

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Monika CIGLIČ

**VPLIV SPREMEMB PROTEINA MyD88 NA
SIGNALIZACIJO TOLLU-PODOBNIH
RECEPTORJEV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Monika CIGLIČ

**VPLIV SPREMEMB PROTEINA MyD88 NA SIGNALIZACIJO
TOLLU-PODOBNIH RECEPTORJEV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF MODIFICATION OF PROTEIN MyD88 ON TOLL-
LIKE RECEPTOR SIGNALING**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

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

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

Mentor: prof. dr. Gregor Anderluh

Somentor: prof. dr. Roman Jerala

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Roman JERALA
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biotehnologijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Monika Ciglič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 616-097 : 577.2.086/.089 (043)=863
KG	imunski sistem/prirojena imunost/receptor TLR4/protein MyD88/inhibicija signalizacijske poti
AV	CIGLIČ, Monika
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)/JERALA, Roman (somentor)/TURK, Tom (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2007
IN	VPLIV SPREMEMB PROTEINA MyD88 NA SIGNALIZACIJO TOLLU- PODOBNIH RECEPTORJEV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XVIII, 80 str., 29 pregl., 30 sl., 2 pril., 49 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Celice, ki sodelujejo pri prirojenem imunskem odzivu, na svoji površini izražajo Tollu-podobne receptorje (TLR), ki prepoznajo različne molekule patogenih mikrobov. TLR4 v kompleksu z diferenciacijskim mieloidnim proteinom 2 (MD-2) spozna lipopolisaharid po Gramu negativnih bakterij, kar sproži znotrajcelično signalno pot, ki vodi v sintezo vnetnih citokinov. Citosolna domena Toll-interlevkinskega receptorja (TIR) receptorja TLR4 predstavlja začetek znotrajcelične signalne poti; nanjo se prek svojih domen TIR vežejo adapterski proteini. Diferenciacijski mieloidni protein 88 (MyD88) je adapter, zgrajen iz domene smrti (DD) in domene TIR, in predstavlja osrednjo molekulo signaliziranja pri večini receptorjev TLR. Neustrezna regulacija imunskega sistema lahko sproži resno bolezensko stanje, imenovano sepsa, sodeluje pa tudi pri kroničnih vnetnih boleznih, kot sta revmatoidni artritis in kolitis, ter tudi pri razvoju raka. Pri teh boleznih lahko inhibicija signalizacije predstavlja koristno terapijo. Dominantno negativen MyD88 (dnMyD88) vsebuje zgolj domeno TIR in povzroči inhibicijo signalne poti, saj je prisotnost domene DD potrebna za nadaljnji prenos signala v signalni poti. Želeli smo ugotoviti, kako različne modifikacije proteina MyD88 vplivajo na signalno pot preko TLR4/MD-2. Ugotovili smo, da dodatek C-terminalnega kationskega peptida, ki preko vezave na membranski fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat sicer izboljša signalizacijo preko MyD88, ne vpliva na inhibicijo oziroma jo celo zmanjša. Povezava med MyD88 in TLR4 se vzpostavi ob membrani. Zato smo predvidevali, da fuzija na N-terminalni strani (na isti strani, kot je domena DD v izvornem MyD88) ne bo imela vpliva na inhibicijo, dodatek na C-terminalni strani pa bo preprečil inhibicijo. Naši eksperimenti so potrdili to hipotezo in rezultati lahko vodijo v razvoj še učinkovitejših inhibitorjev vnetja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 616-097 : 577.2.086/.089 (043)=863
 CX immune system/innate immunity/receptor TLR4/protein MyD88/inhibition of signaling pathway
 AU CIGLIČ, Monika
 AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)/ JERALA, Roman (co - advisor)/ TURK, Tom (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2007
 TI THE EFFECT OF MODIFICATION OF PROTEIN MyD88 ON TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALING
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XVIII, 80 p., 29 tab., 30 fig., 2 ann., 49 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Cells participating in the innate immune response express Toll-like receptors (TLR) on their surface, which recognize different molecular components of pathogens. TLR4 in complex with myeloid differentiation protein 2 (MD-2) recognizes lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria, and triggers intracellular signaling pathway resulting in the production of inflammatory cytokines. The intracellular Toll-interleukin receptor (TIR) domain of the TLR4 receptor indicates the beginning of the signaling pathway. It interacts with the TIR domains of adapter proteins. Myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88), an adapter protein composed of a TIR and a death domain (DD), is a central molecule in most TLR signaling pathways. Excessive stimulation of immune system can result in sepsis (a potentially lethal condition). Further, TLR receptors are supposed to be involved also in the development of chronic inflammatory disorders, such as rheumatoid arthritis, colitis, and cancer. The inhibitors of signaling pathways involved in the development of these diseases have potential in therapeutic use. Dominant negative MyD88 (dnMyD88) contains only the TIR domain of MyD88, and causes inhibition of the signaling pathway since DD domain of protein MyD88 is responsible for downstream signaling. Thus, we have decided to test the effect of different forms of MyD88 on TLR4/MD-2 signaling pathway. We made several types of dnMyD88. Our experiments have shown that the binding of dnMyD88 to the cell membrane with a C-terminal phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding peptide, which enhances signaling through MyD88, has no effect on the inhibition of the signaling pathway or even decreases it. Next, we tested, if protein fusions with dnMyD88 affect its inhibition ability. As MyD88 and TLR4 interact very closely to the membrane, we presumed that fusions on the N-terminal of dnMyD88 (DD domain in MyD88 is on N-terminal side) would have no effect on inhibition, whereas fusions on C-terminal side would decrease it. Our experiments have confirmed this hypothesis. Hence, the results can lead to the development of more effective inflammatory inhibitors.

KAZALO VSEBINE

	stran
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG.....	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
SLOVARČEK	XVII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 IMUNSKI SISTEM	3
2.2 SIGNALNA POT RECEPTORJEV TLR	3
2.2.1 ODKRITJE RECEPTORJEV TOLL IN TLR.....	3
2.2.2 RECEPTOR TLR4	5
2.2.3 ZNOTRAJCELIČNA SIGNALNA POT RECEPTORJA TLR4.....	7
2.2.3.1 Od MyD88 odvisna pot aktivacije.....	8
2.2.3.2 Od MyD88 neodvisna oziroma od TRIF odvisna pot aktivacije.....	9
2.2.3.3 Družina adapterskih proteinov	11
2.2.3.3.1 Domena TIR	11
2.2.3.3.2 MyD88 in Mal/TIRAP	13

2.2.3.3.3	TRIF in TRAM.....	15
2.3	SPREMINJANJE SIGNALNE POTI RECEPTORJEV TLR	16
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	MATERIALI.....	18
3.1.1	KEMIKALIJE	18
3.1.2	UPORABLJENE RAZTOPINE, PUFRI IN STANDARDI	19
3.1.3	LABORATORIJSKA OPREMA	21
3.1.4	UPORABLJENA PROTITELESA	21
3.1.5	PLAZMIDI	22
3.1.6	OLIGONUKLEOTIDI ZA VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO	24
3.1.7	ORGANIZMI	25
3.1.7.1	Bakterijski sevi	25
3.1.7.2	Celične kulture.....	25
3.1.8	GOJIŠČA.....	25
3.1.8.1	Gojenje <i>E. coli</i>.....	25
3.2	METODE	27
3.2.1	STERILIZACIJA RAZTOPIN, GOJIŠČ IN STEKLOVINE	27
3.2.2	OSNOVNE METODE MOLEKULARNEGA KLONIRANJA.....	27
3.2.2.1	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	27
3.2.2.2	Elektroforeza DNK na agaroznem gelu.....	29
3.2.2.3	Čiščenje pomnožkov PCR po verižni reakciji s polimerazo.....	30
3.2.2.4	Izolacija fragmentov DNK iz agaroznih gelov.....	30
3.2.2.5	Cepitev DNK z restrikcijskimi encimi.....	30
3.2.2.6	Ligacija	31
3.2.2.7	Kemijska transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5α.....	32
3.2.2.8	Izolacija plazmidne DNK.....	32
3.2.2.8.1	Izolacija plazmidne DNK v manjših količinah – mini prep	32
3.2.2.8.2	Izolacija plazmidne DNK s komercialno dostopnim kompletom	33
3.2.2.8.3	Izolacija plazmidne DNK, ki ne vsebuje endotoksina.....	33
3.2.2.8.4	Določanje koncentracije nukleinskih kislin.....	34
3.2.2.9	Določanje nukleotidnega zaporedja.....	34

3.2.3	DELO V CELIČNEM LABORATORIJU	34
3.2.3.1	Gojenje človeških celičnih kultur HEK293 in HEK293T	34
3.2.3.2	Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293 in HEK293T	35
3.2.3.3	Stimulacija in liza transficiranih celic HEK293 in HEK293T	36
3.2.4	MERJENJE LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI	36
3.2.5	DOLOČANJE IZRAŽANJA PROTEINOV	37
3.2.5.1	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS-PAGE)	37
3.2.5.2	Prenos western	38
3.2.5.3	Imunodetekcija proteinov po prenosu western.....	38
4	REZULTATI	40
4.1	PREGLED OSNOVNEGA POTEKA EKSPERIMENTOV	40
4.2	REZULTATI REAKCIJE POMNOŽEVANJA S POLIMERAZO.....	42
4.2.1	NAČRTOVANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA POSAMEZNE GENSKE KONSTRUKTE.....	42
4.2.2	PRODUKTI POMNOŽEVANJA S POLIMERAZO	45
4.3	RESTRIKCIJA GENSKIH PRODUKTOV IN VEKTORJA	47
4.4	NADALJNJE FAZE MOLEKULARNEGA KLONIRANJA	48
4.5	REZULTATI DOKAZOVANJA IZRAŽANJA PROTEINOV	50
4.6	REZULTATI MERJENJA LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI.....	52
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	67
5.1	RAZPRAVA.....	67
5.1.1	KOMENTAR REZULTATOV LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI	67
5.1.2	KOMENTAR REZULTATOV DOKAZOVANJA IZRAŽANJA PROTEINOV	70
5.1.3	POTENCIALNA UPORABA REZULTATOV	71
5.1.4	NADALJNJE RAZISKAVE	71
5.2	SKLEPI	73
6	POVZETEK.....	74

VIRI	75
-------------------	-----------

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	stran
Preglednica 1: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti, uporabljeni v diplomskem delu.	18
Preglednica 2: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri detekciji proteinov.	19
Preglednica 3: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri izdelavi DNK-konstruktov, pri merjenju luciferazne aktivnosti ter pri delu v celičnem laboratoriju.	20
Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema.	21
Preglednica 5: Uporabljena protitelesa.	21
Preglednica 6: Uporabljeni plazmidi.	22
Preglednica 7: Oligonukleotidi, uporabljeni v diplomskem delu.	24
Preglednica 8: Uporabljen sev bakterije <i>Escherichia coli</i>	25
Preglednica 9: Uporabljene celične kulture.	25
Preglednica 10: Tekoče gojišče LB za bakterije.	25
Preglednica 11: Trdno gojišče LB za bakterije.	26
Preglednica 12: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNK-polimerazo AccuPrime <i>Pfx</i>	28
Preglednica 13: Temperaturni program PCR pri uporabi DNK-polimeraze AccuPrime <i>Pfx</i>	28
Preglednica 14: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNK-polimerazo <i>Pfx</i>	28
Preglednica 15: Program PCR pri uporabi DNK-polimeraze <i>Pfx</i>	29
Preglednica 16: Pregled PCR-reakcij.	44
Preglednica 17: Približne velikosti proteinskih konstruktov.	50
Preglednica 18: Načrt transfekcije za dokazovanje proteinske sinteze MyD88-AU in Rluc-dnMyD88.	50
Preglednica 19: Načrt transfekcije za poskus ugotavljanja ustrezne količine dnMyD88, pri kateri pride do inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti.	53
Preglednica 20: Rezultati merjenja luciferazne aktivnosti za poskus ugotavljanja ustrezne količine dnMyD88, pri kateri pride do inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti.	54

Preglednica 21: Načrt transfekcije pri ugotavljanju vpliva proteinov dnMyD88-Rluc in Rluc-dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.	56
Preglednica 22: Rezultati merjenja aktivnosti <i>Renilla</i> luciferaze pri poskusu ugotavljanja vpliva proteinov dnMyD88-Rluc in Rluc-dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.	57
Preglednica 23: Rezultati merjenja aktivnosti kresničkine luciferaze pri poskusu ugotavljanja vpliva proteinov dnMyD88-Rluc in Rluc-dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.	57
Preglednica 24: Načrt transfekcije pri ugotavljanju vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.	60
Preglednica 25: Rezultati merjenja luciferazne aktivnosti pri poskusu ugotavljanja vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.	60
Preglednica 26: Načrt transfekcije pri ugotavljanju inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti pri nestimuliranih celicah ter ugotavljanje najmanjše potrebne količine receptorja TLR4 in proteina MD-2 za aktivacijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti.	62
Preglednica 27: Rezultati merjenja luciferazne aktivnosti pri poskusu ugotavljanja inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti pri nestimuliranih celicah ter pri ugotavljanju najmanjše potrebne količine receptorja TLR4 in proteina MD-2 za aktivacijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti.	62
Preglednica 28: Načrt transfekcije pri ponovnem ugotavljanju vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.	64
Preglednica 29: Rezultati merjenja luciferazne aktivnosti pri poskusu ponovnega ugotavljanja vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.	65

KAZALO SLIK

	stran
Slika 1: Osnovna zgradba receptorja Toll (a) in receptorja TLR (b) (Gay in sod., 2006: 694).....	4
Slika 2: Primer zgradbe lipopolisaharida (Wyckoff in sod., 1998: 155).....	6
Slika 3: Prepoznavanje LPS v organizmu (Miyake, 2004: 188).	7
Slika 4: Od MyD88 odvisna in neodvisna pot aktivacije signalne poti receptorjev TLR (Akira in Takeda, 2004: 504).	10
Slika 5: Domena TIR proteina MyD88 (Li in sod., 2005: 26158).	12
Slika 6: Poenostavljena shema zgradbe proteina MyD88 (Medzhitov in sod., 1998: 254).	13
Slika 7: Shematsko prikazana zgradba adapterskega proteina Mal/TIRAP z zaporedjem kationskega PIP2-vezavnega peptida (Kagan in Medzhitov, 2006: 944).....	14
Slika 8: Shematsko prikazana zgradba adapterskega proteina TRIF (Yamamoto in sod., 2002: 6669).....	15
Slika 9: Shematsko prikazana zgradba adapterskega proteina TRAM (Rowe in sod., 2006: 6300).....	16
Slika 10: Shema vektorja pcDNA3 z obkroženima uporabljenima restrikcijskima mestoma za vstavljanje rezanih insertov.....	23
Slika 11: Shema vektorja pGL2 z vstavljenim NF- κ B-odvisnim promotorjem in označenimi najpomembnejšimi restrikcijskimi mesti.	23
Slika 12: Poenostavljena shema osnovnega poteka eksperimentov.	41
Slika 13: Shema načrtovanja pomnoževanja genskega konstrukta dnMyD88-Rluc (začetni oligonukleotidi so označeni s polovičnimi puščicami).....	43
Slika 14: Shema načrtovanja pomnoževanja genskega konstrukta dnMyD88-PIP2 (začetni oligonukleotidi so označeni s polovičnimi puščicami).....	44
Slika 15: Slika 1,1-odstotnega agaroznega gela s produkti PCR-reakcij 1, 3, 7, 10.	45
Slika 16: Slika agaroznega gela s produkti PCR-reakcij 2, 4, 7, 8.....	46
Slika 17: Slika 0,8-odstotnega agaroznega gela z rezanim vektorjem pcDNA3.....	47
Slika 18: Slika 1,2-odstotnega agaroznega gela prikazuje primer kontrolne restrikcije.	49

Slika 19: Detekcija proteina MyD88-AU z 1 : 900 redčenimi zajčjimi protitlesi proti MyD88 ter 1 : 5000 redčenimi protizajčjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo.....	51
Slika 20: Detekcija proteina Rluc-dnMyD88 z 1 : 900 redčenimi zajčjimi protitlesi proti MyD88 ter 1 : 5000 redčenimi protizajčjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo.....	51
Slika 21: Ugotavljanje ustrežne količine dnMyD88, pri kateri pride do inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti.....	55
Slika 22: Produkcija proteina Rluc-dnMyD88 v celicah HEK293, spremljana preko aktivnosti <i>Renilla</i> luciferaze, je sorazmerna s količino transficiranega plazmida.....	58
Slika 23: Rluc-dnMyD88 inhibira aktivacijo NF- κ B v transficiranih celicah HEK293, stimuliranih z LPS, preko TLR4/MD-2-signalizacijske poti. Aktivacijo smo spremljali preko poročevalnega plazmida s kresničkino luciferazo.....	58
Slika 24: Produkcija proteina dnMyD88-Rluc v celicah HEK293, spremljana preko aktivnosti <i>Renilla</i> luciferaze, je sorazmerna s količino transficiranega plazmida.....	59
Slika 25: dnMyD88-Rluc ne inhibira aktivacije NF- κ B v transficiranih celicah HEK293, stimuliranih z LPS, preko TLR4/MD-2-signalizacijske poti. Aktivacijo smo spremljali preko poročevalnega plazmida s kresničkino luciferazo.....	59
Slika 26: Ugotavljanje vpliva dodatka PIP2-vezavnega peptida na C-terminalni konec dnMyD88 na inhibicijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti.....	61
Slika 27: Vpliv dodanega dnMyD88 na nestimulirane celice, transficirane s po 50 ng hTLR4 in hMD-2.....	63
Slika 28: Ugotavljanje najmanjše potrebne količine receptorja hTLR4 in proteina hMD-2 za aktivacijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti.....	63
Slika 29: Ugotavljanje vpliva dodatka PIP2-vezavnega peptida na C-terminalni konec dnMyD88 na inhibicijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti v eksperimentu s transfekcijo s po 3 ng plazmidov za hTLR4 in hMD-2.....	65
Slika 30: Shematska predstavitev razloga za delovanje N-terminalnih fuzij in oviranje inhibicije C-terminalne fuzije z domeno TIR proteina MyD88.....	70

KAZALO PRILOG

Priloga A: Okrajšave aminokislinskega koda za aminokislino, pomembne v diplomskem delu.

Priloga B: Statistična obdelava rezultatov eksperimentov merjenja luciferazne aktivnosti (preizkus domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc z uporabo Studentove porazdelitve pri 99-odstotnem intervalu zaupanja).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca pri določeni valovni dolžini
AK	aminokislina, aminokislinski ostanek
Amp	ampicilin
ang.	angleško
APS	amonijev persulfat
bp	bazni par
CPI	mešanica proteaznih inhibitorjev (ang. protease inhibitor cocktail)
Da	dalton, enota za molekulsko maso
DD	domena smrti (ang. death domain)
DMEM	gojišče za celične kulture (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dnMyD88	dominantno negativna oblika proteina MyD88
dNTP	2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat
DOC	deoksiholična kislina (5 β -holan-24-ojska kislina-3 α ,12 α -diol)
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
EGTA	etilen glikol tetraacetna kislina
EtBr	etidijev bromid
FBS	fetalni telečji serum (ang. fetal bovine serum)
Fluc	kresničkina luciferaza
HEK293	trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (ang. human embryonic kidney cell line)
hMD-2	humani oziroma človeški MD-2
hTLR4	humani oziroma človeški TLR4
INF	interferon
IKK	inhibitorna kapa B kinaza (ang. I κ B kinase)

IL	interlevkin
IRAK	kinaza, povezana z receptorjem IL-1 (ang. IL-1 receptor-associated kinase)
IRF3	interferonski odzivni faktor 3 (ang. interferon response factor 3)
kDa	kilo Da (1000 Da)
KDO	3-deoksi-D-mano-oktulozonska kislina
LB	gojišče Luria-Bertani
LBP	LPS-vezavni protein (ang. LPS-binding protein)
LPS	lipopolisaharid, imenovan tudi endotoksin
LRR	z levcinom bogate ponovitve (ang. leucine-rich repeat)
Mal/TIRAP	adapterski protein podoben MyD88 (ang. MyD88-adaptor-like/TIR-domain-containing adaptor molecule)
MD-2	diferenciacijski mieloidni protein 2 (ang. myeloid differentiation protein 2)
MQ	mili Q voda, dodatno očiščena destilirana voda
MyD88	diferenciacijski mieloidni protein 88 (ang. myeloid differentiation primary-response protein 88)
NF- κ B	jedrni faktor κ B
PAMP	molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (ang. pathogen-associated molecular patterns)
PBS	fosfatni pufer
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H_3O^+
PIP2	fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat
RIP1	receptor-vezavni protein 1 (ang. receptor-interacting protein 1)
RLE	relativne luciferazne enote
Rluc	<i>Renilla</i> luciferaza
RNaza	ribonukleaza
RNK	ribonukleinska kislina
SDS	natrijev dodecil sulfat
sLPS	s polisaharidi bogat LPS (ang. smooth lipopolysaccharide)
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)
TEMED	N,N,N,N -tetrametil-etilendiamin
TICAM-1	adapterski protein, znan tudi kot TRIF (ang. TIR-domain-containing molecule 1)
TICAM-2	adapterski protein, znan tudi kot TRAM (ang. TIR-domain-containing molecule 2)
TIR	domena Toll-interlevkinskega receptorja (ang. Toll-interleukin receptor domain)
TLR	Tollu-podoben receptor (ang. Toll-like receptor)
TNF α	dejavnik tumorske nekroze α (ang. tumor necrosis factor α)
TRAF 6	faktor povezan z receptorjem za TNF (ang. TNF receptor-associated factor 6)
TRAM	adapterski protein soroden TRIF (ang. TRIF-related adaptor molecule)
TRIF	adapterski protein, ki vsebuje domeno TIR (ang. TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF- β)
Tween 20	polioksietilensorbitan monolavrat
vrt./min	vrtljaji na minuto
% (m/v)	odstotek, delež neke snovi, določen kot razmerje mase te snovi z volumnom celotne raztopine

SLOVARČEK

- HEK293, HEK293T HEK293 je celična linija, nastala s transformacijo kulture normalnih človeških embrionalnih ledvičnih celic z DNK adenovirusa 5 v laboratoriju Franka Grahama v poznih sedemdesetih letih dvajsetega stoletja. Celice na površini ne izražajo Tollu-podobnih receptorjev (TLR). HEK293T so tip HEK293 celic, v katerih se stabilno izraža antigen T virusa SV40, ki omogoča podvojevanje plazmidov z izvorom podvojevanja SV40, kar omogoča večje izražanje takšnih plazmidov. Celice HEK293T so naredili v laboratoriju Michelle Calos v Stanfordu konec osemdesetih let prejšnjega stoletja.
- LPS Lipopolisaharidi (LPS), imenovani tudi endotoksini, so amfifilne molekule, ki so sestavljene iz lipida A, notranjega oligosaharidnega jedra, ki je povezano z lipidom A preko skupine KDO (3-deoksi-D-mano-oktulozonska kislina), in polimera s ponavljajočimi se oligosaharidi (antigen O), ki se nadaljujejo iz oligosaharidnega jedra. Lipid A je zadosten in potreben za endotoksične lastnosti molekule. Molekula LPS je z lipidnimi verigami vsidrana v zunanjo stran zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij.
- Luciferaza Luciferaza je generično ime za encime, ki katalizirajo reakcije bioluminiscence pri organizmih, kot sta kresnička *Photinus pyralis* in mehkužec *Renilla reniformis*. V molekularni biologiji luciferaze uporabljamo kot poročevalske encime, s katerimi spremljamo izražanje genov. V dvojnem luciferaznem testu hkrati uporabimo dve luciferazi; inducibilno izraženo kresničkino luciferazo za spremljanje izražanja genov ter konstitutivno izraženo *Renilla* luciferazo za normalizacijo transfekcije.

MyD88	Adapterski protein, pomemben pri znotrajcelični signalizaciji receptorjev TLR. Zgrajen je iz domene smrti (DD), ki se veže s kinazami, ter domene Toll-interlevkiskega receptorja (TIR), ki se veže z domeno TIR receptorja TLR.
TLR4	Tollu-podoben receptor 4, zgrajen iz zunajcelične domene, ki vsebuje z levcini bogate ponovitve, transmembranske regije ter znotrajcelične domene TIR. Na zunajcelično domeno se veže kompleks iz MD-2, CD14 ter LPS, na znotrajcelično domeno pa adapterski proteini, ki vsebujejo domeno TIR.

