov z lizosomi.

Biološko aktivnost kompleksov v smislu aktivacije imunskega sistema preko TLR3 smo ovrednotili s testom ELISA. Določili smo količino IL-6 v celicah HMVEC-dLy Ad po različnih časih stimulacije s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C), PLL/poli(I:C) in samo poli(I:C). Glede na primerjavo s samo poli(I:C) smo pokazali, da pride do postopnega sproščanja, ko je poli(I:C) vezana v kompleksih, kar se odraža v zapozneli proizvodnji IL-6. Po daljših časih stimulacije kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) omogočajo najmočnejšo aktivacijo imunskega odziva. S konfokalno fluorescenčno mikroskopijo smo pokazali, da je vnos s konjugatom Tf-PLL zelo učinkovit. Ugotovitve smo potrdili še s testiranjem aktivacije imunskega odziva in dokazali, da po 1 oziroma 3 urah stimulacije s prosto poli(I:C) in naknadni odstranitvi gojišča, po 36 urah pride do zanemarljive proizvodnje IL-6, medtem ko je ta zelo visoka v primeru kompleksov Tf-PLL/poli(I:C). To pomeni, da v tem času ne pride do vnosa proste poli(I:C) v celice, nasprotno se poli(I:C) v kompleksih s Tf-PLL v istem času učinkovito vnese v znotrajcelične razdelke in omogoči močno aktivacijo receptorja TLR3.

Dokazali smo, da je učinkovit vnos s konjugati Tf-PLL posledica receptorsko-posredovane endocitoze. S primerjavo aktivacije imunskega odziva s Tf-PLL/poli(I:C) in PLL/poli(I:C) smo pokazali, da ima Tf bistven vpliv, saj povzročijo kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) veliko močnejšo proizvodnjo IL-6. Nedvoumen dokaz pa je skoraj 3-kratno znižanje aktivacija imunskega odziva s kompleksi Tf-PLL/poli(I:C) ob inhibiciji s prostim Tf.

Konjugat Tf-PLL, ki smo ga pripravili v raziskovalni nalogi, omogoča vezavo, stabilizacijo, učinkovit in hiter celični vnos, postopno sproščanje in kar je bistveno, celo izboljša imunostimulativni učinek same poli(I:C). To je zelo pomembno za terapevtske aplikacije, tako za zdravljenje rakastih obolenj kot tudi za pripravo adjuvantov. Na osnovi principa, ki smo ga predstavili v diplomski nalogi, je mogoče sestaviti moderno modularno cepivo, ki vsebuje poljuben antigen in adjuvant, poleg tega ga je z izbiro liganda za specifično dostavo v celice preko receptorja možno usmeriti v želen celični tip (na primer APC).

Pripravljeni konjugati predstavljajo način premostitve težav, povezanih z uporabo INK v terapevtske namene.

7 VIRI

- Abbas A.K., Lichtman A.H. 2004. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company: 323 str.
- Abedon S.T. 2005. Vaccination. Mansfield, The Ohio State University at Mansfield.
<http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/biol2080.htm> (23. maj. 2010)
- Ahmad-Nejad P., Hacker H., Rutz M., Bauer S., Vabulas R.M., Wagner H. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *European Journal of Immunology*, 32, 7: 1958-1968
- Aisen P. 1998. Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Metal ions in biological systems*, 35: 585-631
- Akazawa T., Ebihara T., Okuno M., Okuda Y., Shingai M., Tsujimura K., Takahashi T., Ikawa M., Okabe M., Inoue N., Okamoto-Tanaka M., Ishizaki H., Miyoshi J., Matsumoto M., Seya T. 2007. Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104, 1: 252-257
- Akazawa T., Masuda H., Saeki Y., Matsumoto M., Takeda K., Tsujimura K., Kuzushima K., Takahashi T., Azuma I., Akira S., Toyoshima K., Seya T. 2004. Adjuvant-mediated tumor regression and tumor-specific cytotoxic response are impaired in MyD88-deficient mice. *Cancer Research*, 64, 2: 757-764
- Akira S., Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4, 7: 499-511
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 4: 783-801
- Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 6857: 732-738
- Anderson K.V., Bokla L., Nusslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42, 3: 791-798
- Asselin-Paturel C., Brizard G., Chemin K., Boonstra A., O'Garra A., Vicari A., Trinchieri G. 2005. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *Journal of Experimental Medicine*, 201, 7: 1157-1167

- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. 2002. Short protocols in molecular biology. 5th ed. New York, John Wiley and Sons: 1512 str.
- Barton G.M., Kagan J.C., Medzhitov R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nature Immunology*, 7, 1: 49-56
- Bell J.K., Botos I., Hall P.R., Askins J., Shiloach J., Segal D.M., Davies D.R. 2005. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 102, 31: 10976-10980
- Bell J.K., Mullen G.E., Leifer C.A., Mazzone A., Davies D.R., Segal D.M. 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology*, 24, 10: 528-533
- Belvin M.P., Anderson K.V. 1996. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12: 393-416
- Bernasconi N.L., Traggiai E., Lanzavecchia A. 2002. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, 298, 5601: 2199-2202
- Bevan M.J. 2004. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nature Reviews Immunology*, 4, 8: 595-602
- Biedermann T., Rocken M., Carballido J.M. 2004. TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 9, 1: 5-14
- BioGPS: The Gene Portal Hub. 2010. San Diego, Genomics Institute of the Novartis Research Foundation.
<http://biogps.gnf.org/#goto=welcome> (10. avg. 2010)
- Bishop G.A., Hostager B.S. 2001. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 13, 3: 278-285
- Blander J.M. 2007a. Coupling Toll-like receptor signaling with phagocytosis: potentiation of antigen presentation. *Trends in Immunology*, 28, 1: 19-25
- Blander J.M. 2007b. Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. *Cell Microbiology*, 9, 2: 290-299
- Bleil J.D., Bretscher M.S. 1982. Transferrin receptor and its recycling in HeLa cells. *EMBO Journal*, 1, 3: 351-355
- Bowie A., O'Neill L.A. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of Leukocyte Biology*, 67, 4: 508-514