1 UVOD

Ob vdoru mikroorganizma v gostiteljski organizem se imunski sistem sreča s strukturnimi komponentami mikroorganizma, ki najprej aktivirajo mehanizme prirojene imunosti.

Družina Tollu-podobnih receptorjev (receptorji TLR, ang. Toll-like receptors) igra zelo pomembno vlogo v prirojeni imunosti, saj posamezni receptorji TLR s svojo zunajcelično domeno (ob pomoči dodatnih proteinov, kot so MD-2, CD14, LBP) spoznajo specifične molekularne motive, ki jih najdemo na mikrobnih patogenih. Ti motivi sprožijo znotrajcelično signalno pot, ki vodi v izražanje vnetnih genov. To ima za posledico odstranitev patogenov, v nekaterih primerih pa lahko vodi v bolezensko stanje, ki se imenuje sepsa. Sepsa se razvije, ko se začetni gostiteljski odziv na bakterijsko okužbo prekomerno ojača.

Znotrajcelična signalna pot, ki sledi prepoznavi komponent mikrobnih patogenov, se priče z vezavo različnih adapterskih proteinov na receptorje TLR. Med adapterskimi proteini predstavlja diferenciacijski mieloidni protein 88 (MyD88) osrednjo molekulo signaliziranja pri večini receptorjev TLR (Akira in Takeda, 2004).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Oblike proteina MyD88 so potencialno zanimive kot inhibitorji signalizacije receptorjev TLR. Protein MyD88 je namreč zgrajen iz dveh domen; domena Toll-interlevkinskega receptorja (TIR) na C-terminalnem delu je odgovorna za vezavo z domeno TIR transmembranskih receptorjev TLR, domena smrti (DD) na N-terminalnem delu pa je odgovorna za nadaljnji prenos signala v signalizacijski poti. Že zgolj odstranitev domene, odgovorne za prenos signala, lahko zaustavi signalizacijsko pot (Medzhitov in sod., 1998).

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo želeli izdelati posamezne različice proteina MyD88 in ugotoviti njihov vpliv na signaliziranje receptorjev TLR ter potencialno terapevtsko uporabo za inhibicijo vnetnih procesov, kjer so udeleženi proteini z domenami TIR.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Kompleks med proteinom MyD88 in receptorjem TLR nastane blizu membrane, zato predpostavljamo:

- proteinska fuzija z dnMyD88 (oblika proteina MyD88, ki vsebuje le domeno TIR in zato deluje kot inhibitor signalizacije) na N-terminalni strani domene TIR proteina MyD88 naj ne bi vplivala na zaustavitev signala, medtem ko bi takšna fuzija na C-terminalni strani domene TIR proteina MyD88 zaradi steričnih ovir pri interakciji z receptorjem TLR lahko preprečila zaustavitev signala;
- oblika proteina dnMyD88 z dodanim aminokislinskim zaporedjem, ki omogoča vezavo na membrano, naj bi še povečalo zmožnost za zaustavljanje signala.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IMUNSKI SISTEM

Vsi mnogocelični organizmi smo neprenehoma izpostavljeni mikroorganizmom iz okolja, zato se je razvil imunski sistem, ki z različnimi mehanizmi prepozna vdor mikroorganizmov v telo in predstavlja obrambo pred okužbami z mikroorganizmi.

Imunski sistem vretenčarjev lahko razdelimo na prirojeno ter pridobljeno imunost.

Pridobljena imunost, ki je prisotna le pri vretenčarjih, temelji na receptorjih, specifičnih za antigen, ki so izraženi na limfocitih B in T (Vozelj, 2000).

Prirojena imunost pa je evolucijsko ohranjena in je prva v zaporedju obrambnih mehanizmov, ki branijo organizem pred mikrobnimi patogeni. Do nedavnega je veljalo, da je prirojena imunost nespecifični del imunskega odgovora, pri katerem fagocitne celice, zlasti makrofagi in nevtrofilci, požirajo in tako odstranjujejo mikrobne patogene. Vendar se je izkazalo, da je tudi za prirojeno imunost značilna specifičnost ter sposobnost razlikovanja med lastnimi in telesu tujimi molekulami (Janeway, 1992). Sposobnost prepoznavanja tujih molekul je v veliki meri vezana na skupino evolucijsko ohranjenih receptorjev, poznanih kot receptorji TLR oziroma Tollu-podobni receptorji (ang. Toll-like receptors).

2.2 SIGNALNA POT RECEPTORJEV TLR

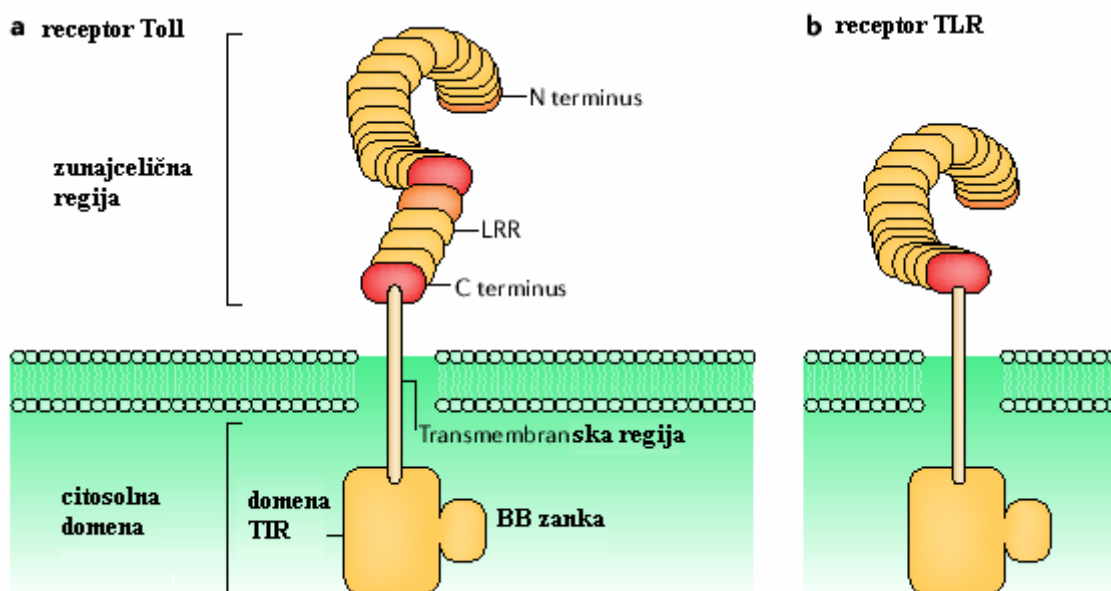
2.2.1 ODKRITJE RECEPTORJEV TOLL IN TLR

Receptor Toll so odkrili Anderson in sod. (1985) na začetku osemdesetih let prejšnjega stoletja pri vinski mušici (*Drosophila melanogaster*) in ugotovili, da je nujno potreben za dorzoventralni razvoj zarodka mušice.

Zaporedje receptorja Toll so leta 1988 določili Hashimoto in sod., nakazuje pa tridelno strukturo iz:

- N-terminalne regije, ki vsebuje z levcinom bogate ponovitve ali LRR (ang. leucine-rich repeat),
- transmembranske regije,
- C-terminalne regije, za katero se je kasneje izkazalo, da je homologna domeni vretenčarskega receptorja za interlevkin 1 (IL-1R). Ta domena je sedaj znana kot domena Toll-interlevkinskega receptorja oziroma domena TIR (ang. Toll-interleukin receptor).

Kasneje so odkrili, da so receptorji Toll pomembni tudi pri imunskem odzivu mušice na patogene glive in bakterije (Lemaitre in sod., 1996). Kmalu zatem je prišlo do odkritja homologov receptorja Toll tudi pri človeku in ostalih vretenčarjih, poimenovali pa so jih receptorji TLR. Homologno strukturo receptorjev Toll in TLR prikazuje slika 1 (Gay in sod., 2006).



Slika 1: Osnovna zgradba receptorja Toll (a) in receptorja TLR (b) (Gay in sod., 2006: 694).

Danes poznamo pri človeku na celicah prirojenega imunskega sistema deset različnih receptorjev TLR, ki prepoznavajo različne specifične komponente, prisotne v

mikroorganizmih. Te komponente predstavljajo molekule, ki so pomembne za preživetje mikrobov in tako tudi mikrobnih patogenov. Imenujemo jih molekulski motivi patogenih mikroorganizmov oziroma PAMPs (ang. pathogen-associated molecular patterns) (Akira in sod., 2006; Beutler, 2004).

Tako na primer receptor TLR4 spozna lipopolisaharid po Gramu negativnih bakterij, receptor TLR3 prepozna dvoverižno molekulo RNK, ki je značilna za viruse, receptor TLR5 pa spozna flagelin, glavno sestavino bakterijskega bička. Receptorji TLR se ločijo tudi po svoji lokaciji v celici, saj so nekateri na celični površini (kot sta TLR4, TLR5), drugi pa na endosomih znotraj celice (tak je TLR3) (Kawai in Akira, 2006).

2.2.2 RECEPTOR TLR4

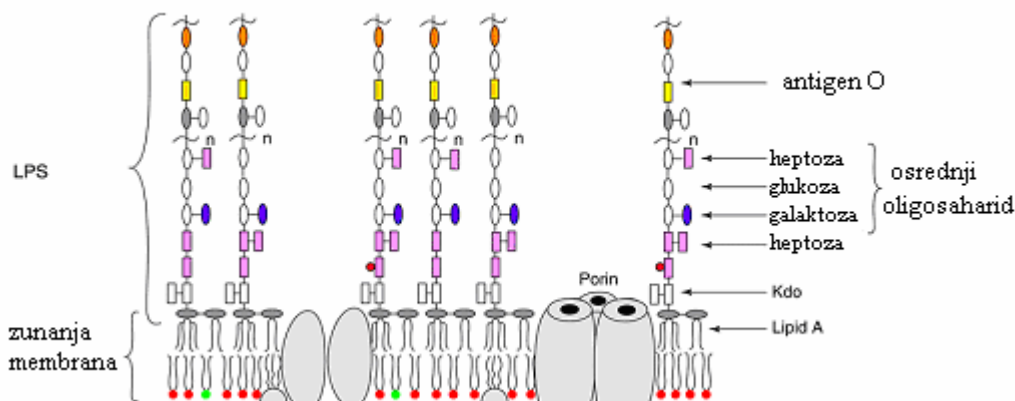
Leta 1997 so odkrili prvi človeški homolog receptorja Toll in ga poimenovali h-Toll, danes pa ga omenjamo kot receptor TLR4 (Medzhitov in sod., 1997). Receptor TLR4 je vpleten v prepoznavanje najrazličnejših molekul, ki so lahko mikrobne (lipopolisaharid), rastlinske (taksol) ali pa lastnega izvora (domena EDA fibrinogena) (Gay in Gangloff, 2007).

Lipopolisaharid oziroma LPS (imenovan tudi endotoksin) je glikolipidna komponenta zunanje membrane pri po Gramu negativnih bakterijah.

LPS bakterije *Escherichia coli* je zgrajen iz treh kovalentno povezanih regij (slika 2):

- Lipid A služi kot sidro in pripne molekulo v zunanjo membrano. Lipid A je kompleksna molekula, ki je običajno sestavljena iz petih do sedmih verig maščobnih kislin in dveh fosfatnih skupin, ki so vezane na dve povezani molekuli galaktozamina. Lipid A je zadosten in potreben za endotoksične lastnosti molekule in je najbolj ohranjen del strukture med različnimi bakterijskimi vrstami (Gorbet in Sefton, 2005).
- Osrednji oligosaharid je povezan z lipidom A preko skupine KDO (3-deoksi-D-mano-oktulozonska kislina).

- Polisaharidna komponenta je sestavljena iz ponavljajočih se oligosaharidov (antigen O ali O-specifična veriga) (Wyckoff in sod., 1998).



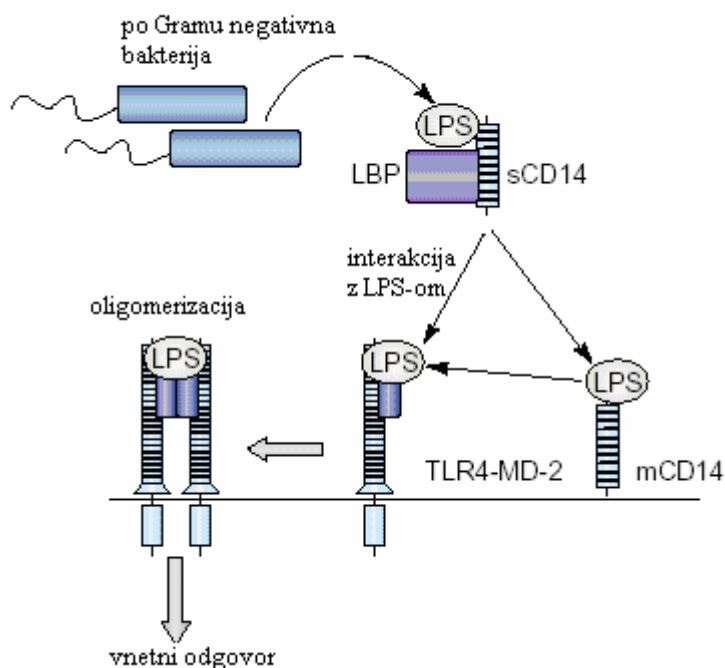
Slika 2: Primer zgradbe lipopolisaharida (Wyckoff in sod., 1998: 155).

O-specifična veriga je prisotna le pri po Gramu negativnih bakterijah, ki tvorijo gladke kolonije, in zato ima LPS s to verigo oznako sLPS (ang. smooth LPS). Kolonije bakterij brez O-specifične verige imajo na gojitvenih ploščah hrapav videz in so zato dobile oznako rLPS (ang. rough LPS) (Gorbet in Sefton, 2005).

Prepoznavanje LPS je kompleksno in vključuje receptor TLR4, vendar pa zgolj receptor TLR4 ni dovolj za učinkovit imunski odgovor, pač pa so potrebni še proteini LBP, CD14 in MD-2 (slika 3).

LPS-vezavni protein (LBP) je 60 kDa velik serumski protein, ki prepozna LPS, ko se ta ob okužbi s po Gramu negativnimi bakterijami pojavi v krvnem obtoku. LBP se veže na lipid A in katalizira prenos LPS na 55 kDa velik glikoprotein CD14. Ta se nahaja na površini mieloidnih celic (mCD14) in je v membrano pritrjen preko glikozilfosfatidilinozitolnega sidra (GPI-sidro) na C-terminalnem delu proteina. CD14 najdemo tudi v topni obliki v krvnem obtoku (sCD14). CD14 predstavi LPS receptorju TLR4. Receptor TLR4 ima na zunajcelični domeni vezan 16 kDa velik diferenciacijski mieloidni protein 2 oziroma MD-2 (ang. myeloid differentiation protein 2), ki je nujno potreben za odziv na LPS, saj TLR4 sam ne bi mogel vezati LPS. Vezava LPS na kompleks TLR4/MD-2 povzroči dimerizacijo in konformacijske spremembe receptorja. Le-te so potrebne za prenos signala v celico

preko povezave domen TIR receptorja z domenami TIR adapterskih proteinov (Miyake, 2004).



Slika 3: Prepoznavanje LPS v organizmu (Miyake, 2004: 188).

2.2.3 ZNOTRAJCELIČNA SIGNALNA POT RECEPTORJA TLR4

Po stimulaciji receptorja TLR4 pride do aktivacije dveh signalnih poti, in sicer od diferenciacijskega mieloidnega proteina 88 ali MyD88 (ang. myeloid differentiation primary-response protein 88) odvisne in neodvisne poti. Od MyD88 neodvisni poti pravimo tudi od TRIF (ang. TIR-domain-containing adaptor protein inducing $\text{INF-}\beta$) odvisna pot. TRIF je znan tudi kot TICAM-1 (ang. TIR-domain-containing molecule 1).

Od MyD88 odvisna pot sproži hitro aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B (jedrni faktor κ B) in nastanek vnetnih citokinov, kot so TNF (dejavnik tumorske nekroze), IL-1 (interlevkin-1), IL-6, IL-8 (Sankar in sod., 2006; Serbina in sod., 2003).

V nasprotju z od MyD88 odvisno potjo pa od TRIF odvisna pot aktivacije povzroči zakasnen NF- κ B-odgovor ter aktivacijo transkripcijskega faktorja IRF3 (interferonski odzivni faktor 3), ki sproži nastanek INF (interferon) α in β ter izražanje INF-inducibilnih genov (Akira in Takeda, 2004).

Poleg sinteze vnetnih citokinov signaliziranje preko receptorjev TLR sproži tudi dozorevanje posebnih antigen-predstavljaljajočih celic, dendritičnih celic, kar je ključno za indukcijo pridobljenega imunskega odziva. To nakazuje, da receptorji TLR povezujejo prirojeno in pridobljeno imunost (Iwasaki in Medzhitov, 2004).

2.2.3.1 Od MyD88 odvisna pot aktivacije

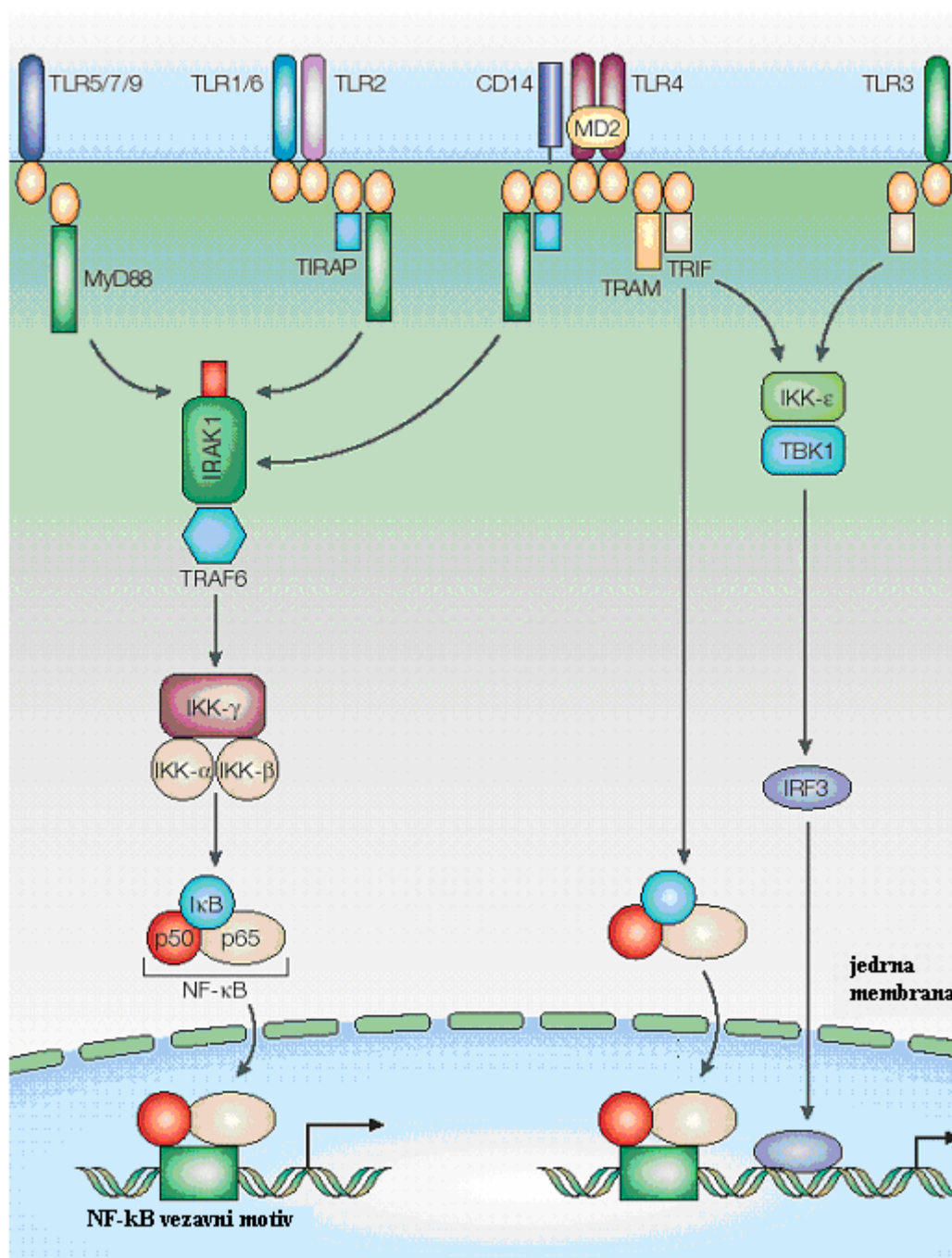
Shema od MyD88 odvisne in neodvisne poti aktivacije prikazuje slika 4.

Po stimulaciji receptorja TLR4 pride do vezave adapterja Mal/TIRAP (ang. MyD88-adaptor-like/TIR-domain-containing adaptor molecule) na njegovo domeno TIR. Na domeno TIR adapterja Mal/TIRAP se nato s svojo domeno TIR veže protein MyD88. Protein MyD88 poleg domene TIR vsebuje tudi domeno smrti (DD, ang. death domain), preko katere se poveže z domeno DD kinaze IRAK4 (kinaza, povezana z receptorjem IL-1, ang. IL-1R-associated kinase 4). Vezava IRAK4 na MyD88 omogoči povezavo z IRAK1. Kinaze IRAK spadajo v skupino serin/treonin-kinaz, ki imajo C-terminalno regijo bogato z aminokislinama serinom in treoninom, osrednjo kinazno domeno in N-terminalno domeno DD. IRAK4 sproži kinazno aktivnost IRAK1 preko fosforilacije njegove kinazne domene. Aktiviran IRAK1 nato preko avtofosforilacije aminokislinskih ostankov na N-terminalnem delu omogoči vezavo TRAF6 (faktor povezan z receptorjem za TNF, ang. TNF receptor-associated factor 6) na kompleks. Kompleks IRAK1-TRAF6 se sprosti z receptorja in reagira s kompleksom TAK1 (s transformirajočim rastnim faktorjem β aktivirana kinaza 1, ang. transforming growth factor- β -activated kinase 1), TAB1 (protein, ki veže TAK1, ang. TAK1-binding protein), TAB2 in TAB3. Ta interakcija sproži fosforilacijo TAB2/TAB3 in TAK1. IRAK1 se razgradi, preostali kompleks (TRAF6, TAK1, TAB1, TAB2, TAB3) pa se v citosolu veže z ubikvitin ligazo, ki sproži ubikvitinacijo TRAF6 in tako inducira aktivacijo TAK1. Aktiviran TAK1 fosforilira kompleks IKK (inhibitorni kapa B ($I\kappa$ B))

kinazni kompleks, ang. inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex), ki ga sestavljata katalitični podenoti IKK α ter IKK β in regulatorna podenota IKK γ oziroma NEMO (ang. NF- κ B essential modulator). Kompleks IKK nato fosforilira I κ B. Fosforilacija označi I κ B za poliubikvitinacijo in s tem razgradnjo, to pa omogoči sprostitev transkripcijskega faktorja NF- κ B iz inhibitornega kompleksa in njegov prenos v jedro, kjer sproži prepisovanje od NF- κ B-odvisnih genov (Kawai in Akira, 2006; Akira in Takeda, 2004).

2.2.3.2 Od MyD88 neodvisna oziroma od TRIF odvisna pot aktivacije

Poskusi na makrofagih brez MyD88 so pokazali, da po stimulaciji z LPS pride do aktivacije NF- κ B z zamudo oziroma kasneje kot v primeru normalnih makrofagov. Torej obstaja pot aktivacije, ki ne vključuje proteina MyD88 in se zato imenuje od MyD88 neodvisna pot. V tej signalni poti je adapterska molekula, ki se po aktivaciji veže na domeno TIR receptorja TLR4, TRAM (ang. TRIF-related adaptor molecule), znana tudi kot TICAM-2 (ang. TIR-domain-containing molecule 2). Preko domene TIR se na TRAM veže adapterska molekula TRIF. N-terminalna regija adapterja TRIF se veže s TRAF6 in vodi v aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B, poleg tega pa se lahko veže tudi s TBK1 (ang. TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1). TBK1 in IKKi (inducibilna IKK) sta IKK-sorodni kinazi in sta odgovorni za fosforilacijo regulatorne domene transkripcijskega faktorja IRF3, zaradi česar pride do tvorbe dimerov in njihovega prenosa v jedro, kar vodi v izražanje INF β (Kawai in Akira, 2006; Akira in Takeda, 2004) (slika 4).



Slika 4: Od MyD88 odvisna in neodvisna pot aktivacije signalne poti receptorjev TLR (Akira in Takeda, 2004: 504).

2.2.3.3 Družina adapterskih proteinov

Dimerizacija receptorjev TLR kot odgovor na stimulacijo z agonistom omogoči vezavo TLR-specifičnih adapterskih proteinov: MyD88, Mal/TIRAP, TRIF/TICAM-1 in TRAM/TICAM-2 (Akira in Takeda, 2004).

Značilnost vseh adapterjev je, da vsebujejo domeno TIR, med receptorji TLR pa je receptor TLR4 edini, ki uporablja vse štiri adapterske proteine. Kot je omenjeno zgoraj, je za aktivacijo od MyD88 odvisne signalne poti potreben protein MyD88. Ta pot je značilna za receptorje TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 in TLR9. Mal/TIRAP je udeležen v od MyD88 odvisni signalni poti v primeru uporabe receptorjev TLR4 in TLR2. Od MyD88 neodvisna signalna pot je značilna za receptorja TLR4 in TLR3, kjer glavno vlogo igra protein TRIF. Protein TRAM je značilen za od MyD88 neodvisno signalno pot zgolj v primeru receptorja TLR4 (Akira in Takeda, 2004; Kagan in Medzhitov, 2006).

MyD88 in TRIF igrata pomembno vlogo pri nadaljnjem signaliziranju in vodita v sintezo vnetnih citokinov, medtem ko naj bi Mal/TIRAP in TRAM služila zgolj kot povezava med MyD88 ali TRIF in ustreznim receptorjem TLR, čeprav tudi njuno povečano izražanje vodi v aktivacijo celic (Nishiya in sod., 2007).

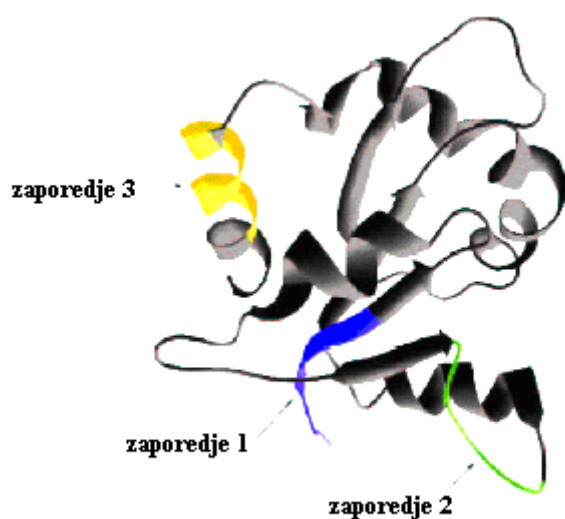
2.2.3.3.1 Domena TIR

Domena TIR običajno vsebuje od 135 do 160 aminokislinskih ostankov. Med posameznimi domenami TIR je zaporedje ohranjeno v 20 do 30 %, večina ohranjenega zaporedja leži v hidrofobnem jedru domene. Razlike v dolžini in zaporedju nakazujejo na strukturno raznolikost domen, kar naj bi bilo pomembno pri vzpostavljanju interakcij med posameznimi adapterji in receptorji TLR (Lasker in Nair, 2006; Li in sod., 2005).

Strukturo domene TIR so predpostavili že Rock in sod. (1998), kristalni strukturi človeških receptorjev TLR1 in TLR2 pa sta potrdili, da so domene TIR zgrajene iz petih β -plošč in petih α -vijačnic. Med drugo β -ploščo in drugo α -vijačnico je BB-zanka, ki je ohranjena pri

več receptorjih TLR in ima pomembno funkcionalno vlogo (Xu in sod., 2000). BB-zanka vsebuje aminokislino prolin, ki je pri miših, ki so neobčutljive na LPS, zamenjana s histidinom. Enaka sprememba v receptorju TLR2 tudi prepreči vezavo TLR2 z MyD88 *in vitro* (Poltorak in sod., 1998; Xu in sod., 2000). Domena TIR proteina MyD88 vsebuje tri ohranjena zaporedja, označena 1, 2 in 3 (ang. box 1, 2, 3), ki naj bi predstavljala mesta interakcije z adapterji oziroma receptorji TLR (slika 5). Zaporedje 2 oblikuje BB-zanko, vendar pa naj ta ne bi bila vpletena pri interakciji med TLR4 in MyD88 (Dunne in sod., 2003).

Dunne in sod. (2003) so predpostavili modele domen TIR za receptor TLR4 ter adapterja MyD88 in Mal/TIRAP. Splošna struktura modelov je sicer ohranjena, vendar pa so površinski elektrostatski potenciali različni in naj bi prek komplementarnosti nabojev omogočali interakcije.

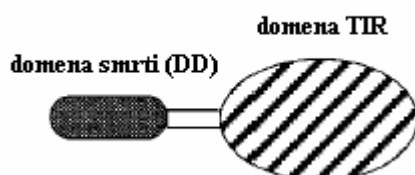


Slika 5: Domena TIR proteina MyD88 (Li in sod., 2005: 26158).

2.2.3.3.2 MyD88 in Mal/TIRAP

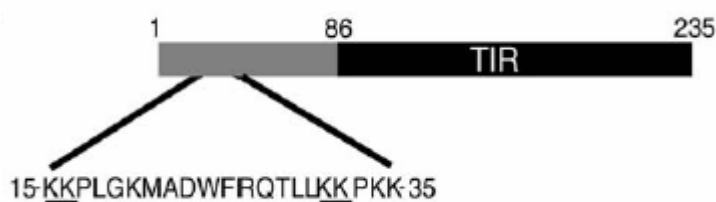
Človeški MyD88 vsebuje 296 aminokislinskih ostankov in se v nestimuliranih celicah nahaja v citosolu. Vsebuje dve domeni, s katerima se poveže z drugimi proteini. To sta N-terminalna domena DD (sega od 54. do 109. AK) in C-terminalna domena TIR (sega od 159. do 296. AK), med njima pa leži vmesna regija (INT) (slika 6). Domena TIR je potrebna za povezavo MyD88 z domeno TIR adapterskega proteina Mal/TIRAP v primeru signalizacije preko receptorja TLR4, medtem ko se domena DD MyD88 veže na domeno DD kinaze. Za subcelično lokalizacijo MyD88 sta odgovorni domeni DD in INT, natančna lokalizacija pa je kritična za njegovo signalizacijsko funkcijo. Ob stimulaciji receptorja TLR se adapter MyD88 namreč prestavi iz citosola na membrano, kjer se poveže z receptorjem, in sproži signalno pot (Nishiya in sod., 2007).

Poleg običajne oblike proteina MyD88 so Janssens in sod. (2002) poročali o obliki brez vmesne domene, ki jo imenujemo MyD88s (ang. MyD88 short). Gen za mišjo in tudi človeško obliko proteina MyD88 je namreč organiziran v pet eksonov in štiri introne (Hardiman in sod., 1997; Bonnert in sod., 1997). Prvi ekson določa domeno DD, drugi domeno INT, zadnji trije eksoni pa domeno TIR. Z alternativnim izrezovanjem, pri katerem izpade drugi ekson, nastane oblika MyD88s. MyD88s se lahko veže na domeno TIR receptorja, ne pa na domeno DD kinaze IRAK4, zato tudi ne more sprožiti fosforilacije IRAK1 in posledično aktivacije NF- κ B. Tako MyD88s deluje kot negativni regulator TLR-signalizacijske poti, odvisne od MyD88. Na vlogo negativnega regulatorja nakazuje tudi njegovo inducibilno izražanje, saj ga zaznamo le po dolgotrajni stimulaciji z LPS (Burns in sod., 2003).



Slika 6: Poenostavljena shema zgradbe proteina MyD88 (Medzhitov in sod., 1998: 254).

Človeški Mal/TIRAP vsebuje 235 aminokislinskih ostankov in ima na C-terminalnem koncu domeno TIR (sega od 86. do 235. AK). Od MyD88 se razlikuje po tem, da na N-terminalnem delu ne vsebuje domene DD. Mal/TIRAP se veže direktno na TLR4, zato so najprej sklepali, da sodeluje pri MyD88 neodvisni signalni poti, kasneje pa so ugotovili, da sodeluje pri od MyD88 odvisni poti, a le pri TLR4 in TLR2 (Fujihara in sod., 2003). Kagan in Medzhitov (2006) sta ugotovila, da se Mal/TIRAP veže na membrano, vendar pa vezava ni odvisna od interakcij domen TIR med Mal/TIRAP in receptorjem TLR, pač pa od regije, ki jo oblikuje N-terminalni del proteina. Regija med 15. in 35. AK (zaporedje je prikazano na sliki 7; razlaga okrajšav za AK pa je v prilogi A) ima visoko izoelektrično točko in v primerjavi z ostalim delom proteina vsebuje več bazičnih in aromatskih aminokislinskih ostankov. To sta značilnosti, ki ju najdemo v domenah, ki vežejo fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP2) preko elektrostatskih interakcij (McLaughlin in sod., 2002). Primarna funkcija Mal/TIRAP je nadzor vezave MyD88. Ista raziskovalna ekipa je ugotovila tudi, da lahko z dodatkom PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem delu proteina MyD88 spremenimo njegovo celično razporeditev iz citosolne v membransko frakcijo. Prav tako so ugotovili tudi, da so makrofagi z okvarjenim MyD88 bolj odzivni na LPS, ko so jih transficirali z obliko MyD88, ki vsebuje PIP2-vezavni peptid. To nakazuje, da je vezava MyD88 na membrane, ki vsebujejo PIP2, omejujoč korak v aktivaciji signalizacijske poti preko receptorja TLR4.



Slika 7: Shematsko prikazana zgradba adapterskega proteina Mal/TIRAP z zaporedjem kationskega PIP2-vezavnega peptida (Kagan in Medzhitov, 2006: 944).

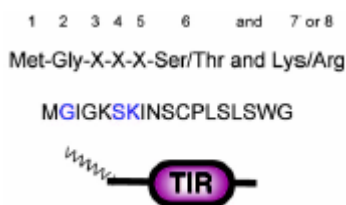
2.2.3.3.3 TRIF in TRAM

Človeški TRIF vsebuje 712 aminokislinskih ostankov in ima domeno TIR na C-terminalnem koncu, prav tako kot TIRAP pa ne vsebuje domene DD (Yamamoto in sod., 2002) (slika 8). TRIF je vključen v od MyD88 neodvisno signalno pot; njegova N-terminalna domena se veže bodisi s TRAF6, kar aktivira transkripcijski faktor NF- κ B, bodisi s TBK1, kar vodi v aktivacijo transkripcijskega faktorja IRF3. Aktivacija NF- κ B naj bi bila mogoča tudi preko interakcije proteina RIP1 (ang. receptor-interacting protein 1) s C-terminalnim delom TRIF (Meylan in sod., 2004).



Slika 8: Shematsko prikazana zgradba adapterskega proteina TRIF (Yamamoto in sod., 2002: 6669).

TRAM je četrti adapterski protein, ki sodeluje v TLR-signaliziranju, sodeluje pa izključno pri signaliziranju prek receptorja TLR4. Vsebuje 235 aminokislinskih ostankov in ima domeno TIR na C-terminalnem koncu (Yamamoto in sod., 2003) (slika 9). Rowe in sod. (2006) so ugotovili, da se TRAM nahaja v membrani in v Golgijevem aparatu, kjer se poveže s TLR4. TRAM je vezan na membrano prek hidrofobne miristolne skupine na N-terminalnem delu, miristoilacijo pa omogoča zaporedje sedmih aminokislin (metionin-glicin-izolevcin-glicin-lizin-serin-lizin). Mutacija v mestu miristoilacije povzroči spremembo v lokalizaciji proteina TRAM, in sicer se ta iz membrane premakne v citosol. S tem pa se izgubi tudi odzivnost na LPS preko od MyD88 neodvisne poti. Preko domene TIR se na TRAM veže adapterska molekula TRIF v primeru receptorja TLR4, v primeru receptorja TLR3 pa TRAM ni potreben in se TRIF veže neposredno na domeno TIR receptorja TLR3. Rowe in sod. (2006) so ugotovili tudi, da se mutanta proteina MyD88, pri kateri so prvih sedem aminokislinskih ostankov zamenjali s prvimi sedmimi aminokislinskimi ostanki adapterja TRAM, ravno tako nahaja v membranski frakciji.



Slika 9: Shematsko prikazana zgradba adapterskega proteina TRAM (Rowe in sod., 2006: 6300).

2.3 SPREMINJANJE SIGNALNE POTI RECEPTORJEV TLR

Ideja o spreminjanju signalne poti receptorjev TLR je prisotna že nekaj časa, saj je včasih pretiran imunski odziv lahko škodljiv in posledica takšnega odziva je sepsa. O sepsi govorimo, ko se pri okužbi razvije sistemski vnetni odgovor in v krvi dokažemo mikroorganizme.

Do razvoja sepse pride, ko se komponente bakterijskih celičnih sten, predvsem LPS, vežejo na receptor CD14 na površini monocitov ali na topen CD14 v krvnem obtoku. Signal se nato preko receptorjev TLR prenese v celico, kar vodi do nastanka primarnih citokinov vnetja (TNF α , IL-1). Ti citokini imajo lokalno ali sistemsko delovanje, imajo pa tudi vpliv na površino endotelija krvnih žil. Preko zaporedja procesov vodijo do zmanjšane dotoka kisika do nekaterih tkiv in s tem do poškodb celic ter kasneje do odpovedi organov in posledično lahko tudi smrti (Cohen, 2002).

Inhibicija aktivacije signalne poti preko MyD88 je zaželeno pri številnih patoloških stanjih in ne zgolj pri sepsi. Nedavno so pokazali vpletenost TLR-signalnih poti pri kroničnih vnetnih boleznih, kot sta revmatoidni artritis (Sacre in sod., 2007a) in kronično vnetje črevesa (Rakoff-Nahoum in sod., 2006); signaliziranje preko adapterja MyD88 naj bi imelo pomembno vlogo tudi pri razvoju tumorjev (Rakoff-Nahoum in Medzhitov, 2007; Naugler in sod., 2007) ter celo pri putiki (Chen in sod., 2006).

Že Medzhitov in sod. (1998) so ugotovili, da izražanje proteina MyD88 v človeških celicah HEK293 sproži močno in od koncentracije MyD88 odvisno aktivacijo NF- κ B, medtem ko zgolj domena DD ali domena TIR nista sprožili aktivacije. Opazili so tudi, da domena TIR

v povezavi z vmesno domeno ne sproži aktivacije NF- κ B, domena DD v povezavi z vmesno domeno pa jo. To se sklada tudi z opažanji raziskav o MyD88s, pri katerih so ugotovili, da je poleg domene DD za fosforilacijo IRAK1 potrebna tudi vmesna domena. Kot je bilo omenjeno, MyD88s ne vsebuje vmesne domene in zato deluje kot naravni negativni regulator signalizacije preko receptorjev TLR. Inhibicijo signalne poti lahko dosežemo tudi z obliko proteina MyD88, ki vsebuje zgolj domeno TIR. Zgolj domena TIR proteina MyD88 deluje kot kompetitivni inhibitor; s celotnim proteinom MyD88 tekmuje za vezavo na domeno TIR receptorja TLR oziroma inhibira aktivacijo funkcionalnega MyD88, zelo verjetno preko tvorbe heterodimerov. S tem se inhibira signalna pot, zato to obliko imenujemo dominantno negativna oblika proteina MyD88 ali dnMyD88.

Podobno so Yamamoto in sod. (2002) ugotovili, da dominantno negativna oblika proteina TRIF povzroči inhibicijo signalne poti v primeru receptorja TLR3.

Uporabnost dominantno negativnih oblik adapterjev so Sacre in sod. (2007a) pokazali na človeškem modelu revmatoidnega artritisa, saj je povečana ekspresija dominantno negativnih oblik adapterja MyD88 in Mal/TIRAP značilno zmanjšala spontano nastajanje citokinov, kot sta TNF- α in IL-6, ter encimov metaloproteinaz, ki ravno tako sodelujejo pri vnetju.

TLR4-signalno pot lahko zaustavijo tudi tako imenovani ovirajoči peptidi (ang. blocking peptides), katerih zaporedje ustreza zaporedju BB-zank adapterjev MyD88, Mal/TIRAP, TRIF in TRAM (Toshchakov in sod., 2005; Loiarro in sod., 2005).

Zgoraj smo že omenili, da so raziskovalci ugotovili, da se mutante proteina MyD88 lahko vežejo v membrano. Vprašala sem se, kako bi vezava dominantno negativne oblike MyD88 na membrano vplivala na inhibicijo signalizacijske poti preko receptorjev TLR.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 KEMIKALIJE

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

Proizvajalec	Kemikalije
BioWhittaker	FBS
darilo*	sLPS (<i>Salmonella abortus</i> Equi)
Fermentas	DNK-standardi: Gene Ruler DNA Ladder (Low Range), lambda DNK
Fluka	Ponceau-S, SDS, DMSO
Iford	razvijalec in fiksir
Invitrogen	DMEM + GlutaMAX TM -I, DNK-polimeraza AccuPrime <i>Pfx</i> , DNK-polimeraza Platinum <i>Pfx</i> , 10-kratni <i>Pfx</i> pomnoževalni pufer, raztopina MgSO ₄ za DNK-polimerazo Platinum <i>Pfx</i> , 10-kratni AccuPrime <i>Pfx</i> pomnoževalni pufer, Opti-MEM I medij brez seruma (1-kratni), transfekcijski reagent Lipofectamine 2000, coelenterazine, restrikcijski pufer REact 2, proteinski standard SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard
Kodak	film in kasete za filme (Kodak X-omat AR Film XAR-5, Kodak X-omatic Cassette)
LKB BROMMA	Triton X-100
Merck	etanol, metanol, izopropanol, NaCl, NaOH, očetna kislina, bakteriološki agar
New England Biolabs	restrikcijski encimi (<i>Hind</i> III, <i>Xba</i> I), DNK-ligaza T4
Qiagen	komercialno dostopni kompleti za čiščenje DNK (QiaQuick PCR Purification Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit)
Operon	začetni oligonukleotidi
Pierce	kemiluminiscentni substrat Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, proteinski standard Blue-Ranger Pre-Stained Protein Molecular Weight Marker Mix
Promega	2-kratni hitri ligacijski pufer, 5-kratni lizni pufer, luciferin
Sigma	komercialno dostopni kompleti za izolacijo plazmidne DNK (GenElute Plasmid Miniprep Kit, GeneElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit), akrilamid, N,N'-metilen-bis-akrilamid, agaroz, bromfenolmodro, gojišče LB po Millerju, TEMED, nitrocelulozna membrana (45 μm), EDTA, EGTA, ampicilin, amonijev persulfat, Tris, etidijev bromid, raztopina Tripsin EDTA (1-kratna), dNTP, Tween 20, DOC, Na ₂ HPO ₄ , SDS, Na ₃ VO ₄ , glicin, NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O, glukoza, glicerol, β-merkaptetanol
Tropix	I-BLOCK

*Opomba: dr. Klaus Brandenburg (Forschungszentrum Borstel, Nemčija)

3.1.2 UPORABLJENE RAZTOPINE, PUFRI IN STANDARDI

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

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
Lizni pufer (RIPA)	50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 0,5 % DOC, 1X CPI
Lizni pufer (za koimunoprecipitacijo)	50 mM Tris/HCl (pH 8), 1mM EDTA (pH 8), 1mM EGTA (pH 8), 137 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % DOC, 10 % glicerol, 1 mM Na ₃ VO ₄ , proteazni inhibitorji
4-kratni reducirajoči vzorčni pufer z SDS	320 mg SDS, 2 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 3,2 ml glicerol, 0,8 ml β-merkaptoetanol, 0,8 ml 1-odstotnega bromfenolmodrega, 1,2 ml MQ
17,5-odstotni ločitveni gel	2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 2,1 ml MQ, 5,8 ml 30-odstotnega akrilamid/bisakrilamid, 100 μl 10-odstotnega SDS, 50 μl 10-odstotnega APS, 5 μl TEMED (navedeno za 2 gela)
15-odstotni ločitveni gel	2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 2,45 ml MQ, 5 ml 30-odstotnega akrilamid/bisakrilamida, 100 μl 10-odstotnega SDS, 50 μl 10-odstotnega APS, 5 μl TEMED (navedeno za 2 gela)
4-odstotni vstopni gel	1,25 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 3,05 ml MQ, 0,665 ml 30-odstotnega akrilamid/bisakrilamid, 50 μl 10-odstotnega SDS, 25 μl 10-odstotnega APS, 5 μl TEMED (navedeno za dva gela)
10-kratni elektroforezni pufer z SDS	30 g Tris, 10 g SDS, 144 g glicina, dopolnimo do 1 l z dH ₂ O. Pred elektroforezo pufer 10-krat redčimo z dH ₂ O.
Pufer za mokri prenos proteinov na membrano	6,057 g Tris, 28,8 g glicina, 400 ml metanola, dopolnimo z dH ₂ O do 2 l.
Raztopina za spiranje	1 X PBS (0,058 M Na ₂ HPO ₄ , 0,017M NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O, 0,068 M NaCl), 0,01 % Tween 20
Raztopina za blokiranje	1 X PBS (sestava kot pri raztopini za spiranje), 0,01 % Tween 20, 0,2 % I-BLOCK
10-kratna raztopina Ponceau	2 % (m/v) raztopina Ponceau-S, 30 % (m/v) CCl ₃ COOH, 30 % (m/v) sulfosalicilna kislina
Blue-Ranger Pre-Stained Protein Molecular Weight Marker Mix	vsebuje proteine velikosti 215 kDa, 120 kDa, 84 kDa, 60 kDa, 39,2 kDa, 28 kDa, 18,3 kDa
SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard	vsebuje proteine velikosti 250 kDa, 148 kDa, 98 kDa, 64 kDa, 50 kDa, 36 kDa, 22 kDa, 16 kDa, 6 kDa, 4 kDa

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

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
50-kratni TAE pufer za agarozno elektroforezo	242 g Tris, 57,1 ml ledocetna kislina, 100 ml 0,5 M EDTA, dH ₂ O do 1 l. pH uravnamo na 8.
6-kratni nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	0,25 % bromfenolmodro, 0,25 % ksilencianol, 40 % (w/v) glukoze v dH ₂ O.
Pufer 1 Mini Prep	50 mM glukoza, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)
Pufer 2 Mini Prep	0,2 M NaOH, 1 % SDS
Pufer 3 Mini Prep	5 M kalijev acetat, CH ₃ COOH
Pufer TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
Zmes dNTP	1,25 mM ATP, 1,25 mM CTP, 1,25 mM GTP, 1,25 mM TTP
Gene Ruler DNA Ladder Low Range	vsebuje DNK velikosti 700 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 150 bp, 100 bp, 75 bp, 50 bp, 25 bp
Standard λ EcoRI/HindIII	vsebuje DNK velikosti 21.226 bp, 5.148 bp, 4.973 bp, 2.027 bp, 1.907 bp, 1.584 bp, 1.375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp
LUC-pufer (pufer za merjenje luciferazne aktivnosti)	LUC-pufer: 2,38 g HEPES, 0,38 g MgCl ₂ , 0,06 g EGTA-Na raztopiš v 100 ml dH ₂ O, uravnaš pH na 7,8 in dodaš še 0,08 g NaF. Poleg 2,6 ml LUC pufru dodamo še DDT, ATP, coA in MQ do 13 ml. Luciferin raztopimo v DMSO in ga dodamo pufru.
RENILLA-pufer (pufer za merjenje luciferazne aktivnosti)	2,6 ml 5-kratnega Renilla-pufru (3,346 g Na pirofosfat, 6,9 g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O, 14,5 g NaCl, 1,822 g CDTA, 5 ml metanol, pH uravnamo na 5,0), MQ do 13 ml. Coelenterazin raztopimo v metanolu in ga dodamo pufru.
10-kratni PBS (za celični laboratorij)	100 g NaCl, 2,5 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,5 g KH ₂ PO ₄ , dodamo MQ do 1 l, pH uravnamo na 7,4.