- Brinkley M. 1992. A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconjugate Chemistry*, 3, 1: 2-13
- Bsibsi M., Persoon-Deen C., Verwer R.W., Meeuwssen S., Ravid R., Van Noort J.M. 2006. Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia*, 53, 7: 688-695
- Buschle M., Cotten M., Kirlappos H., Mechtler K., Schaffner G., Zauner W., Birnstiel M.L., Wagner E. 1995. Receptor-mediated gene transfer into human T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex. *Human Gene Therapy*, 6, 6: 753-761
- Cannon J.G. 2000. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News in Physiological Sciences*, 15: 298-303
- Capan Y., Woo B.H., Gebrekidan S., Ahmed S., DeLuca P.P. 1999a. Stability of poly(L-lysine)-complexed plasmid DNA during mechanical stress and DNase I treatment. *Pharmaceutical Development and Technology*, 4, 4: 491-498
- Capan Y., Woo B.H., Gebrekidan S., Ahmed S., DeLuca P.P. 1999b. Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA. *Journal of Controlled Release*, 60, 2-3: 279-286
- Capan Y., Woo B.H., Gebrekidan S., Ahmed S., DeLuca P.P. 1999c. Preparation and characterization of poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of poly(L-lysine) complexed plasmid DNA. *Pharmaceutical research*, 16, 4: 509-513
- Carlsson J., Drevin H., Axen R. 1978. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochemical Journal*, 173, 3: 723-737
- Cheng P.W. 1996. Receptor ligand-facilitated gene transfer: enhancement of liposome-mediated gene transfer and expression by transferrin. *Human Gene Therapy*, 7, 3: 275-282
- Cheng Y., Zak O., Aisen P., Harrison S.C., Walz T. 2004. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell*, 116, 4: 565-576
- Choe J., Kelker M.S., Wilson I.A. 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, 309, 5734: 581-585
- Citro G., Perrotti D., Cucco C., D'Agnano I., Sacchi A., Zupi G., Calabretta B. 1992. Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 89, 15: 7031-7035
- Colonna M., Trinchieri G., Liu Y.J. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology*, 5, 12: 1219-1226

- Commins S.P., Borish L., Steinke J.W. 2010. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 2: 53-72
- Conforti R., Ma Y., Morel Y., Paturel C., Terme M., Viaud S., Ryffel B., Ferrantini M., Uppaluri R., Schreiber R., Combadiere C., Chaput N., Andre F., Kroemer G., Zitvogel L. 2010. Opposing effects of toll-like receptor (TLR3) signaling in tumors can be therapeutically uncoupled to optimize the anticancer efficacy of TLR3 ligands. *Cancer Research*, 70, 2: 490-500
- Cooper C.L., Davis H.L., Morris M.L., Efler S.M., Adhami M.A., Krieg A.M., Cameron D.W., Heathcote J. 2004. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *Journal of Clinical Immunology*, 24, 6: 693-701
- Cotten M., Wagner E., Birnstiel M.L. 1993. Receptor-mediated transport of DNA into eukaryotic cells. *Methods in Enzymology*, 217: 618-644
- Deng L., Wang C., Spencer E., Yang L., Braun A., You J., Slaughter C., Pickart C., Chen Z.J. 2000. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, 103, 2: 351-361
- Dewan J.C., Mikami B., Hirose M., Sacchettini J.C. 1993. Structural evidence for a pH-sensitive dilysine trigger in the hen ovotransferrin N-lobe: implications for transferrin iron release. *Biochemistry*, 32, 45: 11963-11968
- Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis e Sousa C. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303, 5663: 1529-1531
- Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S.J., Moynihan J., Paw B.H., Drejer A., Barut B., Zapata A., Law T.C., Brugnara C., Lux S.E., Pinkus G.S., Pinkus J.L., Kingsley P.D., Palis J., Fleming M.D., Andrews N.C., Zon L.I. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, 403, 6771: 776-781
- Drakesmith H., Prentice A. 2008. Viral infection and iron metabolism. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 7: 541-552
- Duncan R. 1992. Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy. *Anticancer Drugs*, 3, 3: 175-210
- Ermolaeva M.A., Michallet M.C., Papadopoulou N., Utermohlen O., Kranidioti K., Kollias G., Tschopp J., Pasparakis M. 2008. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nature Immunology*, 9, 9: 1037-1046

- Finn O.J. 2008. Cancer immunology. *New England Journal of Medicine*, 358, 25: 2704-2715
- Fitzgerald K.A., McWhirter S.M., Faia K.L., Rowe D.C., Latz E., Golenbock D.T., Coyle A.J., Liao S.M., Maniatis T. 2003a. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature Immunology*, 4, 5: 491-496
- Fitzgerald K.A., Rowe D.C., Barnes B.J., Caffrey D.R., Visintin A., Latz E., Monks B., Pitha P.M., Golenbock D.T. 2003b. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adaptors TRAM and TRIF. *Journal of Experimental Medicine*, 198, 7: 1043-1055
- Funami K., Matsumoto M., Oshiumi H., Akazawa T., Yamamoto A., Seya T. 2004. The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *International Immunology*, 16, 8: 1143-1154
- Funami K., Sasai M., Ohba Y., Oshiumi H., Seya T., Matsumoto M. 2007. Spatiotemporal mobilization of Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1 in response to dsRNA. *Journal of Immunology*, 179, 10: 6867-6872
- Gay N.J., Gangloff M. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry*, 76: 141-165
- Gay N.J., Gangloff M., Weber A.N. 2006. Toll-like receptors as molecular switches. *Nature Reviews Immunology*, 6, 9: 693-698
- Gel Filtration: Principles and methods. 2010. Little Chalfont, Ge Healthcare Life Sciences. [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/226C564DBB7D5229C1257628001CD36F/\\$file/18102218AJ.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/226C564DBB7D5229C1257628001CD36F/$file/18102218AJ.pdf) (11. jun. 2010)
- Gilboa E. 2004. The promise of cancer vaccines. *Nature Reviews Cancer*, 4, 5: 401-411
- Gowen B.B., Wong M.H., Jung K.H., Sanders A.B., Mitchell W.M., Alexopoulou L., Flavell R.A., Sidwell R.W. 2007. TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules. *Journal of Immunology*, 178, 8: 5200-5208
- Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Thery C., Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 20: 621-667
- Guex N., Peitsch M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18, 15: 2714-2723
- Gunshin H., Mackenzie B., Berger U.V., Gunshin Y., Romero M.F., Boron W.F., Nussberger S., Gollan J.L., Hediger M.A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388, 6641: 482-488

- Guy B. 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 7: 505-517
- Hacker H., Redecke V., Blagoev B., Kratchmarova I., Hsu L.C., Wang G.G., Kamps M.P., Raz E., Wagner H., Hacker G., Mann M., Karin M. 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*, 439, 7073: 204-207
- Halperin S.A., Van Nest G., Smith B., Abtahi S., Whiley H., Eiden J.J. 2003. A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine*, 21, 19-20: 2461-2467
- Harrington L.E., Mangan P.R., Weaver C.T. 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Current Opinion in Immunology*, 18, 3: 349-356
- Hartmann G., Krieg A.M. 2000. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *Journal of Immunology*, 164, 2: 944-953
- Hashimoto C., Hudson K.L., Anderson K.V. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52, 2: 269-279
- Havenar-Daughton C., Kolumam G.A., Murali-Krishna K. 2006. Cutting Edge: The direct action of type I IFN on CD4 T cells is critical for sustaining clonal expansion in response to a viral but not a bacterial infection. *Journal of Immunology*, 176, 6: 3315-3319
- He L.Z., Crocker A., Lee J., Mendoza-Ramirez J., Wang X.T., Vitale L.A., O'Neill T., Petromilli C., Zhang H.F., Lopez J., Rohrer D., Keler T., Clynes R. 2007. Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *Journal of Immunology*, 178, 10: 6259-6267
- Heath W.R., Belz G.T., Behrens G.M., Smith C.M., Forehan S.P., Parish I.A., Davey G.M., Wilson N.S., Carbone F.R., Villadangos J.A. 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological Reviews*, 199: 9-26
- Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H., Bauer S. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303, 5663: 1526-1529
- Heinz S., Haehnel V., Karaghiosoff M., Schwarzfischer L., Muller M., Krause S.W., Rehli M. 2003. Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 24: 21502-21509
- Heit A., Huster K.M., Schmitz F., Schiemann M., Busch D.H., Wagner H. 2004. CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *Journal of Immunology*, 172, 3: 1501-1507

- Hemmi H., Kaisho T., Takeda K., Akira S. 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *Journal of Immunology*, 170, 6: 3059-3064
- 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
- Hermanson G.T. 2008. Bioconjugate techniques. 2nd ed. London, Academic press publications: 1202 str.
- Hoebe K., Du X., Georgel P., Janssen E., Tabeta K., Kim S.O., Goode J., Lin P., Mann N., Mudd S., Crozat K., Sovath S., Han J., Beutler B. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*, 424, 6950: 743-748
- Hoffmann J.A. 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*, 426, 6962: 33-38
- Huebers H.A., Finch C.A. 1987. The physiology of transferrin and transferrin receptors. *Physiological Reviews*, 67, 2: 520-582
- Human IL-6 ELISA: Product information and manual. 2007. Dunaj, Bender MedSystems. http://www.bendermedsystems.com/bm_products/MAN/213-2CE.pdf (10. jun. 2010)
- Ichinohe T., Watanabe I., Ito S., Fujii H., Moriyama M., Tamura S., Takahashi H., Sawa H., Chiba J., Kurata T., Sata T., Hasegawa H. 2005. Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *Journal of Virology*, 79, 5: 2910-2919
- Inoue T., Cavanaugh P.G., Steck P.A., Brunner N., Nicolson G.L. 1993. Differences in transferrin response and numbers of transferrin receptors in rat and human mammary carcinoma lines of different metastatic potentials. *Journal of Cellular Physiology*, 156, 1: 212-217
- Jacobs B.L., Langland J.O. 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology*, 219, 2: 339-349
- Janeway C.A., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20: 197-216
- Jefferies W.A., Brandon M.R., Hunt S.V., Williams A.F., Gatter K.C., Mason D.Y. 1984. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature*, 312, 5990: 162-163
- Jensen P.E. 2007. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nature Immunology*, 8, 10: 1041-1048