3.1.3 LABORATORIJSKA OPREMA

Preglednica 4: Uporabljena laboratorijska oprema.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Beckman	centrifuga J2-HS
BioRad	aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (Mini Protean II) in moker prenos proteinov na membrano (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell), aparatura za agarozno elektroforezo DNK
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture
Berthold Technologies	Mithras LB 940 in pripadajoči računalniški program MikroWin 2000
Chemass	spektrofotometer in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
Eppendorf	avtomatska pipeta 0,1–2,5 µl, namizna centrifuga MiniSpin, centrifuga 5415R
Gilson	5 ml, 1 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl pipete
Hettich	centrifuga Universal 32R
Kambič	parni sterilizator A-500/700
Thermo Scientific	centrifuga Sorvall RC5C Plus

3.1.4 UPORABLJENA PROTITELESA

Preglednica 5: Uporabljena protitelesa.

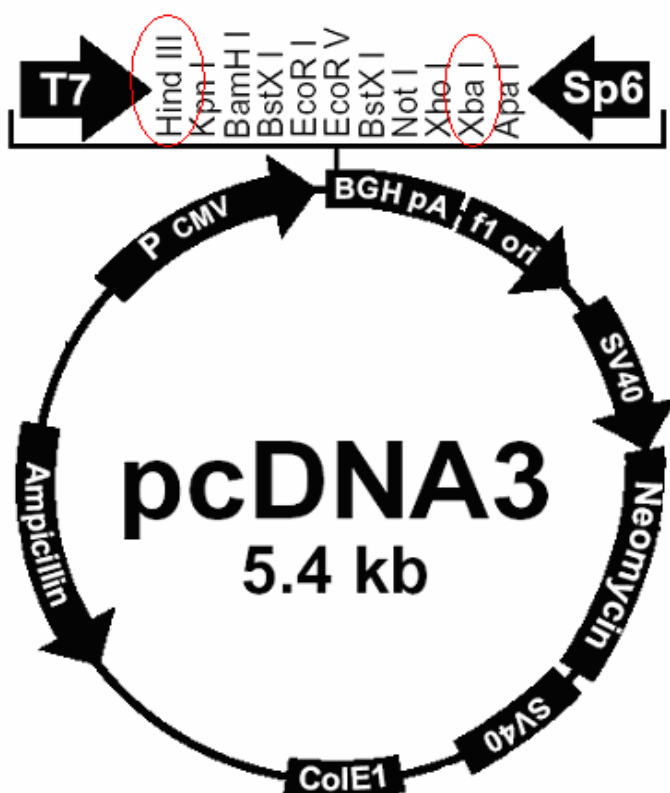
primarna protitelesa proti MyD88	zajčja poliklonska protitelesa proti MyD88 (Abcam)
poliklonska sekundarna protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	kozja poliklonska protitelesa proti zajčjim protitelesom IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Abcam)

3.1.5 PLAZMIDI

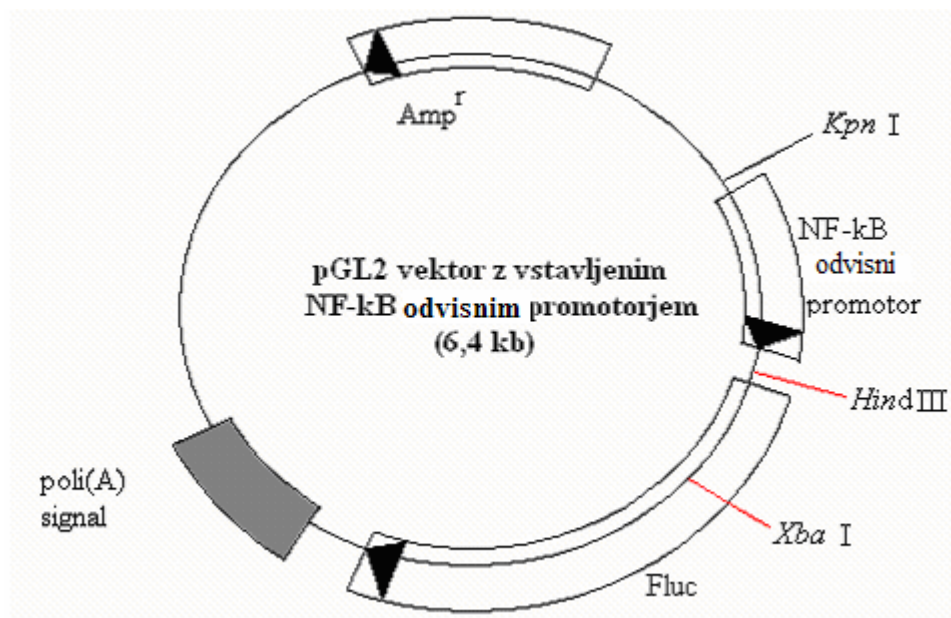
Preglednica 6: Uporabljeni plazmidi.

Vir	Plazmid
darilo (Carsten Kirschning, Tehnična univerza München)	hMD-2 v pEF-BOS, hTLR4 v pFLAG-CMV, MyD88-AU v pcDNA3
InvivoGen	pDeNY-hMyD88
Invitrogen	pcDNA3
Laboratorij za biotehnologijo, Kemijski inštitut Ljubljana	pSB1AK3 z zapisom za dnMyD88-Rluc
Promega	pGL2-luciferazni poročevalni vektor (z naknadno vstavljenim NF- κ B- -odvisnim promotorjem), phRL-TK (<i>Renilla</i> luciferazni poročevalni vektor)

Plazmide z geni za hMD-2, hTLR4 ter pGL2 z vstavljenim NF- κ B-odvisnim promotorjem (slika 11) smo uporabljali pri testu spremljanja luciferazne aktivnosti, pcDNA3 (slika 10) pa je bil vektor, v katerega smo vstavili ustrezno rezane pomnožke dnMyD88 (dnMyD88, dnMyD88 z dodanim PIP2-vezavnim peptidom, dnMyD88 fuzije z *Renilla* luciferazo), dobljene z verižno reakcijo s polimerazo. pcDNA3 vektor vsebuje promotor CMV iz citomegalovirusa (na sliki 10 označen kot P CMV), ki je odgovoren za konstitutivno izražanje gena za njim.



Slika 10: Shema vektorja pcDNA3 z obkroženima uporabljenima restrikcijskima mestoma za vstavljanje rezanih insertov.



Slika 11: Shema vektorja pGL2 z vstavljenim NF- κ B-odvisnim promotorjem in označenimi najpomembnejšimi restrikcijskimi mesti.

3.1.6 OLIGONUKLEOTIDI ZA VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO

Preglednica 7: Oligonukleotidi, uporabljeni v diplomskem delu.

Oznaka oligonukleotida	Kratka oznaka oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje
dnMyD88-HindIII-F	P772	5'-GGCGGAAGCTTATGGCACGTTTCGATGCCTTC-3'
Rluc-XbaI-R	P773	5'-GGCGGTCTAGATTACTGCTCGTTCTTCAGCAC-3'
Rluc-HindIII-F	P774	5'-GGCGGAAGCTTATGGCTTCCAAGGTGTACGAC-3'
dnMyD88-XbaI-R	P775	5'-GGCGGTCTAGATTAGGGCAGGGACAAGGCC-3'
RdnM-sense	P776	5'-GAGCAGGGCGGATCCGGCGGGACCGCACGTTTCGATGCCTTC-3'
RdnM-antisense	P777	5'-ACGTGCGGTCCCGCCGGATCCGCCCTGCTCGTTCTTCAGCAC-3'
dnMyD88-PIP2 (R1)	P779	5'-CCAGTCGGCCATCTTGCCGAGGGGCTTCTTGGGCAGGGACAAGGCCTTGGC-3'
dnMyD88-PIP2 (F1)	P780	5'-AAGAAGCCCCTCGGCAAGATGGCCGACTGGTCCGGCAGACCCTGCTGAAG-3'
dnMyD88-PIP2 (XbaI-R)	P815	5'-GGCGGTCTAGATTACTTCTTGGGCTTCTTCAGCAGGGTCTGCCGG-3'

3.1.7 ORGANIZMI

3.1.7.1 Bakterijski sevi

Preglednica 8: Uporabljen sev bakterije *Escherichia coli*.

Sev	Genotip	Vir
DH5 α	F ⁻ / <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96, thi-1, relA1</i>	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana

3.1.7.2 Celične kulture

Preglednica 9: Uporabljene celične kulture.

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

3.1.8 GOJIŠČA

3.1.8.1 Gojenje *E. coli*

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

Preglednica 10: Tekoče gojišče LB za bakterije.

Kemikalija	Količina
gojišče LB po Millerju	25 g/l

Preglednica 11: Trdno gojišče LB za bakterije.

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

- Tekoče gojišče LB smo pripravili tako, da smo gojišče LB raztopili v destilirani vodi, nato pa ga v primerni steklovini sterilizirali. Pred inokulacijo smo po potrebi v gojišče dodali še antibiotik ampicilin v končni koncentraciji 50 µg/ml. Nacepljeno gojišče smo 16 ur inkubirali na stresalniku pri 37 °C ter 150 vrt./min.
- Trdno gojišče LB smo pripravili podobno kot tekoče gojišče, le da smo mu dodali še agar v končni koncentraciji 1,5 %. Po sterilizaciji smo ohlajenemu gojišču (približno 50 °C) dodali ampicilin v končni koncentraciji 50 µg/ml in ga razlili v sterilne plastične petrijevke. Uporabili smo jih takoj, ko so se strdile, ali pa jih sterilne do uporabe shranili pri 4 °C. Trdno gojišče smo nacepili s sterilno cepilno zanko ali pa tekočo kulturo vcepka razmazali po plošči s sterilno spatulo. Nacepljene plošče smo inkubirali 16 ur pri 37 °C.

3.2 METODE

3.2.1 STERILIZACIJA RAZTOPIN, GOJIŠČ IN STEKLOVINE

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

- sterilizacija v avtoklavu z vlažno toploto, kjer je sterilizacija potekala 20 minut pri 121 °C in $1,2 \cdot 10^5$ Pa,
- temperaturno občutljive snovi smo sterilizirali s filtriranjem, uporabili smo filter s premerom por 0,2 µm.

3.2.2 OSNOVNE METODE MOLEKULARNEGA KLONIRANJA

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

3.2.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Vse PCR reakcije smo izvedli v volumnu 50 µl, uporabljali smo DNK-polimerazo AccuPrime *Pfx* ali pa DNK-polimerazo Platinum *Pfx*. Vsebina reakcijske mešanice, ki je omogočila delovanje posamezne polimeraze, ter temperaturni program pomnoževanja sta razvidna iz preglednic 12, 13, 14 in 15.

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

Komponenta	Založna koncentracija	Koncentracija v PCR-epici	V
matrična DNK	10 ng/μl	0,2 ng/μl	2 μl
začetni oligonukleotid 1	20 pmol/μl	0,4 pmol/μl	1 μl
začetni oligonukleotid 2	20 pmol/μl	0,4 pmol/μl	1 μl
10-kratni pomnoževalni pufer za polimerazo AccuPrime <i>Pfx</i>	10 X	1 X	5 μl
polimeraza AccuPrime <i>Pfx</i>	2,5 U/μl	0,025 U/μl	0,5 μl
MQ			40,5 μl

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

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

Preglednica 14: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNK-polimerazo *Pfx*.

Komponenta	Založna koncentracija	Koncentracija v PCR-epici	V
matrična DNK	10 ng/μl	0,2 ng/μl	2 μl
začetni oligonukleotid 1	20 pmol/μl	0,4 pmol/μl	1 μl
začetni oligonukleotid 2	20 pmol/μl	0,4 pmol/μl	1 μl
10-kratni pomnoževalni pufer za polimerazo <i>Pfx</i>	10 X	1 X	5 μl
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	4 μl
MgSO ₄	50 mM	1 mM	1 μl
polimeraza <i>Pfx</i>	2,5 U/μl	0,05 U/μl	1 μl
MQ			35 μl

Preglednica 15: Program PCR pri uporabi DNK-polimeraze *Pfx*.

Stopnja		Temperatura	Čas
1.	začetna denaturacija	94 °C	2 min
2.	30 ciklov	denaturacija	94 °C
		prileganje	55 °C
		podaljševanje	68 °C
3.	zaključno podaljševanje	68 °C	1 min za 1kb
4.	konec	4° C	7 min
			neskončno

Temperaturo prileganja (T_m , ang. melting temperature) smo izračunali na podlagi spodnje enačbe:

$$\text{Enačba 1: } T_m = 4(G^* + C^*) + 2(A^* + T^*)$$

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

Po končani reakciji smo rezultate preverili z agarozno elektroforezo.

3.2.2.2 Elektroforeza DNK na agaroznem gelu

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

- PCR-produktom in restrikcijskim mešanici smo dodali 1/6 končnega volumna 6-kratnega nanašalnega pufra za agarozno elektroforezo. Poleg vzorcev smo dodali na gel še velikostni standard.
- Vzorcem, ki smo jim preverjali zgolj koncentracijo, smo dodali 1-kratni nanašalni pufer za agarozno elektroforezo. Poleg vzorcev smo na gel nanegli še mešanice 1-

-kratnega nanašalnega pufru za agarozno elektroforezo in znane koncentracije (10 ng/ μ l, 20 ng/ μ l, 50 ng/ μ l in 100 ng/ μ l) DNK-bakteriofaga lambda. To nam je omogočilo približno oceno koncentracije DNK v naših vzorcih.

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

3.2.2.3 Čiščenje pomnožkov PCR po verižni reakciji s polimerazo

Del pomnožka PCR smo po verižni reakciji s polimerazo preverili z agarozno elektroforezo, ostalo pa smo očistili s komercialno dostopnim kompletom QiaQuick PCR Purification Kit. Postopek čiščenja je potekal po navodilih proizvajalca; temelji na selektivni adsorbciji pomnožka PCR na kolono, kar omogoča izpiranje nečistoč (polimeraze, začetnih oligonukleotidov itd.). Na koncu sledi še izpiranje vezane DNK z MQ v sterilno mikrocentrifugirko.

3.2.2.4 Izolacija fragmentov DNK iz agaroznih gelov

Pri izolaciji fragmentov DNK iz agaroznih gelov smo uporabili komercialno dostopen komplet QiaEX II Gel Extraction Kit. Želeni fragment smo s skalpelom izrezali iz agaroznega gela in ga prenesli v mikrocentrifugirko. Postopek izolacije smo izvedli po navodilih proizvajalca; temelji na selektivni adsorbciji nukleinskih kislin na krogličasti nosilec. Vezavi DNK sledi spiranje nečistoč in na koncu izpiranje vezane DNK z MQ v sterilno mikrocentrifugirko.

3.2.2.5 Cepitev DNK z restrikcijskimi encimi

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

Restriksijske zmesi so vsebovale:

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

DNK smo rezali hkrati z dvema restriksijskima encimoma, in sicer s *HindIII* (reže na mestu A/AGCTT) in z *XbaI* (reže na mestu T/CTAGA), zato smo uporabili puffer REact 2, v katerem je aktivnost obeh encimov enako dobra. Restriksijsko zmes smo večinoma inkubirali 3 ure pri 37 °C. Po restrikciji smo restriksijsko mešanico zmrznili, tako smo ustavili reakcijo, ali pa jo takoj nanесли na agarozni gel, iz katerega smo nato izrezali in očistili izbrani fragment.

3.2.2.6 Ligacija

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

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

Ligacijske mešanice so vsebovale:

- izračunano količino fragmenta,
- izbrano količino vektorske DNK (v našem primeru 100 ng),

- 1 μl DNK-ligaze T4 (400 U/ μl),
- 10 μl 2-kratnega hitrega ligaznega pufra,
- sterilno MQ do končnega volumna 20 μl .

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

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

Za vnos plazmida oziroma rekombinantnega plazmida v bakterijske celice *E. coli* DH5 α smo uporabili metodo s toplotnim šokom. Kompetentne bakterijske celice (shranjene pri -70 °C) smo odtalili na ledu, jim dodali 25 μl ligacijske mešanice oziroma izbrano količino plazmidne DNK ter inkubirali na ledu 25 do 30 minut. Sledil je toplotni šok z inkubacijo 3 do 5 minut pri 42 °C. Mikrocentrifugirko s transformacijsko zmesjo smo nato takoj vrnili na led za 2 minuti, zatem pa dodali 1 ml gojišča LB in inkubirali 1 uro pri 37 °C s stresanjem pri 150 vrt./min. Celice smo zbrali s centrifugiranjem 3 minute pri 7.000 vrt./min, usedlino celic smo nato resuspendirali v manjšem volumnu supernatanta in jo razmazali na trdno gojišče LB z ustreznim antibiotikom in inkubirali pri 37 °C čez noč.

3.2.2.8 Izolacija plazmidne DNK

3.2.2.8.1 Izolacija plazmidne DNK v manjših količinah – mini prep

Izbrane kolonije s plošče LB z ustreznim antibiotikom smo precepili v stekleničke z 10 ml tekočega gojišča LB, mu dodali antibiotik in stresali pri 37 °C in 150 vrt./min preko noči. Nato smo 1,5 ml kulture odpipetirali v sterilne mikrocentrifugirke in centrifugirali 30 sekund pri 10.000 vrt./min, odstranili supernatant ter pelet resuspendirali v 100 μl pufra 1. Nato smo celice lizirali z 200 μl pufra 2, petkrat obrnili mikrocentrifugirko in 1 minuto inkubirali na ledu. Puffer 2 smo nevtralizirali s 150 μl pufra 3, premešali na vibracijskem mešalu z narobe obrnjenimi mikrocentrifugirkami in 5 minut inkubirali na ledu. Mešanico

smo centrifugirali 5 minut pri 10.000 vrt./min in nato supernatant s plazmidno DNK prenesli v sveže mikrocentrifugirke. DNK smo iz supernatanta oborili z dodatkom 2-kratnega volumna absolutnega etanola, ohlajenega na -20 °C. Po 2 minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo oborjeno DNK zbrali s centrifugiranjem 5 minut pri 10.000 vrt./min in usedlino sprali z 0,5 ml na -20 °C ohlajenega 70-odstotnega etanola in ponovno centrifugirali 5 minut pri 10.000 vrt./min. Supernatant smo odstranili, oborino pa posušili in jo nato raztopili v 20 µl TE-pufra, ki smo mu dodali RNazo.

3.2.2.8.2 Izolacija plazmidne DNK s komercialno dostopnim kompletom

Za pridobivanje čistejše plazmidne DNK smo uporabili komercialno dostopen komplet GenElute Plasmid Miniprep Kit. Izolacijo plazmidne DNK smo izvedli po navodilih proizvajalca; temelji na alkalni lizi celic in vezavi plazmidne DNK na kolono. Sledi spiranje nečistoč, na koncu pa DNK izperemo s kolone s 50 µl MQ. Na ta način smo pridobili čistejšo plazmidno DNK v višjih koncentracijah (približno 150 ng/µl).

3.2.2.8.3 Izolacija plazmidne DNK, ki ne vsebuje endotoksina

Zaradi narave naših eksperimentov DNK, ki jo transficiramo v človeško celično kulturo HEK293 ali HEK293T, ne sme vsebovati endotoksina (lipopolisaharida). V ta namen smo plazmidno DNK izolirali s komercialno dostopnim kompletom GenElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit. Izolacija je potekala po navodilih proizvajalca; temelji na alkalni lizi bakterijskih celic, sledi odstranjevanje endotoksina z ekstrakcijo v poseben puffer, ki ga nato zavržemo. Plazmidno DNK potem vežemo na kolono, sledi še dodatno izpiranje nečistoč, na koncu pa DNK speremo s kolone v sterilno mikrocentrifugirko s priloženo vodo, ki ne vsebuje endotoksina.

3.2.2.8.4 Določanje koncentracije nukleinskih kislin

Pri eksperimentih v celičnem laboratoriju je potrebna velika natančnost, zato tudi določanje koncentracije plazmidne DNK s primerjanjem s koncentracijskimi standardi na agrozem gelu ni ustrezna. Koncentracijo plazmidne DNK smo zato določali spektrofotometrično z merjenjem absorbanco pri 260 in 280 nm. Pri tem smo upoštevali, da raztopina z absorbanco 1 pri 260 nm vsebuje 50 µg/ml dvoverižne DNK. Razmerje $A_{260} : A_{280} = 1,7-1,9$ pove, da so pripravljene vzorci čisti, brez proteinskih primesi, fenola ali RNK.

3.2.2.9 Določanje nukleotidnega zaporedja

Zadnja stopnja priprave konstruktov je bila določitev njihovega nukleotidnega zaporedja. V ta namen smo plazmid z vstavljenim želenim genskim konstruktom izolirali s pomočjo GenElute Plasmid Miniprep Kit. Izolirano plazmidno DNK smo poslali podjetju MWG-BIOTECH v Nemčiji, ki je določilo nukleotidno zaporedje. Dobljene rezultate smo analizirali s programoma Gene Runner v. 3.05 (Hastings Software) in EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (EBI) ter tako preverili, ali je zaporedje pravilno oziroma ali je morda prišlo do mutacij med pomnoževanjem s PCR.

3.2.3 DELO V CELIČNEM LABORATORIJU

3.2.3.1 Gojenje človeških celičnih kultur HEK293 in HEK293T

Človeške celične kulture HEK293 in HEK293T smo gojili v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂ v posodicah, kjer so se celice lahko pritrdile na dno in rasle v monosloju. Hranila in rastne faktorje smo jim dodali v obliki gojišča DMEM z 10 % FBS. Gojišče smo redno menjali na tri do štiri dni. Ob zadostni gostoti smo jih presadili oziroma zredčili. V ta namen smo jih najprej dvakrat sprali z 10 ml sterilnega pufra PBS, nato pa prelili z 2 ml tripsina z EDTA, da so se odlepili od podlage. Tripsin smo nevtralizirali z dodatkom 10 ml

medija DMEM z 10 % FBS. Suspenzijo celic smo centrifugirali v sterilni plastični centrifugirki 5 minut pri 1.200 vrt./min pri sobni temperaturi. Medtem smo gojitveno posodico sprali s pufrom PBS ali pa si pripravili ploščo za nacep celic za izvedbo eksperimenta. Po centrifugiranju smo celicam odesali supernatant in jih nežno resuspendirali v svežem mediju DMEM z 10 % FBS. Polovico suspenzije smo vrnili v posodico, kjer so se celice ponovno pritrdile in rase, drugo polovico pa smo zavrgli ali pa smo celice najprej prešteli s pomočjo hemacitometra in jih nato ustrezno število nacepili na mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami, primerno za gojenje celičnih kultur (ang. 96-well plate), ali na ploščo s 6 luknjami, primerno za gojenje celičnih kultur (ang. 6-well plate).

3.2.3.2 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293 in HEK293T

Transfekcijo celic HEK293 in HEK293T s plazmidno DNK, ki ne vsebuje endotoksina, smo izvedli po navodilih proizvajalca. V splošnem smo jo izvedli tako, da smo dan pred transfekcijo celice nacepili v ustrezno ploščo. Celice smo nato en dan inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂, da so dosegle ustrezno gostoto. Na dan transfekcije smo najprej redčili ustrezno količino plazmidne DNK v mediju OptiMEM. Ravno tako smo v OptiMEM-u redčili transfekcijski reagent Lipofectamine 2000. Mešanico OptiMEM-a in transfekcijskega reagenta smo 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi, nato smo ji dodali mešanico DNK in OptiMEM-a. Vse skupaj smo inkubirali 20 minut na sobni temperaturi, da so nastali transfekcijski kompleksi. Transfekcijsko mešanico smo dodali celicam in jih inkubirali do naslednjega dne, ko smo celice stimulirali oziroma smo jih pustili rasti še nekaj dni in jih nato lizirali.

V grobem lahko eksperimente, ki smo jih izvajali s pomočjo celic HEK293 ali HEK293T, ločimo v dva tipa:

- merjenje luciferazne aktivnosti. V tem primeru smo dan pred transfekcijo celice nacepili na ploščo s 96 luknjami, in sicer v vsako luknjo $5 \cdot 10^4$ celic (volumen suspenzije v posamezni luknji je 100 μ l). Celice smo vedno transficirali s plazmidi, ki so vsebovali zapis za receptor hTLR4, za hMD-2, inducibilno Fluc (gen za kresničkino luciferazo – Fluc – je za inducibilnim NF- κ B-odvisnim promotorjem),

konstitutivno Rluc (gen za *Renilla* luciferazo – Rluc – je za konstitutivnim promotorjem, torej se izraža ves čas) ter s plazmidom, ki je vseboval konstrukt, čigar učinek smo želeli preizkusiti. Dan po transfekciji smo celicam najprej zamenjali gojišče, da smo odstranili transfekcijski reagent, nato pa jih stimulirali s 100 ng/ml sLPS;

- določevanje proteinske sinteze. Z namenom, da bi neposredno dokazali sintezo konstruktov, smo dan pred transfekcijo celice nacepili v ploščo s 6 luknjami, in sicer $1,5 \cdot 10^6$ celic v posamezno luknjo (volumen suspenzije v posamezni luknji je 2 ml). Celice smo naslednji dan transficirali s plazmidom, ki je vseboval zelen konstrukt. Celice smo inkubirali še tri dni, nato pa jih lizirali.