- Johnsen I.B., Nguyen T.T., Ringdal M., Tryggestad A.M., Bakke O., Lien E., Espevik T., Anthonen 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
- Jounai N., Takeshita F., Kobiyama K., Sawano A., Miyawaki A., Xin K.Q., Ishii K.J., Kawai T., Akira S., Suzuki K., Okuda K. 2007. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104, 35: 14050-14055
- Jung J., Yi A.K., Zhang X., Choe J., Li L., Choi Y.S. 2002. Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *Journal of Immunology*, 169, 5: 2368-2373
- Kaisho T., Akira S. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 5: 979-987
- Kanzler H., Barrat F.J., Hessel E.M., Coffman R.L. 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*, 13, 5: 552-559
- Kariko K., Ni H., Capodici J., Lamphier M., Weissman D. 2004. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 13: 12542-12550
- Kawai T., Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11, 5: 373-384
- Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751, 2: 119-139
- Kim T.G., Kang S.Y., Kang J.H., Cho M.Y., Kim J.I., Kim S.H., Kim J.S. 2004. Gene transfer into human hepatoma cells by receptor-associated protein/polylysine conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 15, 2: 326-332
- Klinman D.M. 2004. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nature Reviews Immunology*, 4, 4: 249-258
- Klinman D.M., Currie D., Gursel I., Verthelyi D. 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunological Reviews*, 199: 201-216
- Klinman D.M., Klaschik S., Tomaru K., Shirota H., Tross D., Ikeuchi H. 2010. Immunostimulatory CpG oligonucleotides: Effect on gene expression and utility as vaccine adjuvants. *Vaccine*, 28, 8: 1919-1923
- Kolumam G.A., Thomas S., Thompson L.J., Sprent J., Murali-Krishna K. 2005. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *Journal of Experimental Medicine*, 202, 5: 637-650

- Kono H., Rock K.L. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, 8, 4: 279-289
- Krieg A.M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*, 20: 709-760
- Krieg A.M. 2004. Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Current Oncology Reports*, 6, 2: 88-95
- Krieg A.M. 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 6: 471-484
- Krieg A.M., Davis H.L. 2001. Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 3, 1: 15-24
- Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374, 6522: 546-549
- Krishnamachari Y., Salem A.K. 2009. Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 3: 205-217
- Kumagai Y., Takeuchi O., Akira S. 2008. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 7: 795-804
- Kurts C., Robinson B.W., Knolle P.A. 2010. Cross-priming in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 10, 6: 403-414
- Kuwajima S., Sato T., Ishida K., Tada H., Tezuka H., Ohteki T. 2006. Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nature Immunology*, 7, 7: 740-746
- Lande R., Gregorio J., Facchinetti V., Chatterjee B., Wang Y.H., Homey B., Cao W., Su B., Nestle F.O., Zal T., Mellman I., Schroder J.M., Liu Y.J., Gilliet M. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 449, 7162: 564-569
- Lanzavecchia A., Sallusto F. 2005. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, 17, 3: 326-332
- Laske D.W., Illecl O., Akbasak A., Youle R.J., Oldfield E.H. 1994. Efficacy of direct intratumoral therapy with targeted protein toxins for solid human gliomas in nude mice. *Journal of Neurosurgery*, 80, 3: 520-526
- Latz E., Schoenemeyer A., Visintin A., Fitzgerald K.A., Monks B.G., Knetter C.F., Lien E., Nilsen N.J., Espevik T., Golenbock D.T. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology*, 5, 2: 190-198

- Lawrence C.M., Ray S., Babyonyshev M., Galluser R., Borhani D.W., Harrison S.C. 1999. Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science*, 286, 5440: 779-782
- Le Bon A., Etchart N., Rossmann C., Ashton M., Hou S., Gewert D., Borrow P., Tough D.F. 2003. Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nature Immunology*, 4, 10: 1009-1015
- Leibman A., Aisen P. 1979. Distribution of iron between the binding sites of transferrin in serum: methods and results in normal human subjects. *Blood*, 53, 6: 1058-1065
- Lemaitre B. 2004. The road to Toll. *Nature Reviews Immunology*, 4, 7: 521-527
- 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, 6: 973-983
- Li H., Qian Z.M. 2002. Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery. *Medicinal Research Reviews*, 22, 3: 225-250
- Li S., Strelow A., Fontana E.J., Wesche H. 2002. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99, 8: 5567-5572
- Liao W.P., Dehaven J., Shao J., Chen J.X., Rojanasakul Y., Lamm D.L., Ma J.K. 1998. Liposomal delivery of alpha-Interferon to murine bladder tumor cells via transferrin receptor-mediated endocytosis. *Drug Delivery*, 5, 2: 111-118
- Liew F.Y. 2002. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nature Reviews Immunology*, 2, 1: 55-60
- Lin L., Gerth A.J., Peng S.L. 2004. CpG DNA redirects class-switching towards "Th1-like" Ig isotype production via TLR9 and MyD88. *European Journal of Immunology*, 34, 5: 1483-1487
- Lin M.L., Zhan Y., Villadangos J.A., Lew A.M. 2008. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunology and Cell Biology*, 86, 4: 353-362
- 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
- Liu N., Ohnishi N., Ni L., Akira S., Bacon K.B. 2003. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nature Immunology*, 4, 7: 687-693
- Liu Y.J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annual Review of Immunology*, 23: 275-306

- Lucas M., Schachterle W., Oberle K., Aichele P., Diefenbach A. 2007. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*, 26, 4: 503-517
- Maire M., Parent R., Morand A.L., Alotte C., Treppe C., Durantel D., Petit M.A. 2008. Characterization of the double-stranded RNA responses in human liver progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368, 3: 556-562
- Manegold C., Gravenor D., Woytowitz D., Mezger J., Hirsh V., Albert G., Al-Adhami M., Readett D., Krieg A.M., Leichman C.G. 2008. Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26, 24: 3979-3986
- Martinez-Fong D., Navarro-Quiroga I., Ochoa I., Alvarez-Maya I., Meraz M.A., Luna J., Arias-Montano J.A. 1999. Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells. *Molecular Brain Research*, 69, 2: 249-262
- Matsumoto M., Funami K., Tanabe M., Oshiumi H., Shingai M., Seto Y., Yamamoto A., Seya T. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *Journal of Immunology*, 171, 6: 3154-3162
- 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, 5: 1364-1369
- Matsumoto M., Seya T. 2008. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 7: 805-812
- Maurer T., Heit A., Hochrein H., Ampenberger F., O'Keeffe M., Bauer S., Lipford G.B., Vabulas R.M., Wagner H. 2002. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 32, 8: 2356-2364
- McHeyzer-Williams L.J., McHeyzer-Williams M.G. 2005. Antigen-specific memory B cell development. *Annual Review of Immunology*, 23: 487-513
- McKie A.T., Barrow D., Latunde-Dada G.O., Rolfs A., Sager G., Mudaly E., Mudaly M., Richardson C., Barlow D., Bomford A., Peters T.J., Raja K.B., Shirali S., Hediger M.A., Farzaneh F., Simpson R.J. 2001. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, 291, 5509: 1755-1759
- Medzhitov R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449, 7164: 819-826
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A., Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 6640: 394-397

- Melief C.J. 2008. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity*, 29, 3: 372-383
- Meylan E., Burns K., Hofmann K., Blancheteau V., Martinon F., Kelliher M., Tschopp J. 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nature Immunology*, 5, 5: 503-507
- Moldoveanu Z., Love-Homan L., Huang W.Q., Krieg A.M. 1998. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine*, 16, 11-12: 1216-1224
- Mosmann T.R., Sad S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*, 17, 3: 138-146
- Muller U., Steinhoff U., Reis L.F., Hemmi S., Pavlovic J., Zinkernagel R.M., Aguet M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 264, 5167: 1918-1921
- Muzio M., Bosisio D., Polentarutti N., D'Amico G., Stoppacciaro A., Mancinelli R., van't Veer C., Penton-Rol G., Ruco L.P., Allavena P., Mantovani A. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *Journal of Immunology*, 164, 11: 5998-6004
- Nemazee D. 2006. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 6, 10: 728-740
- Ogris M., Brunner S., Schuller S., Kircheis R., Wagner E. 1999. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Therapy*, 6, 4: 595-605
- Orinska Z., Bulanova E., Budagian V., Metz M., Maurer M., Bulfone-Paus S. 2005. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood*, 106, 3: 978-987
- Oshiumi H., Matsumoto M., Funami K., Akazawa T., Seya T. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nature Immunology*, 4, 2: 161-167
- Park B., Brinkmann M.M., Spooner E., Lee C.C., Kim Y.M., Ploegh H.L. 2008. Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nature Immunology*, 9, 12: 1407-1414
- Pirher N., Ivicak K., Pohar J., Bencina M., Jerala R. 2008. A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15, 7: 761-763
- Polyethylenimine - Transferrinfection Kit (Tf PEI-Kit). 2004. Dunaj, Bender MedSystems. http://www.bendermedsystems.com/bm_products/MAN/1003.pdf (19. jun. 2010)

- Powell M.F. 1996. Drug delivery issues in vaccine development. *Pharmaceutical research*, 13, 12: 1777-1785
- Pulendran B., Ahmed R. 2006. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*, 124, 4: 849-863
- Putta M.R., Zhu F.G., Wang D., Bhagat L., Dai M., Kandimalla E.R., Agrawal S. 2010. Peptide conjugation at the 5'-end of oligodeoxynucleotides abrogates toll-like receptor 9-mediated immune stimulatory activity. *Bioconjugate Chemistry*, 21, 1: 39-45
- Qian Z.M., Li H., Sun H., Ho K. 2002. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacological Reviews*, 54, 4: 561-587
- Querec T., Bennouna S., Alkan S., Laouar Y., Gorden K., Flavell R., Akira S., Ahmed R., Pulendran B. 2006. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 203, 2: 413-424
- Querec T.D., Pulendran B. 2007. Understanding the role of innate immunity in the mechanism of action of the live attenuated Yellow Fever Vaccine 17D. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 590, 43-53
- Ramakrishna V., Treml J.F., Vitale L., Connolly J.E., O'Neill T., Smith P.A., Jones C.L., He L.Z., Goldstein J., Wallace P.K., Keler T., Endres M.J. 2004. Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules. *Journal of Immunology*, 172, 5: 2845-2852
- Richardson D.R., Ponka P. 1997. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1331, 1: 1-40
- Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 95, 2: 588-593
- Rutz M., Metzger J., Gellert T., Lippa P., Lipford G.B., Wagner H., Bauer S. 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *European Journal of Immunology*, 34, 9: 2541-2550
- Salaun B., Coste I., Rissoan M.C., Lebecque S.J., Renno T. 2006. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *Journal of Immunology*, 176, 8: 4894-4901
- Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual Review of Immunology*, 22: 745-763