3.2.3.3 Stimulacija in liza transficiranih celic HEK293 in HEK293T

Dan po transfekciji smo celicam zamenjali gojišče s svežim medijem DMEM z 2 % FBS, da smo tako odstranili transfekcijski reagent, ki je za celice toksičen. Celicam, transficiranim s plazmidom, ki vsebuje NF- κ B-odvisni promotor, smo dodali raztopino sLPS v končni koncentraciji 100 ng/ml. Čez 24 ur smo celicam, pri katerih smo želeli meriti luciferazno aktivnost, odstranili medij in jih lizirali z ustreznim liznim pufrom (Promega). V primeru spremljanja proteinske sinteze smo celice lizirali 3 dni po transfekciji z liznim pufrom za imunoprecipitacijo ali z liznim pufrom RIPA. Lizirane celice smo zamrznili do uporabe na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4 MERJENJE LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI

Tik pred merjenjem luciferazne aktivnosti z dvojnim luciferaznim testom smo pripravili pufr za merjenje luciferazne aktivnosti. Ploščo smo vstavili v luminometer Mithras, ustrezna injektorja pa smo potopili v pufr. Pri dvojnem luciferaznem testu luminometer najprej pomeni aktivnost kresničkine luciferaze (Fluc), nato pa še aktivnost *Renilla* luciferaze (Rluc). Ker imata oba encima različna substrata, je mogoče njuno aktivnost ločeno meriti hkrati v istem vzorcu. Aktivnost Rluc nam pove delež transficiranih celic, saj

se *Renilla* luciferaza ves čas izraža in nam tako prikazuje delež celic, ki so sprejele plazmid z zapisom za Rluc, medtem ko nam aktivnost Fluc (Fluc pod NF- κ B-promotorjem) kaže aktivacijo TLR4/MD-2-signalne poti ob stimulaciji z sLPS. Razmerje Fluc/Rluc (RLE – relativne luciferazne enote) nam torej pove normalizirano vrednost stimuliranih celic glede na transficirane celice.

3.2.5 DOLOČANJE IZRAŽANJA PROTEINOV

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

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

Vzorci (lizirane celice) smo najprej centrifugirali 20 minut pri 13.000 vrt./min pri 4 °C, jim odvzeli supernatant, ki je vseboval topno frakcijo proteinov, ter mu dodali 4-kratni reducirajoči vzorčni pufer z SDS in proteine denaturirali s segrevanjem 5 minut pri 95 °C. Nato smo vzorce nanegli na gel, poleg vzorcev smo dodali še proteinski velikostni standard.

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

3.2.5.2 Prenos western

Po elektroforezni ločbi smo poliakrilamidni gel sprali z MQ in ga (med sestavljanjem aparature za prenos western) namakali v pufru za mokri prenos. Nitrocelulozno membrano (z 0,45 μm velikimi porami) in filtrirne papirje, ki so enake velikosti, kot je membrana, smo najprej namočili v pufer za mokri prenos, nato pa smo jih nalagali eno na drugo (najprej filter papir, nato nitrocelulozna membrana, poliakrilamidni gel in filter papir) in tako omogočili prenos proteinov iz gela na membrano. Pazili smo, da je bila nitrocelulozna membrana obrnjena proti anodi. Prenos je potekal 1 uro pri konstantnem toku 350 mA. Po končanem prenosu smo membrano sprali z MQ. Nato smo jo pobarvali z barvilom Ponceau-S, ki se veže na proteine, da bi se prepričali, če je prenos uspel. Barvanje v 13 ml barvila Ponceau-S je potekalo 5 do 10 minut. Ko so bili proteini obarvani, smo ozadje najprej razbarvali z MQ, nato pa na membrani s svinčnikom označili mesta velikostnih standardov, pri katerih proteini niso bili posebej obarvani. Barvilo smo nato sprali s pufrom za spiranje, ki je vseboval PBS in Tween 20.

3.2.5.3 Imunodetekcija proteinov po prenosu western

Nitrocelulozno membrano, na katero smo prenesli proteine, smo inkubirali v raztopini primarnih protiteles, po spiranju pa še v raztopini sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo. Detekcija poteka s substratom, ki vsebuje luminol; hrenova peroksidaza le-tega oksidira. Oksidiran luminol preide v vzbujeno stanje, pri prehodu v osnovno stanje pa se sprošča svetloba, ki jo zaznamo na filmu, položenem na membrano. Celoten postopek smo izvedli po naslednjem protokolu.

Nespecifična vezavna mesta na membrani smo blokirali z 0,2-odstotnim (m/v) I-BLOCK-om v pufru za spiranje. Blokiranje je potekalo 1 uro med stresanjem pri sobni temperaturi. Po blokiranju smo nitrocelulozno membrano spirali s pufrom za spiranje (2 X 5 minut). Sprano nitrocelulozno membrano smo prenesli v plastično vrečko in vanjo dodali raztopino za blokiranje z 1 : 900 redčenimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti MyD88. Zavarjeno vrečko smo 1 do 2 uri stresali pri sobni temperaturi in 50 vrt./min. Sledilo je

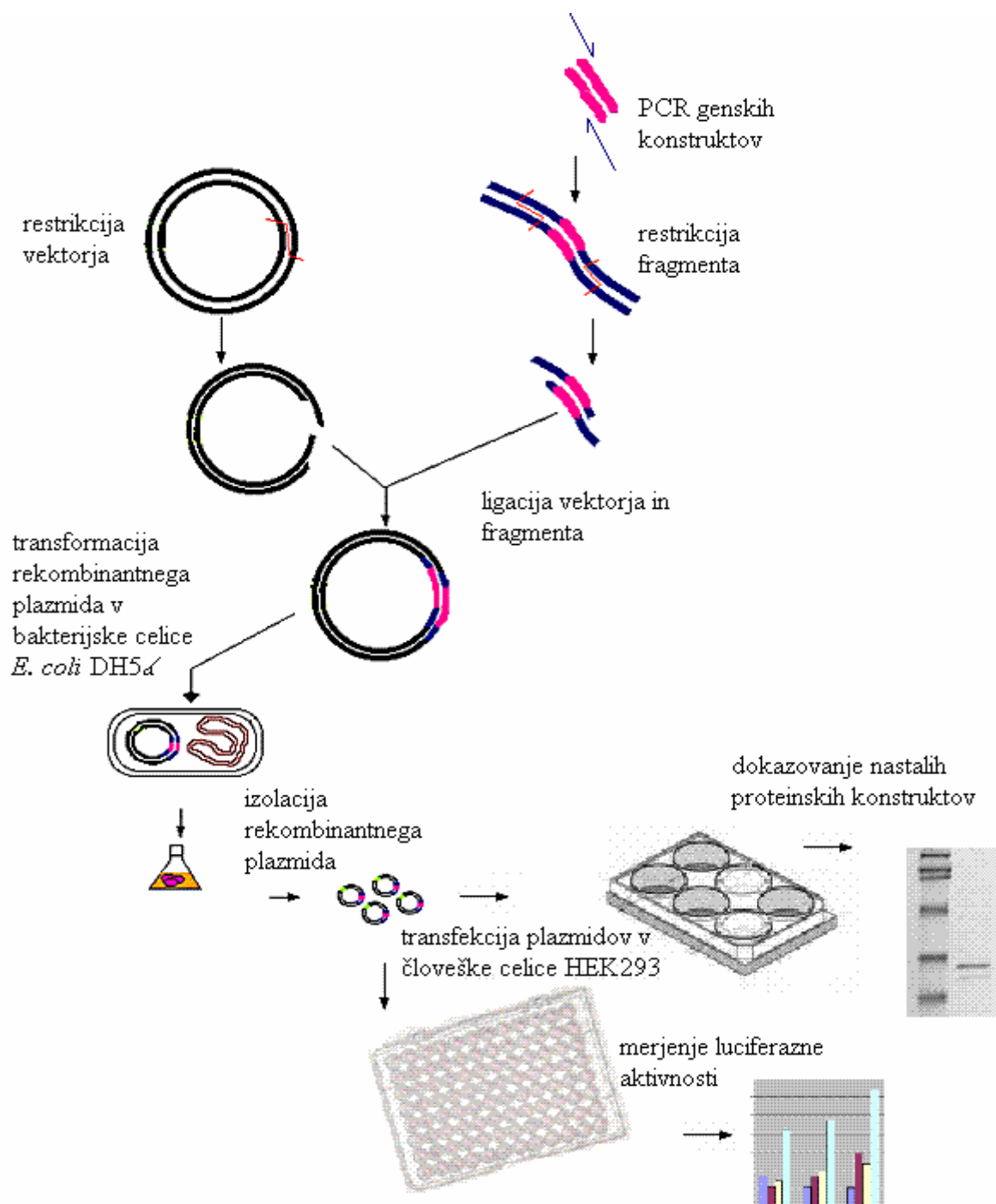
spiranje nevezanih protiteles (4 X 5 minut). Nato smo membrano inkubirali v raztopini za blokiranje s sekundarnimi 1 : 5000 redčenimi protikunčjimi protitelesi, konjugiranimi s peroksidazo. Inkubacija je potekala v zavarjeni vrečki največ 1 uro pri sobni temperaturi in 50 vrt./min. Po spiranju membrane (4 X 5 minut) smo le-to prelili z reagentom Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate. Membrano smo inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi, nato odpivnali reagent in jo položili v hibridizacijsko vrečko ter zaprli v kaseto. V temnici smo na membrano položili film. Film smo eksponirali izbrano dolgo časa. Nato smo film razvijali v kadički z razvijalcem 3 minute. Sledilo je spiranje z vodo in prenos v kadičko s fiksirjem za 3 minute. Film smo zopet sprali s tekočo vodo in ga posušili.

4 REZULTATI

4.1 PREGLED OSNOVNEGA POTEKA EKSPERIMENTOV

Osnovni potek eksperimentov, s katerimi smo želeli ugotoviti, kako spremembe proteina MyD88 vplivajo na signalizacijo receptorjev TLR, je potekal v naslednjih stopnjah (slika 12):

- pomnoževanje genskega zapisa dnMyD88 in Rluc s PCR z različnimi začetnimi oligonukleotidi. S tem smo pridobili naslednje genske konstrukte:
 - dnMyD88 (zapis za dominantno negativno obliko MyD88, torej zgolj domena TIR proteina MyD88),
 - dnMyD88-PIP2 (na C-terminalni strani dnMyD88 dodan PIP2-vezavni peptid),
 - dnMyD88-Rluc (zapis za dnMyD88, ki je na C-terminalni strani povezan z zapisom za *Renilla* luciferazo preko povezovalnega dela iz šestih aminokislin, in sicer GGTGGS),
 - Rluc-dnMyD88 (zapis za dnMyD88, ki je na N-terminalni strani povezan z zapisom za *Renilla* luciferazo preko povezovalnega dela iz aminokislin GGTGGS),
- restrikcija genskih konstruktov z restrikcijskima encimoma *Xba*I in *Hind*III ter restrikcija in s tem razvitje vektorja pcDNA3 z restrikcijskima encimoma *Xba*I in *Hind*III;
- ligacija rezanih konstruktov z rezanim vektorjem ter transformacija v bakterijske celice *E. coli* DH5 α ;
- izolacija plazmidov s pravilnimi inserti ter preverjanje njihovega nukleotidnega zaporedja;
- izolacija plazmidov brez endotoksina;
- merjenje luciferazne aktivnosti in ugotavljanje vpliva različnih konstruktov na signalizacijo receptorskega kompleksa hTLR4/hMD-2;
- dokazovanje proteinske sinteze različnih konstruktov.



Slika 12: Poenostavljena shema osnovnega poteka eksperimentov.

4.2 REZULTATI REAKCIJE POMNOŽEVANJA S POLIMERAZO

4.2.1 NAČRTOVANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA POSAMEZNE GENSKE KONSTRUKTE

- dnMyD88

dnMyD88 smo pomnoževali iz plazmida pDeNY-hMyD88 s parom začetnih oligonukleotidov, ki sta na 5'-koncu vsebovala *HindIII* oziroma *XbaI* restrikcijski mesti. Pomnoževanje gena je potekalo s polimerazo Platinum *Pfx* pri sestavi reakcije in pogojih, kot so navedeni v preglednicah 14 in 15, s časom podaljševanja 1 minuto.

- dnMyD88-Rluc

dnMyD88-Rluc smo pomnoževali iz plazmida pSB1AK3 z zapisom za dnMyD88-Rluc s parom začetnih oligonukleotidov, ki sta na 5'-koncu vsebovala *HindIII* oziroma *XbaI* restrikcijski mesti.

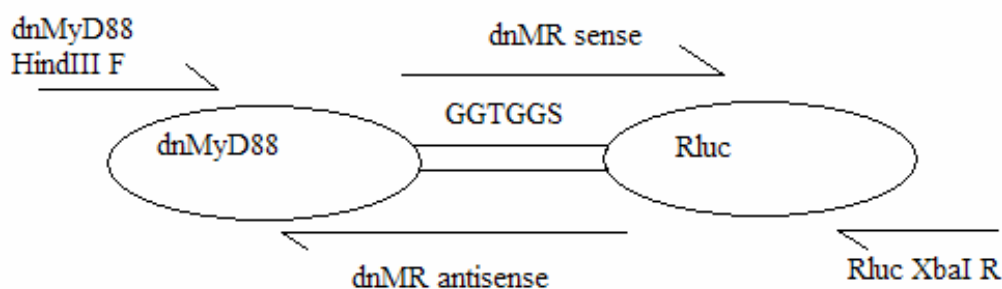
Pomnoževanje gena je potekalo s polimerazo Platinum *Pfx* pri sestavi reakcije in pogojih, kot so navedeni v preglednicah 14 in 15, s časom podaljševanja 1,5 minute.

- Rluc-dnMyD88

Celoten zapis za konstrukt Rluc-dnMyD88 smo dobili z reakcijo lepljenja s PCR. V ta namen smo uporabili štiri začetne oligonukleotide. En začetni oligonukleotid je nalegal na začetek gena za *Renilla* luciferazo (na 5'-koncu vseboval zapis za restrikcijsko mesto, ki ga prepozna restrikcijski encim *HindIII*), drugi pa je bil komplementaren koncu gena dnMyD88 (ta oligonukleotid je na 5'-koncu vseboval zapis za restrikcijsko mesto, ki ga prepozna restrikcijski encim *XbaI*). Vmesna oligonukleotida pa smo načrtovali tako, da sta si bila med seboj komplementarna. Del oligonukleotida se je vezal na konec gena *Renilla* luciferaze, del pa na začetek gena dnMyD88 (slika 13). Vmes se je nahajalo zaporedje, ki je tvorilo povezovalni del med *Renilla* luciferazo in dnMyD88; to je bilo zaporedje, ki je kodiralo aminokislino GGTGGS. Za nastanek celotnega konstrukta so bile potrebne tri

PCR reakcije. Najprej smo pomnožili gen za *Renilla* luciferazo ter gen za dnMyD88, v tretji reakciji pa smo kot matrico uporabili produkta prvih dveh PCR-reakcij. V tej reakciji sta se produkta zlepila zaradi komplementarnih koncev.

Pomnoževanje v prvih dveh reakcijah je potekalo s polimerazo Platinum *Pfx* pri sestavi reakcije in pogojih, kot so navedeni v preglednicah 14 in 15, s časom podaljševanja 1 minuto, v tretji reakciji pa smo uporabili DNK-polimerazo AccuPrime *Pfx*, ki je primernejša za pomnoževanje daljših fragmentov. Pomnoževanje je potekalo pri sestavi reakcije in pogojih, kot so navedeni v preglednicah 12 in 13, s časom podaljševanja 1,5 minute.

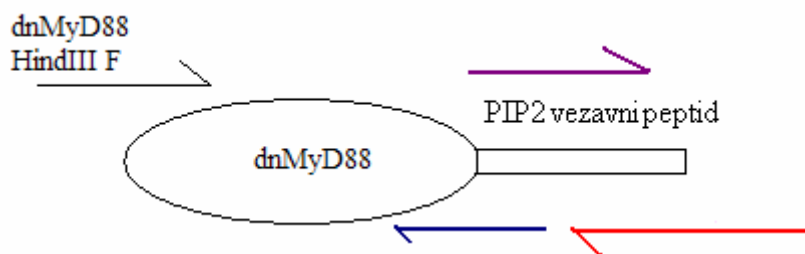


Slika 13: Shema načrtovanja pomnoževanja genskega konstrukta dnMyD88-Rluc (začetni oligonukleotidi so označeni s polovičnimi puščicami).

- dnMyD88-PIP2

V primeru genskega konstrukta dnMyD88-PIP2 smo želeli na C-terminalni del proteina dnMyD88 dodati zaporedje PIP2-vezavnega peptida iz naslednjega zaporedja aminokislin KKPLGKMADWFRQTLLKKPKK (Kagan in Medzhitov, 2006). Zaporedje smo sestavili iz treh medsebojno komplementarnih začetnih oligonukleotidov (slika 14), uporabili pa smo strategijo lepljenja s PCR. V prvi reakciji smo uporabili začetni oligonukleotid, ki je nalegal na konec gena za dnMyD88, v drugo reakcijo pa smo poleg produkta prve reakcije dodali še mešanico vseh treh začetnih oligonukleotidov.

Pomnoževanje gena je potekalo s polimerazo Platinum *Pfx* pri sestavi reakcije in pogojih, kot so navedeni v preglednicah 13 in 14, s časom podaljševanja 1 minuto.



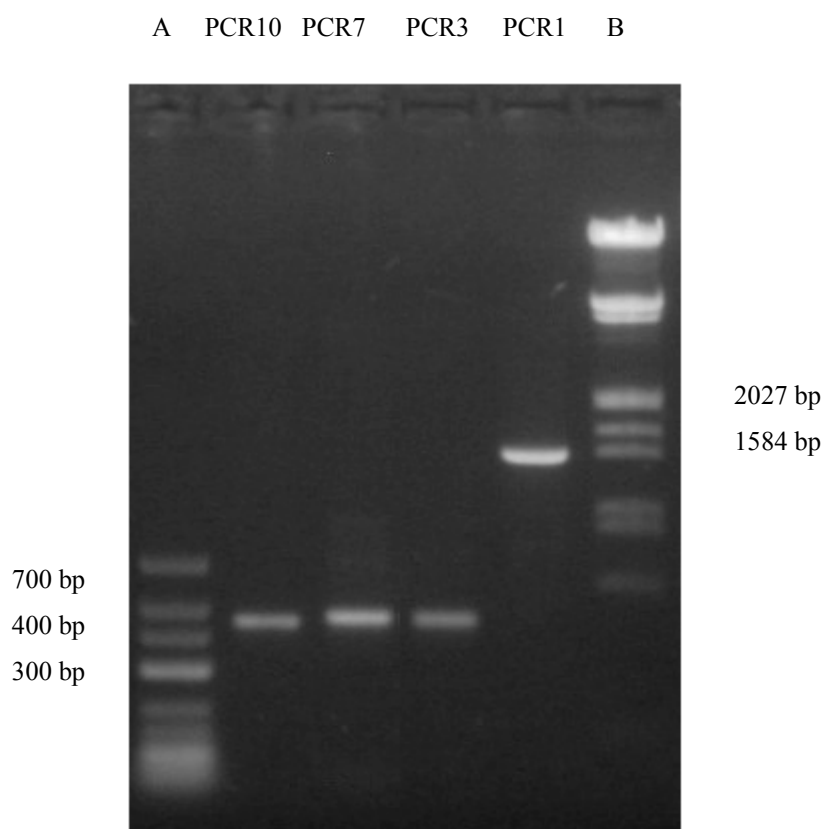
Slika 14: Shema načrtovanja pomnoževanja genskega konstrukta dnMyD88-PIP2 (začetni oligonukleotidi so označeni s polovičnimi puščicami).

Preglednica 16: Pregled PCR-reakcij.

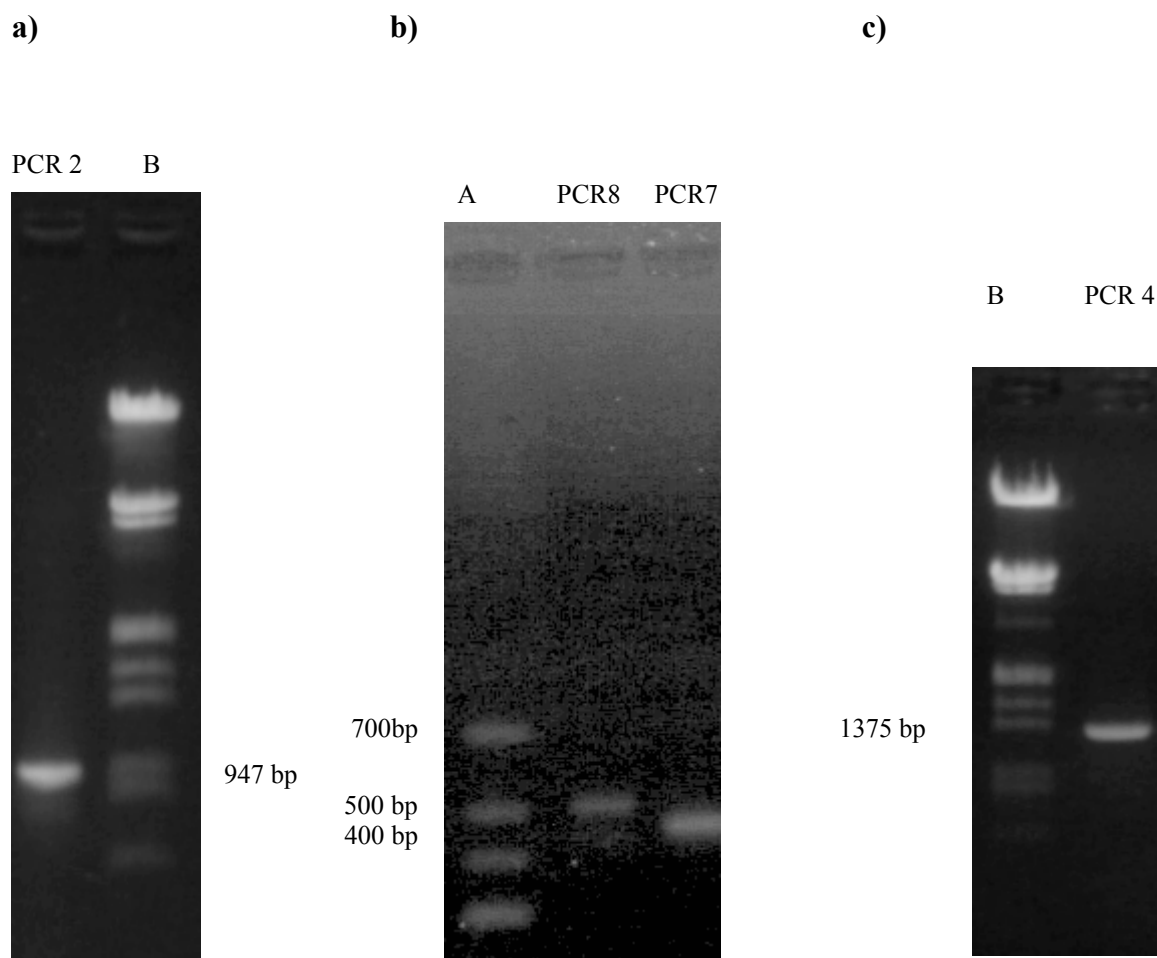
Nastali fragment	Ime reakcije	DNK-matrica	Uporabljeni oligonukleotidi	Pričakovana velikost fragmenta
dnMyD88-Rluc	PCR 1	zapis za dnMyD88-Rluc v vektorju pSB1AK3	P772 in P773	1382 bp
Rluc-povezovalni del	PCR 2	phRL-TK	P774 in P777	970 bp
povezovalni del-dnMyD88	PCR 3	pDeNY-hMyD88	P776 in P775	435 bp
Rluc-dnMyD88	PCR4	PCR 2 in PCR3	P774 in P775	1379 bp
dnMyD88-del PIP2	PCR 7	pDeNY-hMyD88	P772 in P779	435 bp
dnMyD88-PIP2	PCR 8	PCR 7 in P779 ter P780	P772 in P815	503 bp
dnMyD88	PCR 10	pDeNY-hMyD88	P772 in P775	435 bp

4.2.2 PRODUKTI POMNOŽEVANJA S POLIMERAZO

Po končanih PCR-reakcijah smo del reakcijske mešanice nanegli na agarozni gel in preverili, ali smo dobili produkt ustrezne velikosti (slika 15 in 16). Ostali del produkta smo očistili s komercialnim kompletom QiaQuick PCR Purification Kit.