- Sands H., Gorey-Feret L.J., Cocuzza A.J., Hobbs F.W., Chidester D., Trainor G.L. 1994. Biodistribution and metabolism of internally ³H-labeled oligonucleotides. I. Comparison of a phosphodiester and a phosphorothioate. *Molecular Pharmacology*, 45, 5: 932-943
- Schulz O., Diebold S.S., Chen M., Naslund T.I., Nolte M.A., Alexopoulou L., Azuma Y.T., Flavell R.A., Liljestrom P., Reis e Sousa C. 2005. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*, 433, 7028: 887-892
- Seya T., Akazawa T., Tsujita T., Matsumoto M. 2006. Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 3, 1: 31-38; discussion 133-137
- Seya T., Matsumoto M. 2009. The extrinsic RNA-sensing pathway for adjuvant immunotherapy of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 58, 8: 1175-1184
- Seya T., Shime H., Ebihara T., Oshiumi H., Matsumoto M. 2010. Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor immunotherapy. *Cancer Science*, 101, 2: 313-320
- Shi C.S., Kehrl J.H. 2008. MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 48: 33175-33182
- Singh M., Atwal H., Micetich R. 1998. Transferrin directed delivery of adriamycin to human cells. *Anticancer Research*, 18, 3A: 1423-1427
- Sizensky J.A., Barabas K., Faulk W.P. 1992. Characterization of the anti-cancer activity of transferrin-adriamycin conjugates. *American Journal of Reproductive Immunology*, 27, 3-4: 163-166
- Sparwasser T., Vabulas R.M., Villmow B., Lipford G.B., Wagner H. 2000. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *European Journal of Immunology*, 30, 12: 3591-3597
- Sun H., Li H., Sadler P.J. 1999. Transferrin as a metal ion mediator. *Chemical Reviews*, 99, 9: 2817-2842
- Tabiasco J., Devedre E., Rufer N., Salaun B., Cerottini J.C., Speiser D., Romero P. 2006. Human effector CD8⁺ T lymphocytes express TLR3 as a functional coreceptor. *Journal of Immunology*, 177, 12: 8708-8713
- Takaoka A., Yanai H., Kondo S., Duncan G., Negishi H., Mizutani T., Kano S., Honda K., Ohba Y., Mak T.W., Taniguchi T. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 434, 7030: 243-249
- Takeda K., Kaisho T., Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology*, 21: 335-376

Team Slovenia: Immunobricks. 2008. Boston, iGEM 2008.

<http://2008.igem.org/Team:Slovenia> (28. apr. 2010)

Tighe H., Takabayashi K., Schwartz D., Marsden R., Beck L., Corbeil J., Richman D.D., Eiden J.J., Jr., Spiegelberg H.L., Raz E. 2000a. Conjugation of protein to immunostimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity. *European Journal of Immunology*, 30, 7: 1939-1947

Tighe H., Takabayashi K., Schwartz D., Van Nest G., Tuck S., Eiden J.J., Kagey-Sobotka A., Creticos P.S., Lichtenstein L.M., Spiegelberg H.L., Raz E. 2000b. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106, 1 Pt 1: 124-134

Trombetta E.S., Mellman I. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology*, 23: 975-1028

Turner S.J., Doherty P.C., McCluskey J., Rossjohn J. 2006. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6, 12: 883-894

Vercammen E., Staal J., Beyaert R. 2008. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 1: 13-25

Vulpe C.D., Kuo Y.M., Murphy T.L., Cowley L., Askwith C., Libina N., Gitschier J., Anderson G.J. 1999. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature Genetics*, 21, 2: 195-199

Vyas J.M., Van der Veen A.G., Ploegh H.L. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, 8, 8: 607-618

Wagner E., Cotten M., Foisner R., Birnstiel M.L. 1991. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 88, 10: 4255-4259

Wagner E., Zenke M., Cotten M., Beug H., Birnstiel M.L. 1990. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 87, 9: 3410-3414

Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G.R., Inoue J., Chen Z.J. 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 412, 6844: 346-351

Wang J., Sun R., Wei H., Dong Z., Gao B., Tian Z. 2006. Poly I:C prevents T cell-mediated hepatitis via an NK-dependent mechanism. *Journal of Hepatology*, 44, 3: 446-454

Weeratna R., Comanita L., Davis H.L. 2003. CPG ODN allows lower dose of antigen against hepatitis B surface antigen in BALB/c mice. *Immunology and Cell Biology*, 81, 1: 59-62