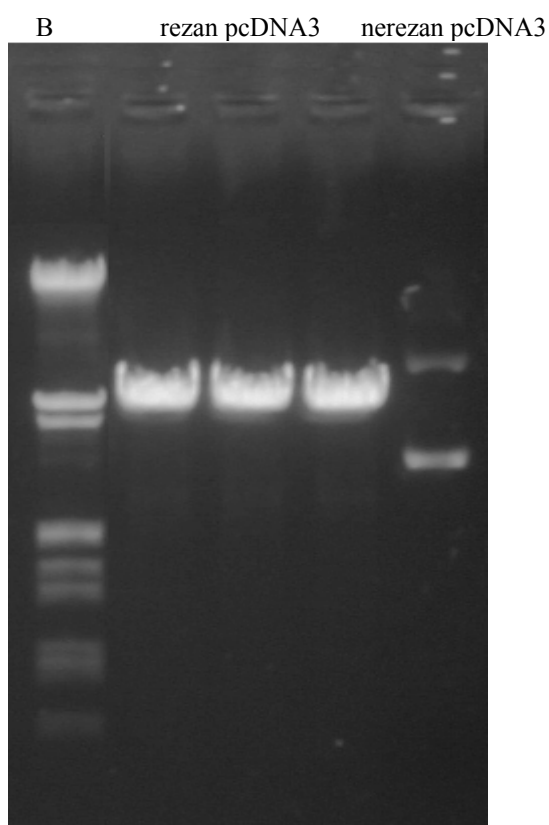
Slika 15: Slika 1,1-odstotnega agaroznega gela s produkti PCR-reakcij 1, 3, 7, 10. Na gelu je nanešen DNK-standard Gene Ruler DNA Ladder Low Range (označen na gelu kot A; nanegli smo ga 2 μ l); očiščeni produkti PCR-reakcij, in sicer po 1 μ l očiščenega produkta PCR10 (dnMyD88), PCR7 (dnMyD88-del PIP2), PCR3 (povezovalni del-dnMyD88) ali PCR1 (dnMyD88-Rluc) v 10 μ l 1-kratnega nanašalnega pufra; Standard λ *EcoRI/HindIII* (na sliki označen kot B; naneseemo 5 μ l standarda in 5 μ l 6-kratnega nanašalnega pufra).



Slika 16: Slika agaroznega gela s produkti PCR-reakcij 2, 4, 7, 8. **a)** Slika 1,1-odstotnega agaroznega gela, na katerem je nanešen DNK-standard λ *EcoRI/HindIII* (na sliki označen kot B; nanesli smo 5 μ l standarda in 5 μ l 6-kratnega nanašalnega pufra) ter PCR2 (Rluc-povezovalni del; 5 μ l produkta PCR2 in 5 μ l 6-kratnega nanašalnega pufra) **b)** Slika 1,6-odstotnega agaroznega gela, na katerem je nanešen standard Gene Ruler DNA Ladder Low Range (označen na gelu kot A; nanesli smo ga 2 μ l) in očiščeni produkti PCR-reakcij, in sicer po 1 μ l očiščenega produkta PCR8 (dnMyD88-PIP2) ali PCR7 (dnMyD88-del PIP2) v 10 μ l 1-kratnega nanašalnega pufra. **c)** Slika 1,1-odstotnega agaroznega gela s produktom PCR-reakcije 4. Na gelu je nanešen DNK-standard λ *EcoRI/HindIII* (na sliki označen kot B; nanesemo 5 μ l standarda in 5 μ l 6-kratnega nanašalnega pufra) ter PCR4 (očiščen PCR produkt Rluc-dnMyD88, nanesli smo ga 1 μ l v 10 μ l 1-kratnega nanašalnega pufra).

4.3 RESTRIKCIJA GENSKIH PRODUKTOV IN VEKTORJA

Očiščene PCR-produkte ter vektor pcDNA3 smo rezali z restriktijskima encimoma *HindIII* in *XbaI*, kakor je napisano v poglavju Metode (cepitev DNK z restriktijskimi encimi).

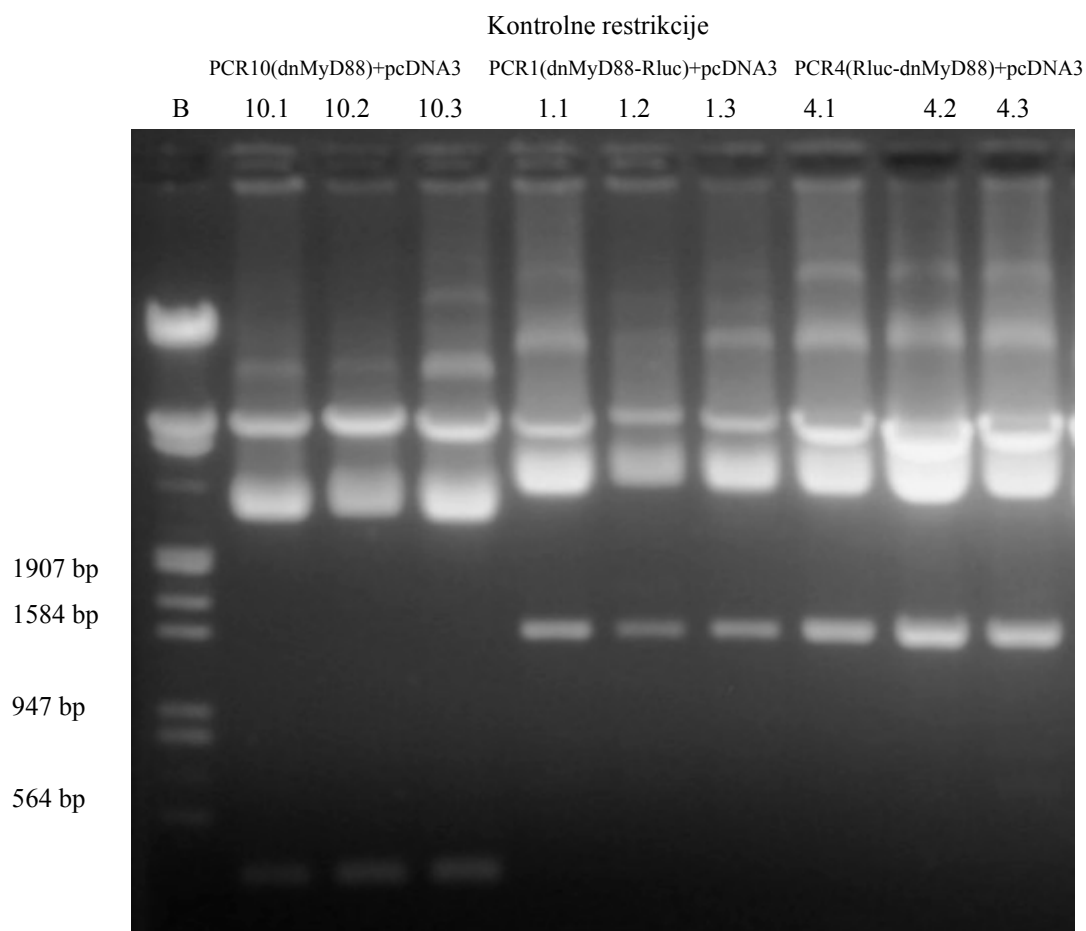


Slika 17: Slika 0,8-odstotnega agaroznega gela z rezanim vektorjem pcDNA3. Na gelu je nanešen DNK-standard λ *EcoRI/HindIII* (na sliki označen kot B; nanesemo 5 μ l standarda in 5 μ l 6-kratnega nanašalnega pufra) ter rezan vektor pcDNA3 (rezan s *HindIII* in *XbaI*, nanešena je celotna 50 μ l restriktijska mešanica ter 8 μ l 6-kratnega nanašalnega pufra), za primerjavo je nanešen še nerezan vektor v prvi luknji z leve.

Restrikcije vektorja pcDNA3 in produktov PCR smo ponovno preverili na agaroznem gelu (slika 17). Fragmenti rezanih produktov PCR so bili zelo podobnih velikosti kot produkti reakcij PCR (slike agaroznih gelov z restrikcijami produktov PCR zato niso prikazane).

4.4 NADALJNJE FAZE MOLEKULARNEGA KLONIRANJA

Restrikciji so sledile nadaljnje faze, kakor so opisane v poglavju Metode, torej najprej ligacija rezanih genskih konstruktov z rezanim vektorjem pcDNA3. Poleg ligacije rezanega vektorja z rezanimi genskimi konstrukti smo naredili še ligacijo samega vektorja, da bi ugotovili, ali smo vektor učinkovito rezali z obema encimoma. Nato je sledila transformacija ligacijskih mešanic. Na LBA-ploščah, kamor smo razmazali ligacijsko mešanico samega vektorja, smo dobili zelo malo transformant, kar je pomenilo, da je bil vektor dobro rezan. Na LBA-ploščah, kamor smo razmazali ligacijske mešanice vektorja in rezanega genskega konstrukta, je običajno zraslo veliko transformant. Nekaj izbranih transformant smo s trdnega gojišča precepili v tekoče gojišče ter izolirali plazmid. Sledila je kontrolna restrikcija (z encimoma *HindIII* in *XbaI*), s katero smo preverili, ali se je rezan genski konstrukt res vstavil v rezan vektor (slika 18).



Slika 18: Slika 1,2-odstotnega agaroznega gela prikazuje primer kontrolne restrikcije. Na agaroznem gelu je nanešen DNK-standard λ *EcoRI/HindIII* (na sliki označen kot B; nanesemo 5 μ l standarda in 5 μ l 6-kratnega nanašalnega pufra) ter kontrolne restrikcije vektorja pcDNA3 z vstavljenimi navedenimi produkti PCR-reakcij (nanešena je celotna 20 μ l restrikcijska mešanica ter 4 μ l 6-kratnega nanašalnega pufra).

Izmed uspešno ligiranih rekombinantnih plazmidov smo izbrali po dva klona in jih poslali na določanje nukleotidnega zaporedja. Pri vseh klonih se je določeno zaporedje ujemalo z nukleotidnimi zaporedji iz baz podatkov, zato smo lahko nadaljevali z eksperimenti v celičnem laboratoriju.

4.5 REZULTATI DOKAZOVANJA IZRAŽANJA PROTEINOV

Pred pričetkom z eksperimenti, s katerimi smo želeli dokazati sintezo naših konstruktov, smo z internetnim orodjem ProtParam (Expasy) določili njihovo približno velikost.

Preglednica 17: Približne velikosti proteinskih konstruktov.

Konstrukt	Velikost (kDa)
MyD88-AU (pozitivna kontrola)	33,23
dnMyD88	16,26
dnMyD88-PIP2	20,12
dnMyD88-Rluc	52,65
Rluc-dnMyD88	52,52

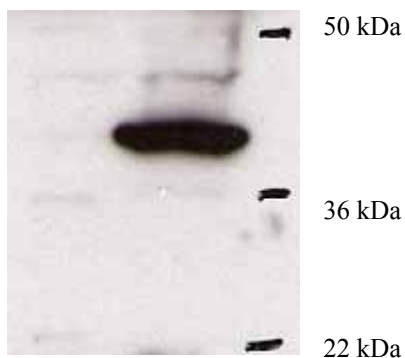
- Rezultati eksperimenta dokazovanja proteinske sinteze za MyD88-AU in Rluc-dnMyD88

Preglednica 18: Načrt transfekcije za dokazovanje proteinske sinteze MyD88-AU in Rluc-dnMyD88.

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Količina transficirane DNK
MyD88-AU	4000 ng MyD88-AU
Rluc-dnMyD88	4000 ng Rluc-dnMyD88

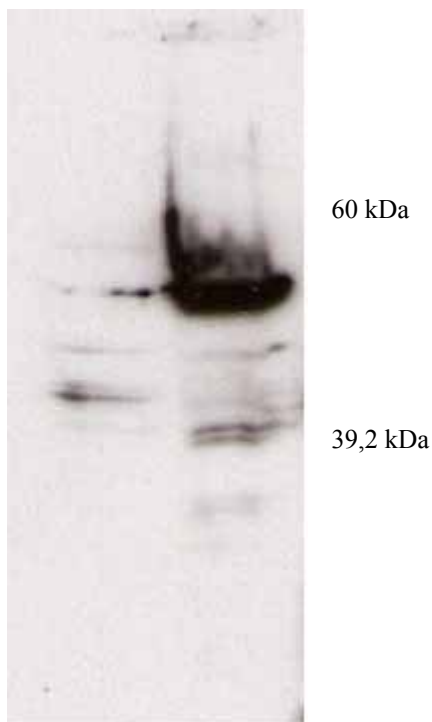
Poleg topne frakcije celičnega lizata transficiranih celic smo na SDS-gel nanesti tudi topno frakcijo celičnega lizata celic, ki niso bile transficirane in so nam predstavljale negativno kontrolo. Z negativno kontrolo smo potrdili, da je prišlo do specifične vezave protiteles s konstrukti.

neg. kont. MyD88-AU



Slika 19: Detekcija proteina MyD88-AU z 1 : 900 redčenimi zajčjimi protitelesi proti MyD88 ter 1 : 5000 redčenimi protizajčjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo. Poleg smo nanegli še proteinski standard SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard. Proteine smo ločevali na 17,5-odstotnem SDS-gelu. Ekspozicija filma je trajala 1 minuto.

neg. kont. Rluc-dnMyD88



Slika 20: Detekcija proteina Rluc-dnMyD88 z 1 : 900 redčenimi zajčjimi protitelesi proti MyD88 ter 1 : 5000 redčenimi protizajčjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo. Poleg smo nanegli še proteinski standard Blue-Ranger Pre-Stained Protein Molecular Weight Marker Mix. Proteine smo ločevali na 17,5-odstotnem SDS-gelu. Ekspozicija filma je trajala 1 minuto.

Sliki 19 in 20 prikazujeta detekcijo izražanja konstruktov MyD88-AU in Rluc-dnMyD88; močnejše obarvani lisi ustrezata pričakovani velikosti proteinov. Produkcije ostalih konstruktov v celicah HEK293T nismo uspeli dokazati s pomočjo membranskega odtisa.

4.6 REZULTATI MERJENJA LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI

Pred eksperimenti s človeškimi celicami smo najprej morali potrebne plazmide izolirati brez endotoksina ter spektrofotometrično določiti njihove koncentracije in čistost. Vsi plazmidi so bili zadosti čisti za nadaljnjo uporabo.

Za določanje vpliva sprememb proteina MyD88 na signalizacijo receptorjev TLR smo celice HEK293 transficirali s posameznimi genskimi konstrukti, poleg tega smo vedno dodali še plazmide z zapisom za receptor hTLR4, za hMD-2, za inducibilno kresničkino luciferazo ter konstitutivno *Renilla* luciferazo. Kresničkina luciferaza pod NF- κ B-odvisnim promotorjem kaže aktivacijo signalne poti ob stimulaciji z sLPS (aktivacija TLR-signalne poti preko MyD88 vodi v aktivacijo od NF- κ B-odvisnega promotorja in sintezo vnetnih citokinov), konstitutivno *Renilla* luciferazo pa uporabimo za normalizacijo transfekcije. Povečanje razmerja Fluc/Rluc glede na kontrolo (transficirano brez genskih konstruktov, ki smo jih preizkušali) torej kaže na aktivacijo TLR4/MD-2-signalne poti ob stimulaciji z sLPS, zmanjšanje pa njeno inhibicijo. Vsi naši genski konstrukti so bili ligirani v vektor pcDNA3, zato so se konstitutivno izražali.

Posamezno varianto smo vedno izvedli v vsaj treh ponovitvah, vedno smo primerjali tudi celice stimulirane s 100 ng/ml sLPS in nestimulirane celice. Vsako ponovitev smo pri vseh možnih variantah transficirali z enako količino DNK (do enake količine smo dodajali vektor pcDNA3 brez inserta).

Najprej smo želeli ugotoviti, kolikšno mora biti razmerje med receptorjem TLR4/MD-2 in dnMyD88, da pride do inhibicije signalizacijske poti. Literaturni podatki (Medzhitov in sod., 1998) so nakazovali, da se inhibicija veča s poviševanjem razmerja med TLR4/MD-2 in dnMyD88, zato smo preizkusili razmerja od 1 : 1 do 1 : 8.

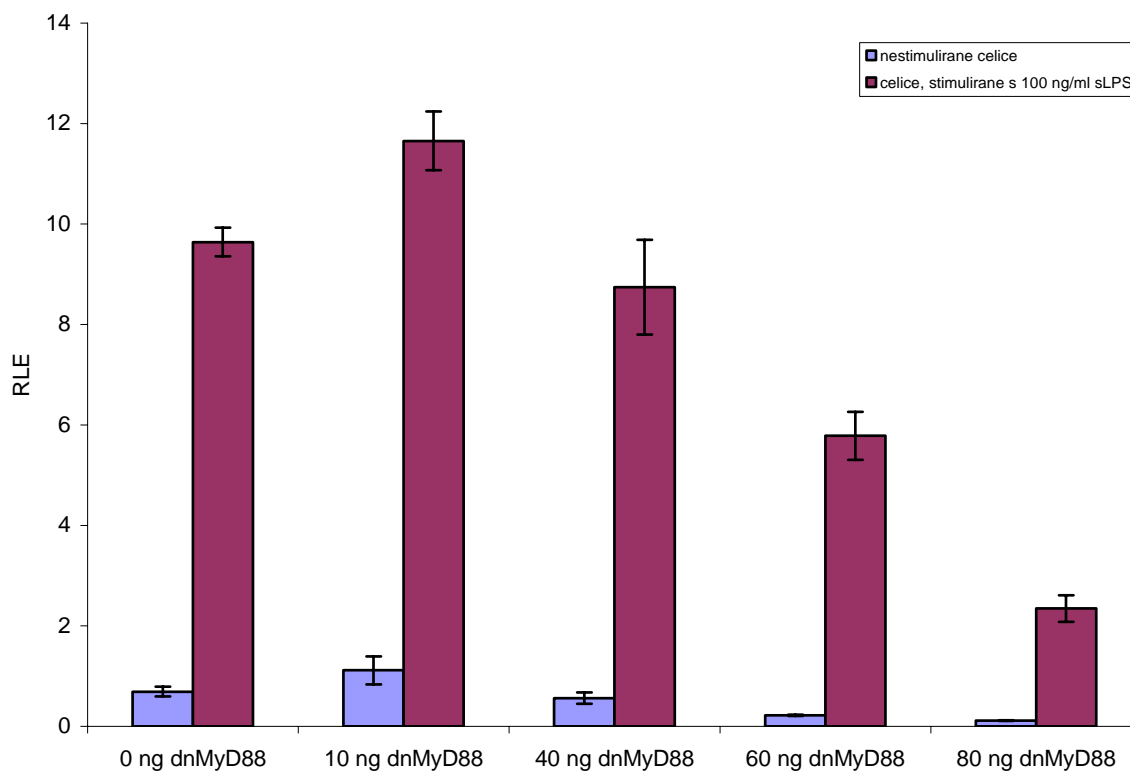
- Ugotavljanje količine dnMyD88, potrebne za inhibicijo TLR4/MD-2-signalne poti

Preglednica 19: Načrt transfekcije za poskus ugotavljanja ustrezne količine dnMyD88, pri kateri pride do inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti.

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Število ponovitev		Količina transficirane DNK
	stimulirane	nestimulirane	
0 ng dnMyD88	3	4	10 ng hTLR4, 10 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 100 ng pcDNA3
10 ng dnMyD88	3	3	10 ng hTLR4, 10 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 10 ng dnMyD88, 90 ng pcDNA3
40 ng dnMyD88	3	3	10 ng hTLR4, 10 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 40 ng dnMyD88, 60 ng pcDNA3
60 ng dnMyD88	3	3	10 ng hTLR4, 10 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 60 ng dnMyD88, 40 ng pcDNA3
80 ng dnMyD88	3	3	10 ng hTLR4, 10 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 80 ng dnMyD88, 20 ng pcDNA3

Preglednica 20: Rezultati merjenja luciferazne aktivnosti za poskus ugotavljanja ustrezne količine dnMyD88, pri kateri pride do inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti.

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Meritve (relativne luciferazne enote = RLE)				stimulirane celice		nestimulirane celice	
	stimulirane		nestimulirane		povprečje	st. odklon	povprečje	st. odklon
0 ng dnMyD88	9,9639	9,4325	0,6804	0,8250	9,6411	0,2835	0,6914	0,0994
	9,5268		0,5845	0,6758				
10 ng dnMyD88	11,0156	11,7914	0,8795	1,4218	11,6549	0,5831	1,1160	0,2778
	12,1576		1,0466					
40 ng dnMyD88	7,8602	8,6363	0,4499	0,5584	8,7443	0,9427	0,5607	0,1120
	9,7363		0,6739					
60 ng dnMyD88	5,7286	6,2837	0,2334	0,2146	5,7829	0,4759	0,2198	0,0119
	5,3366		0,2114					
80 ng dnMyD88	2,0402	2,5034	0,1178	0,1076	2,3465	0,2653	0,1151	0,0066
	2,4960		0,1200					



Slika 21: Ugotavljanje ustrezne količine dnMyD88, pri kateri pride do inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti.

Iz rezultatov smo ugotovili, da je za statistično značilno inhibicijo (pri stopnji značilnosti 0,01) TLR4/MD-2-signalizacijske poti v našem primeru potrebno razmerje med receptorjem TLR4 in dnMyD88 vsaj 1 : 6 (slika 21). V nadaljnjih poskusih smo običajno uporabljali razmerje 1 : 8, saj je pri tem razmerju inhibicija še boljša (statistična obdelava rezultatov je v prilogi B).

- Rezultati eksperimenta s konstruktoma dnMyD88-Rluc in Rluc-dnMyD88

Eksperimenti s konstruktoma dnMyD88-Rluc in Rluc-dnMyD88 so se od ostalih razlikovali v tem, da že sama konstrukta vsebujeta *Renilla* luciferazo, ki se tudi konstitutivno izraža (sliki 22 in 24). Pri ostalih eksperimentih smo konstitutivno *Renilla* luciferazo uporabili za normalizacijo transfekcije. V primeru konstruktov z *Renilla* luciferazo smo eksperimente zasnovali tako, da smo primerjali vpliv na inhibicijo TLR4/MD-2-signalne poti pri nizki količini konstrukta (kjer zaradi majhnega razmerja med receptorjem TLR4/MD-2 in potencialnim inhibitorjem še ne pride do inhibicije) in pri veliki količini konstrukta (kjer je razmerje med receptorjem TLR4/MD-2 in potencialnim inhibitorjem večje od 1 : 6 in lahko pride do inhibicije) (sliki 23 in 25).

Preglednica 21: Načrt transfekcije pri ugotavljanju vpliva proteinov dnMyD88-Rluc in Rluc-dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.