- Wesch D., Beetz S., Oberg H.H., Marget M., Krenzel K., Kabelitz D. 2006. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *Journal of Immunology*, 176, 3: 1348-1354
- Xie H., Gursel I., Ivins B.E., Singh M., O'Hagan D.T., Ulmer J.B., Klinman D.M. 2005. CpG oligodeoxynucleotides adsorbed onto polylactide-co-glycolide microparticles improve the immunogenicity and protective activity of the licensed anthrax vaccine. *Infection and Immunity*, 73, 2: 828-833
- Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., Takeuchi O., Sugiyama M., Okabe M., Takeda K., Akira S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301, 5633: 640-643
- Yi A.K., Chang M., Peckham D.W., Krieg A.M., Ashman R.F. 1998. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *Journal of Immunology*, 160, 12: 5898-5906
- Zaks K., Jordan M., Guth A., Sellins K., Kedl R., Izzo A., Bosio C., Dow S. 2006. Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *Journal of Immunology*, 176, 12: 7335-7345
- Zenke M., Steinlein P., Wagner E., Cotten M., Beug H., Birnstiel M.L. 1990. Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 87, 10: 3655-3659
- Zhang X.Q., Dahle C.E., Weiner G.J., Salem A.K. 2007. A comparative study of the antigen-specific immune response induced by co-delivery of CpG ODN and antigen using fusion molecules or biodegradable microparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 12: 3283-3292

ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorju prof. dr. Romanu Jerali, saj brez njega diplomsko delo ne bi nastalo. Omogočil mi je delo v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu in kot vedno, poln svežih in inovativnih idej, našel področje, ki me najbolj zanima. Med delom mi je ves čas stal ob strani, nudil strokovno pomoč in me spodbujal. Vsakokrat si je vzel čas za pogovor o novih rezultatih in premislek o najbolj smiselnem nadaljevanju dela, na koncu pa mi je v zelo kratkem času natančno pregledal diplomsko nalogo. Znanja in izkušnje, ki sem jih pridobil pod vašim mentorstvom so neprecenljiva. Kot sem vam že večkrat povedal, mi je v čast in veselje sodelovati z vami!

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Simonu Horvatu, ki mi je bil vedno pripravljen pomagati, njegove spodbudne besede pa so mi vsakokrat vlile nov zagon. Zahvaljujem se mu za izredno temeljit in kritičen pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Gregorju Anderluhu za izredno hiter in natančen pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se mladi raziskovalki Nini Pirher, saj mi je ves čas med delom v laboratoriju in pisanjem diplomske naloge potrpežljivo stala ob strani. Seznanila me je z novimi metodami, postopki in delom z zahtevnimi napravami, poleg tega mi je pomagala načrtovati poskuse. Rezultatov mikroskopiranja in testov ELISE brez nje ne bi bilo. Poleg tega mi je bila vsakokrat pripravljena pomagati pri reševanju vsakršnih težav, povezanih z delom za diplomsko nalogo. Nina, hvala za vse!

Zahvaljujem se mladi raziskovalki Alenki Kužnik, ki mi je s svojim izrednim znanjem pomagala tako pri snovanju idej, izbiri literature kot pri praktičnem delu. Alenka, hvala ti za vso potrpežljivost, spodbudo in prijaznost!

Posebna zahvala gre Robertu Bremšaku, ki me je potrpežljivo uvedel v delo z gelsko filtracijo. Poleg tega vsi v laboratoriju L-12 vemo, da so njegovi nasveti in široko znanje v zvezi z kakršnimkoli delom s proteini neprecenljivi. Robert, hvala ti za vso dobro voljo in motivacijo tekom dela. Upam, da bom še dolgo lahko tvoj vajenec!

Zahvaljujem se dr. Mateji Manček Keber, ki me je potrpežljivo uvedla v delo v celičnem laboratoriju.

Zahvaljujem se dr. Jerneju Gašperšiču, ki mi je vsakokrat prijazno in potrpežljivo pomagal pri praktičnem delu, predvsem pri gelski filtraciji in cirkularnem dikroizmu. Poleg tega je bil vedno odprt za kritično razpravo o delu in rezultatih, njegovi nasveti pa so mi bili v veliko pomoč.

Zahvaljujem se Matevžu Avblju, ki me je prijazno in potrpežljivo uvajal v delo s cirkularnim dikroizmom.

Zahvaljujem se Dariji Oven in Ireni Škraba, ki sta mi z veliko dobre volje in potrpežljivosti ogromno pomagali v zvezi z delom v laboratoriju.

Zahvaljujem se vsem zaposlenim v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu za izredno prijaznost, potrpežljivost, pomoč in prijetno delovno okolje.

Zahvaljujem se prof. dr. Katarini Košmelj za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Zahvaljujem se dr. Nataši Siard za pregled oblikovanja diplomske naloge.

Zahvaljujem se Karmeli Malinger za pregled angleškega izvlečka diplomske naloge.

Zahvaljujem se Nevenki Valič in Ljubi Primožič Vrhovac za prijaznost in ustrežljivost v zvezi s formalno platjo nastajanja diplomskega dela.

Zahvaljujem se vsem sošolkam in sošolcem ter profesorici in profesorjem dodiplomskega študija Biotehnologije na Biotehniški fakulteti, s katerimi smo preživeli izredno lepo obdobje, ki je žal prehitro minilo. Hvala za vso spodbudo!

Zahvaljujem se vsem, ki so na kakršenkoli način sodelovali pri nastajanju diplomskega dela.

Na posebnem mestu se zahvaljujem svoji puncici Sari, saj mi najin krasni veliki svet omogoča razvijanje ljubezni do znanosti in uspešnost na strokovnem področju. Zahvaljujem se ti tudi za natančen pregled slovnične plati diplomske naloge.

Posebna zahvala gre seveda mojim staršem in bratu ter vsem bližnjim, ki so mi ves čas potrpežljivo stali ob strani in mi nudili brezpogojno podporo.

PRILOGE

Priloga A: Razlaga statistične obdelave podatkov

Statistično obdelavo podatkov smo naredili s programom Excel z orodjem za analizo podatkov *t*-test in sicer smo preizkušali domnevo o razliki povprečij v primeru različnih varianc (ang. »*t*-test: Two-sample assuming unequal variances«) pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$. Upoštevali smo dvostransko alternativno domnevo. Pri rezultatih smo uporabili tudi vrednost *P*.

Statistično obdelavo smo v vseh primerih naredili na enak način, razložili pa smo jo na primeru slike 48 v poglavju Rezultati, kjer smo z merjenjem luciferazne aktivnosti (RLU) želeli pokazati, da je aktivacija receptorja TLR3 s kompleksi PLL/poli(I:C) po inkubaciji z RNazo večja kot v primeru proste poli(I:C), saj naj bi PLL zaščitil poli(I:C) pred razgradnjo.

Excelovo orodje za analizo podatkov nam ob izboru niza podatkov med dvema neodvisnima vzorcema poda tabelo, kjer so med drugim izračunane stopinje prostosti, vzorčna *t*-statistika, mejna vrednost *t*-statistike pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$ in *P*-vrednost.

V našem primeru smo primerjali po 3 meritve za vsak vzorec. Izračunane stopinje prostosti so znašale 2, mejna vrednost *t*-statistike 4,302, izračunana vzorčna *t*-statistika pa 19,54. *P* vrednost je bila 0,0026.

S tveganjem, manjšim od 0,05, trdimo, da povprečni vrednosti RLU za komplekse PLL/poli(I:C) in prosto poli(I:C) po razgradnji z RNazo nista enaki ($P = 0,0026$).

Priloga B:

Izvorni protokol za testiranje količine IL-6 v supernatantih celic HMVEC-dLy Ad s komercialnim testom ELISA (Human IL-6 ...2007: 36)

1. Determine the number of microwell strips required.
2. Wash microwell strips twice with Wash Buffer.
3. Standard dilution on the microwell plate: Add 100 µl Assay Buffer (1x), in duplicate, to all standard wells. Pipette 100 µl prepared standard into the first wells and create standard dilutions by transferring 100 µl from well to well. Discard 100 µl from the last wells.
Alternatively external standard dilution in tubes (see 9.5.1): Pipette 100 µl of these standard dilutions in the microwells.
4. Add 100 µl Assay Buffer (1x), in duplicate, to the blank wells.
5. Add 50 µl Assay Buffer (1x) to sample wells.
6. Add 50 µl sample in duplicate, to designated sample wells.
7. Prepare Biotin-Conjugate.
8. Add 50 µl Biotin-Conjugate to all wells.
9. Cover microwell strips and incubate 2 hours at room temperature (18° to 25°C).
10. Prepare Streptavidin-HRP.
11. Empty and wash microwell strips 4 times with Wash Buffer.
12. Add 100 µl diluted Streptavidin-HRP to all wells.
13. Cover microwell strips and incubate 1 hours at room temperature (18° to 25°C).
14. Empty and wash microwell strips 4 times with Wash Buffer.
15. Add 100 µl of TMB Substrate Solution to all wells.
16. Incubate the microwell strips for about 10 minutes at room temperature (18° to 25°C).
17. Add 100 µl Stop Solution to all wells.
18. Blank microwell reader and measure colour intensity at 450 nm.

Note: If instructions in this protocol have been followed samples have been diluted 1:2 (50 µl sample + 50 µl Assay (1x)), the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor (x 2).

Priloga C:
Ločevanje konjugatov Tf-PLL z gelsko filtracijo brez prisotnosti GndCl

Kromatogram prikazuje ločevanje konjugatov Tf-PLL z gelsko filtracijo brez prisotnosti 1,5 M GndCl. Visok vrh predstavlja Tf, zbirali pa smo frakcije, ki so na kromatogramu obkrožene. Ko smo zbrane vzorce testirali z NaDS-PAGE, smo opazili, da se na NaDS gelu v ne-reducirajočih pogojih (vzorec 1) pojavita 2 lisi. Sklepali smo, da lisi ne predstavljata konjugata Tf-PLL, saj zaradi močno pozitivnega naboja in velike molekulske mase ne bi smel potovati v gel. V reducirajočih pogojih lisi izgineta, pojavi pa se lisa, ki ustreza velikosti Tf (vzorec 2). Da bi se preverili, ali je v konjugatih prisoten PLL smo naredili test zmanjšane mobilnosti DNK na gelu in ugotovili, da ne pride do zaustavitve gibanja. Zato smo sklepali, da smo z gelsko filtracijo izolirali dimer in trimer Tf, saj sta velikosti glede na standard primerni. Izolacija torej ni bila uspešna. Predvidevali smo, da je prišlo do interakcij med PLL in stacionarno fazo kolone, zato se konjugati niso eluirali. Zato smo spremenili protokol in v pufer za gelsko filtracijo dodali 1,5 M GndCl, ki je omogočil uspešno ločevanje (slika 36 v poglavju Rezultati).