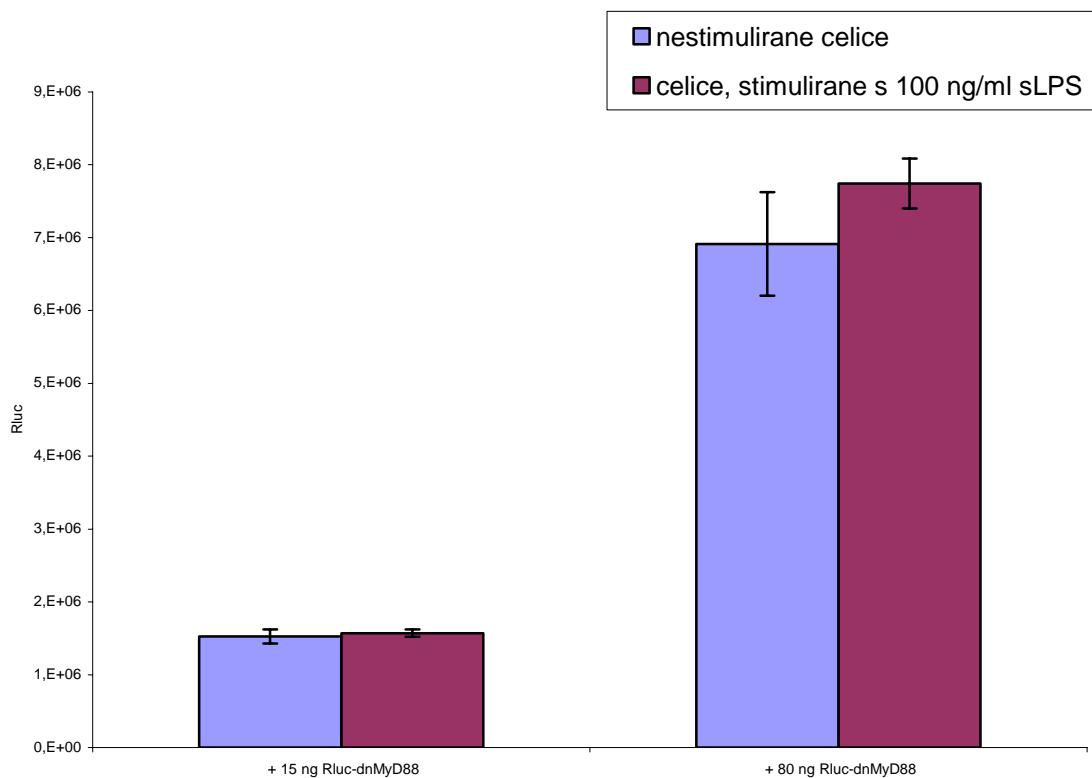
Poimenovanje transfekcijske mešanice	Število ponovitev		Količina transficirane DNK
	stimulirane	nestimulirane	
+ 15 ng dnMyD88-Rluc	3	4	5 ng hTLR4, 5 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng dnMyD88-Rluc, 65 ng pcDNA3
+ 80 ng dnMyD88-Rluc	4	4	5 ng hTLR4, 5 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 80 ng dnMyD88-Rluc
+ 15 ng Rluc-dnMyD88	3	4	5 ng hTLR4, 5 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc-dnMyD88, 65 ng pcDNA3
+ 80 ng Rluc-dnMyD88	4	4	5 ng hTLR4, 5 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 80 ng Rluc-dnMyD88

Preglednica 22: Rezultati merjenja aktivnosti *Renilla* luciferaze pri poskusu ugotavljanja vpliva proteinov dnMyD88-Rluc in Rluc-dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.

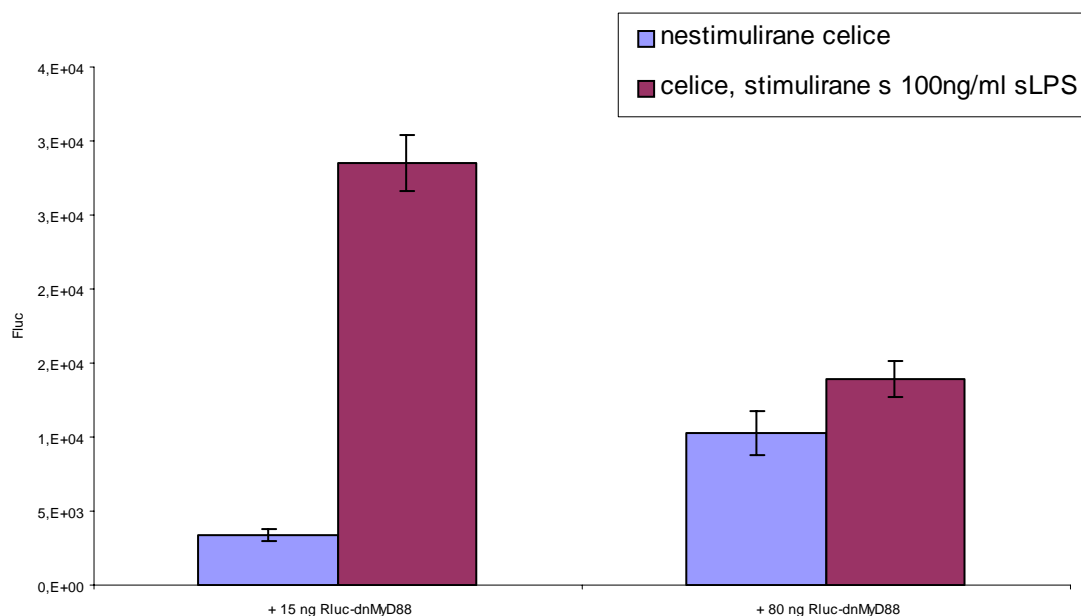
Poimenovanje transfekcijske mešanice	Meritve (Rluc)		Stimulirane celice		Nestimulirane celice	
	stimulirane	nestimulirane	povprečje	st. odklon	povprečje	st. odklon
+ 15 ng dnMyD88-Rluc	323360					
	226230	197510				
	249660	216440	269307,5	41787,4	212553,3	13525,5
	277980	223710				
+ 80 ng dnMyD88-Rluc	3615880	2842632				
	3267860	2669340	3459156	144104	2885523,3	447781
	3492940	2505457				
		3524664				
+ 15 ng Rluc-dnMyD88	1626120	1633649				
	1563140	1445816	1571366	51138,7	1527025	96461,1
	1524840	1501610				
	8233162					
+ 80 ng Rluc-dnMyD88	7517748	6455104	7742819	344742	6912297	709612
	7487172	6552012				
		7729774				
	7733194					

Preglednica 23: Rezultati merjenja aktivnosti kresničkine luciferaze pri poskusu ugotavljanja vpliva proteinov dnMyD88-Rluc in Rluc-dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.

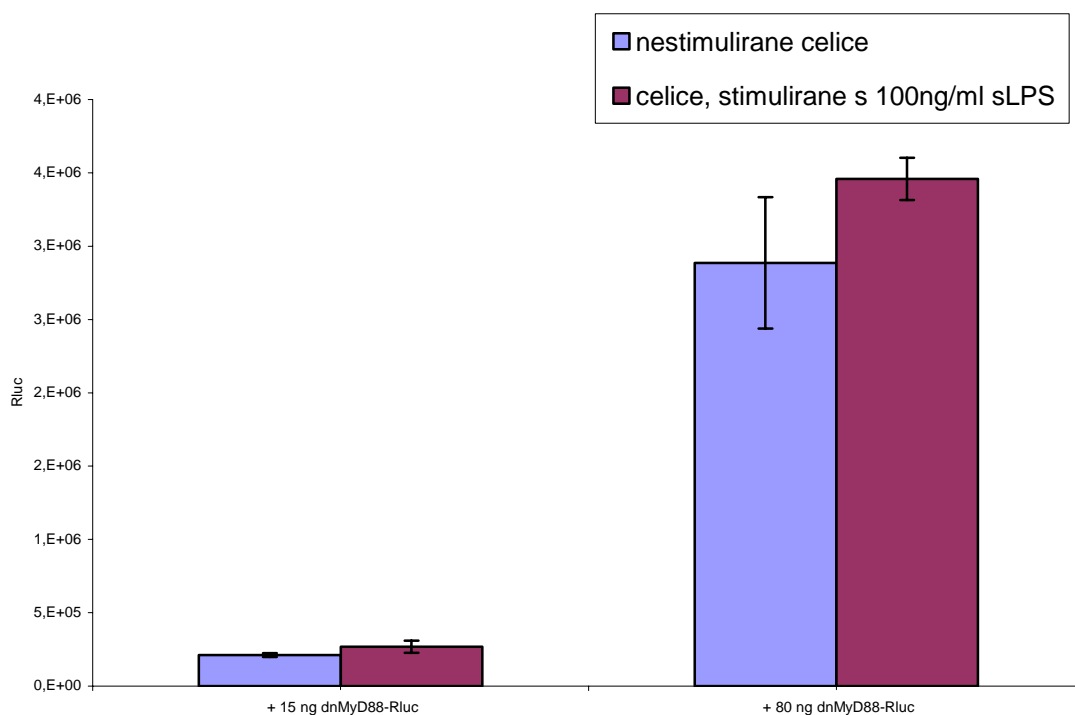
Poimenovanje transfekcijske mešanice	Meritve (Fluc)				Stimulirane celice		Nestimulirane celice	
	stimulirane		nestimulirane		povprečje	st. odklon	povprečje	st. odklon
+ 15 ng dnMyD88- Rluc	598170	410090	13980	17010	457802	59648,2	15450	1517
	382250	440700	15360					
+ 80 ng dnMyD88- Rluc	520340	489704	14898	18870	463596	50372,7	18645,3	2766,3
	433970	410370	21560	19253				
+ 15 ng Rluc- dnMyD88	30010	29280	3774	3281	28567,3	1901,9	3343,3	403,1
	26412		2975					
+ 80 ng Rluc- dnMyD88	13559	12761	8502	11000	13935,3	1172,2	10231,6	1501
	13874	15547	11193					



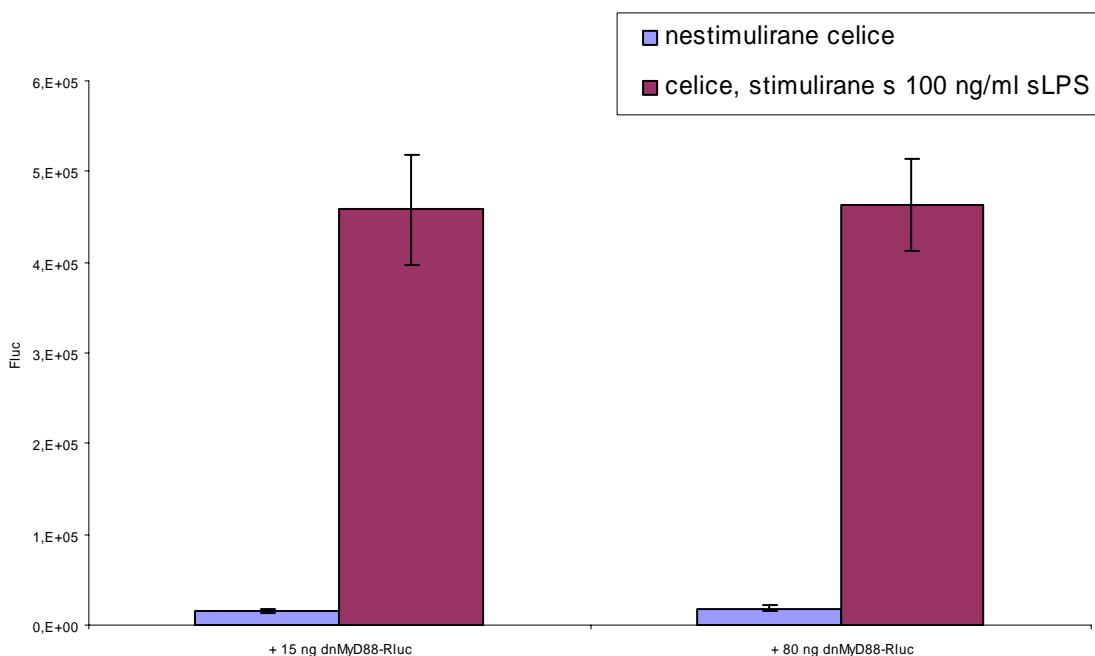
Slika 22: Produkcija proteina RLuc-dnMyD88 v celicah HEK293, spremljana preko aktivnosti *Renilla* luciferaze, je sorazmerna s količino transficiranega plazmida.



Slika 23: RLuc-dnMyD88 inhibira aktivacijo NF- κ B v transficiranih celicah HEK293, stimuliranih z LPS, preko TLR4/MD-2-signalizacijske poti. Aktivacijo smo spremljali preko poročevalnega plazmida s kresničkino luciferazo.



Slika 24: Produkcija proteina dnMyD88-Rluc v celicah HEK293, spremljana preko aktivnosti *Renilla* luciferaze, je sorazmerna s količino transficiranega plazmida.



Slika 25: dnMyD88-Rluc ne inhibira aktivacije NF- κ B v transficiranih celicah HEK293, stimuliranih z LPS, preko TLR4/MD-2-signalizacijske poti. Aktivacijo smo spremljali preko poročevalnega plazmida s kresničkino luciferazo.

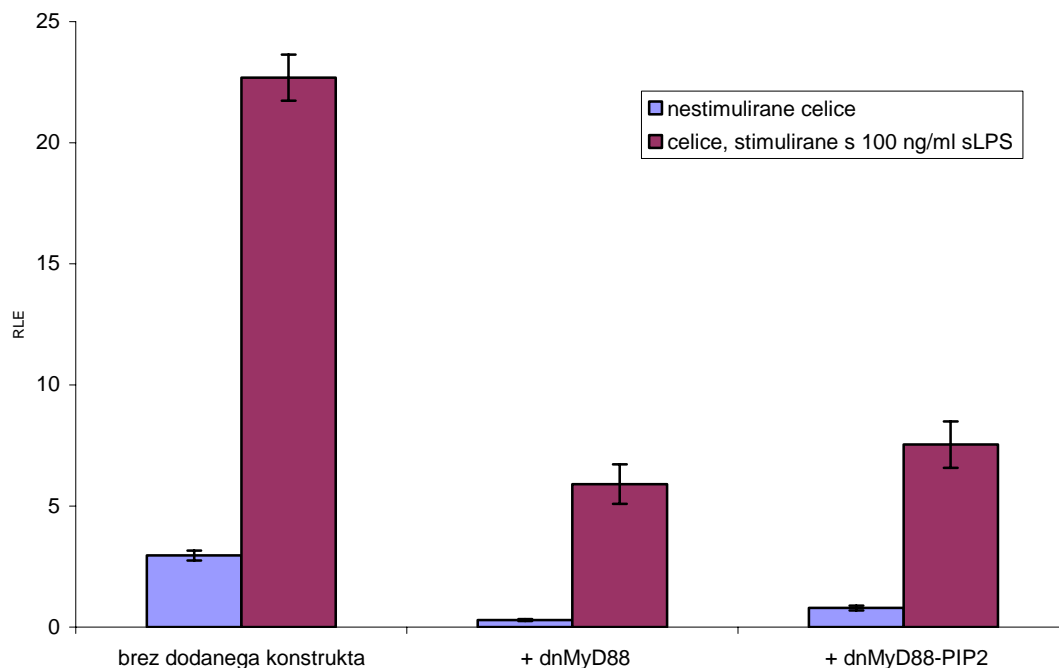
- Vpliv prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot

Preglednica 24: Načrt transfekcije pri ugotavljanju vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Število ponovitev		Količina transficirane DNK
	stimulirane	nestimulirane	
brez dodanega konstrukta	4	4	10 ng hTLR4, 10 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 80 ng pcDNA3
+ dnMyD88	4	4	10 ng hTLR4, 10 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 80 ng dnMyD88
+ dnMyD88-PIP2	6	5	10 ng hTLR4, 10 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 80 ng dnMyD88-PIP2

Preglednica 25: Rezultati merjenja luciferazne aktivnosti pri poskusu ugotavljanja vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Meritve (RLE)				Stimulirane celice		Nestimulirane celice	
	stimulirane		nestimulirane		povprečje	st. odklon	povprečje	st. odklon
brez dodanega konstrukta	23,4390	22,4122	2,9008	3,2216	22,6893	0,9533	2,9566	0,2058
	21,4590	23,4470	2,9778	2,7260				
+ dnMyD88	5,0358	5,3950	0,2693	0,3341	5,9032	0,8156	0,2897	0,0359
	6,7304	6,4515	0,2533	0,3020				
+ dnMyD88-PIP2	7,5700	7,2747	0,8463	0,8497	7,5387	0,9596	0,7894	0,0988
	6,6215	8,9884	0,7389	0,6391				
	8,2680	6,5097	0,8731					



Slika 26: Ugotavljanje vpliva dodatka PIP2-vezavnega peptida na C-terminalni konec dnMyD88 na inhibicijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti.

Slika 26 prikazuje vpliv dodatka PIP2-vezavnega peptida na C-terminalni konec dnMyD88 na inhibicijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti. Konstrukti dnMyD88-PIP2 sicer inhibira signalizacijsko pot, vendar pa je pri stopnji značilnosti 0,005 inhibicija v primeru dnMyD88-PIP2 slabša kot v primeru dnMyD88. Iz slike 26 je razvidno tudi, da se poleg vrednosti celic, stimuliranih z LPS, spreminjajo tudi vrednosti nestimuliranih celic. Zato smo se odločili, da bomo preverili, če je tudi pri nestimuliranih celicah prišlo do inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti. Poleg tega smo želeli tudi ugotoviti, kolikšna najmanjša količina receptorja TLR4 in proteina MD-2 je potrebna, da pride do aktivacije TLR4/MD-2-signalizacijske poti.

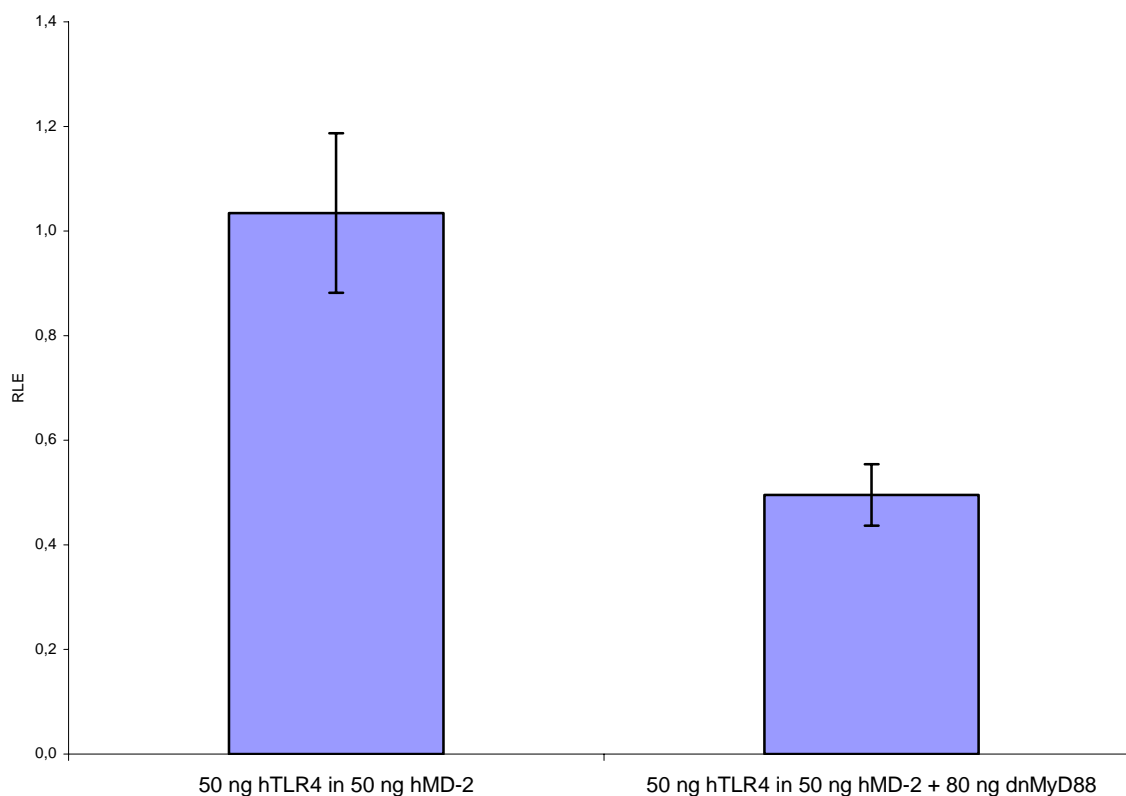
- Ugotavljanje inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti pri nestimuliranih celicah ter ugotavljanje najmanjše potrebne količine receptorja TLR4 in proteina MD-2 za aktivacijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti

Preglednica 26: Načrt transfekcije pri ugotavljanju inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti pri nestimuliranih celicah ter ugotavljanje najmanjše potrebne količine receptorja TLR4 in proteina MD-2 za aktivacijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti.

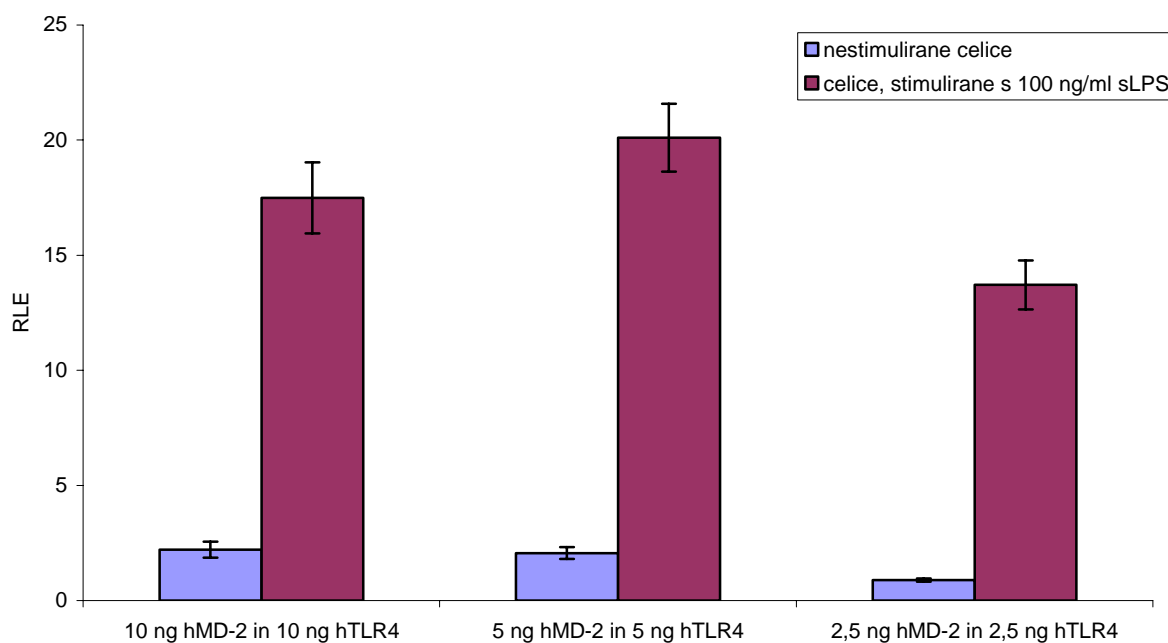
Poimenovanje transfekcijske mešanice	Število ponovitev		Količina transficirane DNK
	stimulirane	nestimulirane	
50 ng hTLR4 in 50 ng hMD-2	-	3	50 ng hTLR4, 50 ng hMD2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 80 ng pcDNA3
50 ng hTLR4 in 50 ng hMD-2 + 80 ng dnMyD88	-	3	50 ng hTLR4, 50 ng hMD2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 80 ng CMV dnMyD88
10 ng hMD-2 in 10 ng hTLR4	3	3	10 ng hTLR4, 10 ng hMD2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc
5 ng hMD-2 in 5 ng hTLR4	3	3	5 ng hTLR4, 5 ng hMD2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 10 ng pcDNA3
2,5 ng hMD-2 in 2,5 ng hTLR4	4	3	2,5 ng hTLR4, 2,5 ng hMD2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 15 ng pcDNA3

Preglednica 27: Rezultati merjenja luciferazne aktivnosti pri poskusu ugotavljanja inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti pri nestimuliranih celicah ter pri ugotavljanju najmanjše potrebne količine receptorja TLR4 in proteina MD-2 za aktivacijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti.

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Meritve (RLE)		Stimulirane celice		Nestimulirane celice	
	stimulirane	nestimulirane	povprečje	st. odklon	povprečje	st. odklon
50 ng hTLR4 in 50 ng hMD-2	-	0,9307 0,9629 1,2093	-	-	1,0343	0,1524
50 ng hTLR4 in 50 ng hMD-2 + 80 ng dnMyD88	-	0,4469 0,5608 0,4781	-	-	0,4953	0,0589
10 ng hMD-2 in 10 ng hTLR4	16,5328 19,2673 16,6702	2,6085 1,9636 2,0707	17,4901	1,5406	2,2142	0,3456
5 ng hMD-2 in 5 ng hTLR4	20,5730 21,2785 18,4466	2,2459 1,7713 2,1685	20,0994	1,4742	2,0619	0,2546
2,5 ng hMD-2 in 2,5 ng hTLR4	14,6274 12,8315 14,6416 12,7468	0,9110 0,8066 0,9403	13,7118	1,0660	0,8860	0,0703



Slika 27: Vpliv dodanega dnMyD88 na nestimulirane celice, transficirane s po 50 ng hTLR4 in hMD-2.



Slika 28: Ugotavljanje najmanjše potrebne količine receptorja hTLR4 in proteina hMD-2 za aktivacijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti.

Ugotovili smo, da ob dodatku inhibitorja lahko pride do statistično značilne (pri stopnji značilnosti 0,01) inhibicije TLR4/MD-2-signalizacijske poti tudi pri nestimuliranih celicah (slika 27). Poleg tega smo ugotovili tudi, da za transfekcijo lahko uporabimo nižje količine MD-2 in TLR4 (slika 28). V nadaljnjih eksperimentih smo zato celice HEK293 transficirali s po 3 ng hMD-2 in hTLR4.

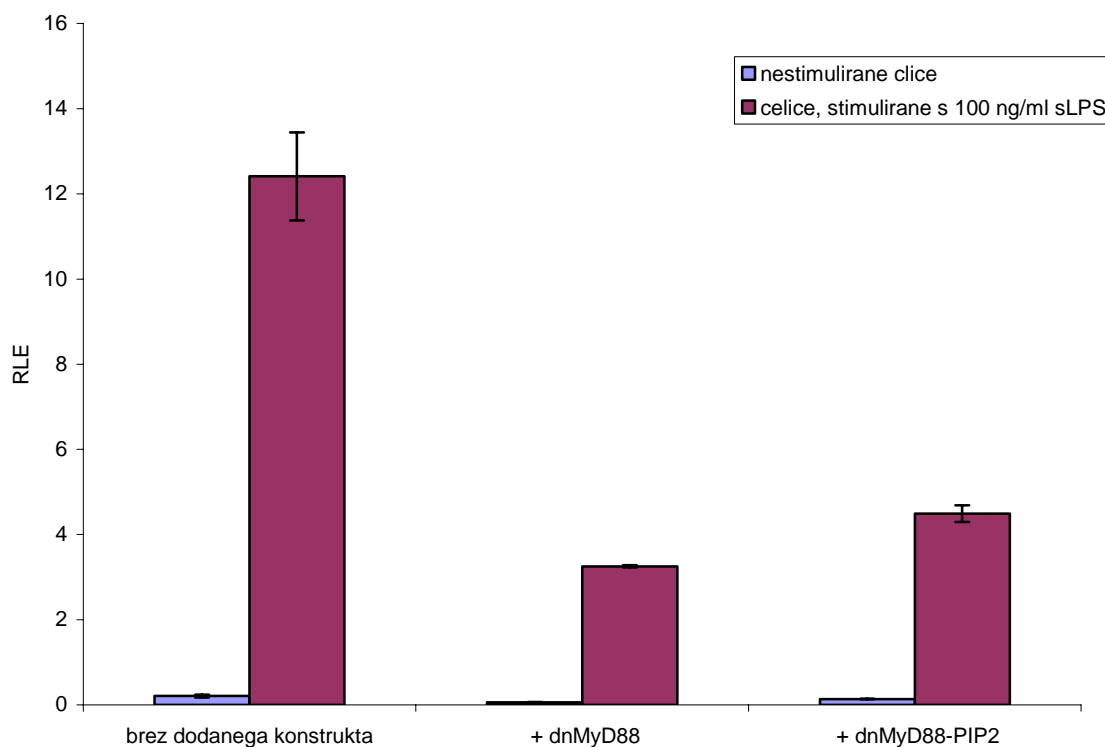
- Ponovno ugotavljanje vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot

Preglednica 28: Načrt transfekcije pri ponovnem ugotavljanju vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Število ponovitev		Količina transficirane DNK
	stimulirane	nestimulirane	
brez dodanega konstrukta	3	4	3 ng hTLR4, 3 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 40 ng pcDNA3
+ dnMyD88	3	4	3 ng hTLR4, 3 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 40 ng dnMyD88
+ dnMyD88-PIP2	3	3	3 ng hTLR4, 3 ng hMD-2, 75 ng Fluc, 15 ng Rluc, 40 ng dnMyD88-PIP2

Preglednica 29: Rezultati merjenja luciferazne aktivnosti pri poskusu ponovnega ugotavljanja vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot..

Poimenovanje transfekcijske mešanice	Meritve (RLE)				Stimulirane celice		Nestimulirane celice	
	stimulirane		nestimulirane		povprečje	st. odklon	povprečje	st. odklon
brez dodanega konstrukta	11,2123	13,0076	0,1899	0,2215	12,4089	1,0363	0,2080	0,0324
	13,0069		0,1741	0,2466				
+ dnMyD88	3,2295	3,2438	0,0556	0,0639	3,2507	0,0254	0,0606	0,0059
	3,2789		0,0671	0,0556				
+ dnMyD88-PIP2	4,2975	4,4786	0,1424	0,1331	4,4878	0,1950	0,1391	0,0052
	4,6873		0,1419					



Slika 29: Ugotavljanje vpliva dodatka PIP2-vezavnega peptida na C-terminalni konec dnMyD88 na inhibicijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti v eksperimentu s transfekcijo s po 3 ng plazmidov za hTLR4 in hMD-2.

Slika 29 prikazuje vpliv dodatka PIP2-vezavnega peptida na C-terminalni konec dnMyD88 na inhibicijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti (pri transfekciji s po 3 ng plazmidov za hTLR4 in hMD-2). S tem poskusom smo ponovno pokazali, da je inhibicija v primeru dnMyD88-PIP2 slabša kot v primeru dnMyD88 (pri stopnji značilnosti 0,01).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Človek je neprestano v stiku z mikroorganizmi, ki se nahajajo na koži in sluznicah. Bolezenska stanja pa so kljub temu redka, za kar gre zasluga tudi obrambnim mehanizmom prirojene imunosti. Za prirojeno imunost so značilni receptorji TLR, med katerimi kompleks TLR4/MD-2 spozna LPS po Gramu negativnih bakterij. Vezava LPS na receptorski kompleks TLR4/MD-2 sproži dimerizacijo receptorjev, njihove znotrajcelične domene TIR pa se povežejo z domenami TIR adapterskih proteinov. Med adapterskimi proteini ima protein MyD88 osrednjo vlogo pri večini receptorjev TLR, saj sproži signalno pot, ki vodi do izražanja vnetnih genov. V celicah obstaja tudi skrajšana oblika proteina MyD88, ki deluje kot inhibitor in lahko igra določeno vlogo pri endotoksinski toleranci. Oblike proteina MyD88 so zanimive kot potencialni inhibitorji signalizacije receptorjev TLR. V diplomskem delu smo zato izdelali več oblik proteina MyD88 s potencialnim zaviralnim delovanjem in ugotavljali njihov vpliv na signalno pot.

5.1.1 KOMENTAR REZULTATOV LUCIFERAZNE AKTIVNOSTI

Medzhitov in sod. (1998) so pokazali, da se z naraščanjem količine inhibitorja dnMyD88 večja tudi inhibicija signalne poti receptorjev TLR (zmanjšana aktivnost od NF- κ B-odvisnega promotorja).

V našem primeru smo ugotovili, da je za statistično značilno (pri stopnji značilnosti 0,01) inhibicijo razmerje med receptorskim kompleksom TLR4/MD-2 in dnMyD88 1 : 4 prenizko, medtem ko je pri razmerju 1 : 6 inhibicija statistično značilna (slika 21). Poleg tega smo ugotovili tudi, da je inhibicija opazna tudi v primeru nestimuliranih transficiranih celic (slika 27). Do statistično značilne (pri stopnji značilnosti 0,01) inhibicije pride v primeru transfekcije z večjimi količinami TLR4 in MD-2, zaradi česar pride do visokega izražanja receptorja TLR4/MD-2 na celični membrani. V tem primeru pride do

konstitutivne aktivacije signalne poti zaradi dimerizacije receptorjev TLR4/MD-2 na celični površini, za katerega je sicer potrebna stimulacija z LPS.

V nadaljevanju smo ugotavljali vpliv različnih oblik proteina MyD88 na TLR4/MD-2-signalno pot.

Kompleks med proteinom MyD88 in receptorjem TLR4/MD-2 nastane blizu membrane, zato bi lahko bila razporeditev dodatnih proteinskih domen, vezanih na domeno TIR proteina MyD88, pomembna (slika 30). Predpostavili smo, da proteinska fuzija z dnMyD88 na njegovi N-terminalni strani (na N-terminalni strani se v nativnem proteinu MyD88 nahaja domena DD) ne bo vplivala na vezavo na domeno TIR TLR4 in s tem na inhibicijo. Za testiranje te hipoteze smo izdelali konstrukt Rluc-dnMyD88 in potrdili hipotezo, saj je z uporabljenim inhibitorjem prišlo do statistično značilne (pri stopnji značilnosti 0,01) inhibicije (slika 23) kot s proteinom, ki vsebuje samo domeno TIR (dnMyD88). Za proteinsko fuzijo na C-terminalni strani dnMyD88 pa smo predpostavili, da lahko zaradi steričnih ovir pri interakciji med dnMyD88 in receptorjem TLR prepreči zaustavitev signala. Zato smo izdelali konstrukt dnMyD88-Rluc in dejansko pokazali, da pri tem konstrukt ne pride do statistično značilne (pri stopnji značilnosti 0,01) inhibicije TLR4/MD-2-signalne poti (slika 25).

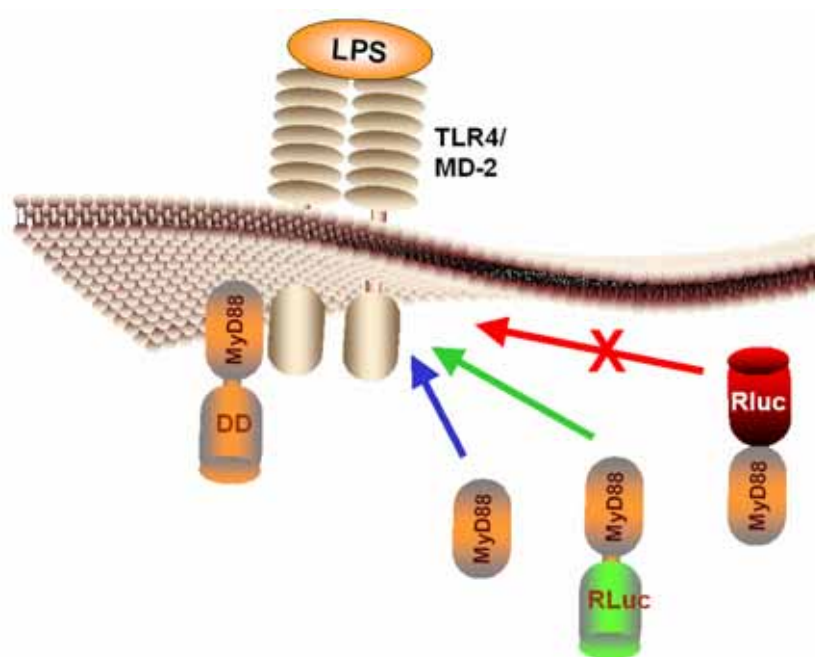
Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da proteinske fuzije z dnMyD88 vežejo membranske domene TIR (in s tem inhibirajo TLR4/MD-2-signalno pot), le če so na N-terminalnem delu proteina. Upoštevati moramo tudi, da smo za fuzijo uporabili protein, ki je velik približno toliko kot MyD88 (velikost *Renilla* luciferaze je 36 kDa), zato za manjše peptidne dodatke ta omejitev morda ne velja. Med dnMyD88 in *Renilla* luciferazo smo sicer dodali šest aminokislin dolg povezovalni del, ki naj bi omogočil večjo gibljivost proteinskih domen. Kljub temu povezovalni del ni omogočil zadostne gibljivosti, da bi prišlo do interakcije med domenama TIR proteina dnMyD88 in receptorja TLR4/MD-2 v primeru fuzije na C-terminalnem delu domene TIR.

Dalje nas je zanimalo, kako vezava dnMyD88 na membrano vpliva na inhibicijo TLR4/MD-2-signalne poti. Kagan in Medzhitov (2006) sta identificirala PIP2-vezavni

peptid na adapterju Mal/TIRAP, ki je potreben za aktivacijo TLR4 in TLR2 preko MyD88. PIP2-vezavni peptid omogoča vezavo proteina na membrano prek elektrostatskega privlaka. Kagan in Medzhitov (2006) sta pokazala tudi, da vezava MyD88 na membrano z dodanim kationskim PIP2-vezavnim peptidom na njegovi C-terminalni strani še poveča odzivnost na LPS, zato smo predpostavili, da bo oblika dnMyD88, vezana na membrano preko PIP2-vezavnega peptida, še povečala inhibicijo TLR4/MD-2-signalne poti.

Za dnMyD88, vezan na membrano s C-terminalne strani preko kationskega PIP2-vezavnega peptida (poimenovan kot konstrukt dnMyD88-PIP2), pri stopnji značilnosti 0,01 nismo ugotovili statistično značilne razlike v inhibiciji v primeru poskusa »Vpliv prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot« (slika 26), pri stopnji značilnosti 0,005 pa so se rezultati ujemali s poskusom »Ponovno ugotavljanje vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot« (slika 29), ko je bila razlika v inhibiciji statistično značilna, inhibicija v primeru dnMyD88-PIP2 je bila celo slabša kot v primeru dnMyD88.

V primeru vezave na membrano preko kationskega PIP2-vezavnega peptida na C-terminalni strani dnMyD88 smo pričakovali izboljšano inhibicijo v primerjavi s samim dnMyD88, saj sta Kagan in Medzhitov (2006) pokazala, da vezava MyD88 na membrano z dodanim kationskim PIP2-vezavnim peptidom na njegovi C-terminalni strani še poveča odzivnost na LPS. Kljub temu pa rezultati pokažejo celo poslabšanje inhibicije. Naše rezultate lahko pojasnimo s pomočjo razlike med N- in C-terminalnim mestom fuzije z dnMyD88, dokončno potrditev pa bi predstavljal eksperiment z dodatkom PIP2-vezavnega peptida na N-terminalni konec dnMyD88.



Slika 30: Shematska predstavitev razloga za delovanje N-terminalnih fuzij in oviranje inhibicije C-terminalne fuzije z domeno TIR proteina MyD88.

5.1.2 KOMENTAR REZULTATOV DOKAZOVANJA IZRAŽANJA PROTEINOV

Metoda dokazovanja proteinske sinteze je manj občutljiva kot metoda merjenja luciferazne aktivnosti. Zato smo za določanje proteinske sinteze uporabili celice HEK293T, ki omogočajo večjo ekspresijo naših konstruktov, uporabili smo tudi večjo količino celic (gojili smo jih v plošči s 6 luknjami) in celice smo lizirali po 3 dneh. Kljub temu smo proteinsko sintezo uspeli dokazati le v primeru enega konstrukta, in sicer RLuc-dnMyD88. Vsi konstrukti so bili ligirani v isti vektor, zato naj bi se enako izražali in bi morali dokazati vse. Zakaj temu ni bilo tako, ni povsem očitno. Najbolj verjetna razlaga je slaba reaktivnost dostopnih komercialnih protiteles z majhno domeno TIR proteina MyD88 oziroma slabša učinkovitost prenosa ali vezave manjših proteinov na membrano.

V nadaljnjem delu bi dokazovanju proteinske sinteze sledilo še dokazovanje interakcije med domeno TIR konstruktov in domeno TIR receptorja TLR z metodo koimunoprecipitacije.

5.1.3 POTENCIALNA UPORABA REZULTATOV

Inhibitorji TLR-signalnih poti so nam v pomoč pri razumevanju poteka fizioloških procesov ter pri razumevanju interakcij med proteini v signalizacijski kaskadi. Molekule raziskave v diplomski nalogi pa imajo tudi potencialno uporabno vrednost v medicini.

Obetajoča uporaba inhibitorjev TLR-signalnih poti se odpira z najnovejšimi raziskavami, ki kažejo na sodelovanje TLR-signalnih poti ter adapterja MyD88 v kroničnih vnetnih boleznih, kot sta revmatoidni artritis (Sacre in sod., 2007a) in kronično vnetje črevesa (Rakoff-Nahoum in sod., 2006); signaliziranje preko adapterja MyD88 naj bi imelo pomembno vlogo tudi pri razvoju tumorjev (Rakoff-Nahoum in Medzhitov, 2007; Naugler in sod., 2007) ter celo pri putiki (Chen in sod., 2006).

Dominantno negativne domene MyD88 so uporabili že na tkivu pacientov z revmatoidnim artritisom, kjer so dosegli veliko znižanje vnetnih procesov (Sacre in sod., 2007a). To je še posebej zanimivo v luči najnovejših, še neobjavljenih rezultatov (Sacre in sod., 2007b), da so pri revmatoidnem artritisu v največji meri udeleženi receptorji, ki prepoznavajo RNK (TLR7, TLR8 in TLR3). Na vprašanje, zakaj dnMyD88 inhibira tudi signalno pot, v katero je vključen TRIF, bodo lahko pomagali odgovoriti naši rezultati in nadaljnje raziskave na tej osnovi. Kot konkretno aplikacijo bi lahko uporabili dominantno negativne domene, ki bi jih vnesli v celice s peptidno transdukcijo ali v genski terapiji npr. z lokalno aplikacijo retrovirusnih vektorjev z omenjenimi konstrukti.

5.1.4 NADALJNJE RAZISKAVE

V nadaljnjih raziskavah bi se bilo najbolj zanimivo osredotočili predvsem na naslednja vprašanja:

- kako bi na inhibicijo vplivala prisotnost kationskega PIP2-vezavnega peptida na N-terminalni strani dnMyD88,
- kako vpliva na delovanje dodatek hidrofobne domene, ki vsidra dnMyD88 v membrano,

- katere signalne poti inhibirajo opisane oblike dnMyD88 – vse tiste, kjer deluje MyD88 ali tudi od MyD88 neodvisne poti,
- ali pride do inhibicije tudi v primeru aktivacije signalizacije zaradi povečanega izražanja MyD88 in Mal/TIRAP,
- ali inhibicija deluje preko tvorbe heterodimerov domen TIR z receptorjem TLR4 ali tudi preko tvorbe homodimerov z MyD88.

5.2 SKLEPI

- Proteinske fuzije z dnMyD88 na njegovi C-terminalni strani zmanjšajo inhibicijo TLR4/MD-2-signalizacijske poti, medtem ko na N-terminalni strani ohranijo inhibicijo.
- Vezava dnMyD88 na membrano s C-terminalne strani preko kationskega peptidnega segmenta ne vpliva oziroma celo poslabša inhibicijo TLR4/MD-2-signalne poti.
- Metoda merjenja luciferazne aktivnosti je primerna in zadosti občutljiva za preučevanje inhibicije TLR-signalne poti.

6 POVZETEK

Mnogocelični organizmi so skozi evolucijo razvili imunski sistem, ki se je sposoben obraniti mnogih patogenov. Prirojena imunost ima sposobnost prepoznavanja komponent mikrobnih patogenov z receptorji TLR.

LPS, pomembno komponento zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij, spozna receptorski kompleks TLR4/MD-2. Citosolna domena TIR receptorja TLR4 predstavlja začetek signalne poti, saj se nanjo prek svojih domen TIR vežejo adapterski proteini. Med njimi predstavlja adapter MyD88, zgrajen iz N-terminalne domene DD in C-terminalne domene TIR, osrednjo molekulo signaliziranja, ki vodi v sintezo vnetnih citokinov prek aktivacije transkripcijskega faktorja NF- κ B.

Signaliziranje preko receptorjev TLR in adapterja MyD88 naj bi sodelovalo pri razvoju kroničnih vnetnih boleznih, zato zaustavitev signalne poti predstavlja zanimivo področje raziskovanja in obeta razvoj novih terapevtskih sredstev.

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti, kako različne oblike proteina MyD88 vplivajo na signalno pot preko TLR4/MD-2. Izdelali smo več različic dominantno negativne oblike MyD88 (le domena TIR proteina MyD88). Vpliv na inhibicijo smo testirali z metodo merjenja luciferazne aktivnosti, pri kateri uporabljamo dve luciferazi; kresničkina luciferaza pod NF- κ B-odvisnim promotorjem kaže aktivacijo signalne poti, konstitutivno *Renilla* luciferazo pa uporabimo za normalizacijo transfekcije. Ugotovili smo, da vezava dnMyD88 na membrano s C-terminalne strani preko kationskega peptida, ki preko vezave na membranski fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat sicer izboljša signalizacijo preko MyD88, ne vpliva na inhibicijo oziroma jo celo zmanjša. Poleg tega smo izdelali še dve obliki, pri katerih smo dnMyD88 na C-terminalni ali N-terminalni strani dodali *Renilla* luciferazo. S tem smo želeli ugotoviti, ali proteinska fuzija z dnMyD88 vpliva na njegovo zmožnost inhibicije signalne poti. Povezava med MyD88 in TLR4 se vzpostavi blizu membrane, zato smo sklepali, da fuzija na N-terminalni strani (na isti strani, kot je domena DD v nativnem MyD88) ne bo imela vpliva na inhibicijo, na C-terminalni strani pa. Rezultati so potrdili naša predvidevanja in lahko vodijo v razvoj še učinkovitejših inhibitorjev vnetja.

VIRI

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

Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 4: 783–801

Anderson K.V., Jürgens G., Nüsslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: Genetic studies on the role of the *Toll* gene product. *Cell*, 42, 3: 779–789

Anderson R.L. 1987. *Practical statistics for analytical chemists*. New York, Van Nostrand Reinhold Company: 316 str.

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

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

Bonnert T.P., Garka K.E., Parnet P., Sonoda G., Testa J.R., Sims J.E. 1997. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Letters*, 402: 81–84

Burns K., Janssens S., Brissoni B., Olivos N., Beyaert R., Tschopp J. 2003. Inhibition of Interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *Journal of Experimental Medicine*, 197, 2: 263–268

Chen C.J., Shi Y., Hearn A., Fitzgerald K., Golenbock D., Reed G., Akira S., Rock K.L. 2006. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 8: 2262–2271

Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420: 885–891

Dunne A., Ejdebäck M., Ludidi P.L., O'Neill L.A.J., Gay N.J. 2003. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll like receptors and adaptors Mal and MyD88. *Journal of Biological Chemistry*, 42: 41443–41451

Fujihara M., Muroi M., Tanamoto K., Suzuki T., Azuma H., Ikeda H. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics*, 100: 171–194

Gay N.J., Gangloff M., Weber A.N.R. 2006. Toll-like receptors as molecular switches. *Nature Reviews: Immunology*, 6: 693–698

Gay N.J., Gangloff M. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry*, 76: 23.1–23.25

Gorbet M.B., Sefton M.V. 2005. Endotoxin: The uninvited guest. *Biomaterials*, 26: 6811–6817

Hardiman G., Jenkins N.A., Copeland N.G., Gilbert D.J., Garcia D.K., Naylor S.L., Kastelein R.A., Bazan J.F. 1997. Genetic structure and chromosomal mapping of MyD88. *Genomics*, 45: 332–340

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

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

Janeway C.A. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunology Today*, 13, 1: 11–16

Janssens S., Burns K., Tschopp J., Beyaert R. 2002. Regulation of Interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation by alternative splicing of MyD88. *Current Biology*, 12: 467–471

Kagan J.C., Medzhitov R. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell*, 125: 943–955

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

Lasker M.V., Nair S.K. 2006. Intracellular TLR Signaling: A structural perspective on human disease. *Journal of Immunology*, 177: 11–16

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

Li C., Zienkiewicz J., Hawiger J. 2005. Interactive sites in the MyD88 Toll/Interleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1 β signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 28: 26152–26159

Loiarro M., Sette C., Gallo G., Ciacci A., Fantò N., Mastroianni D., Carminati P., Ruggiero V. 2005. Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits Interleukin-1-dependent activation of NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*, 16: 15809–15814

McLaughlin S., Wang J., Gambhir A., Murray D. 2002. PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 31: 151–175

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

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S., Janeway C.A.Jr. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular Cell*, 2: 253–258

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- κ B activation. *Nature Immunology*, 5, 5: 503–507

Miyake K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends in Microbiology*, 12, 4: 186–192

Naugler W.E., Sakurai T., Kim S., Maeda S., Kim K., Elsharkawy A.M., Karin M. 2007. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, 317, 5834: 121–124

Nishiya T., Kajita E., Horinouchi T., Nishimoto A., Miwa S. 2007. Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88. *FEBS Letters*, 581: 3223–3229

Poltorak A., He X.L., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*, 282: 2085–2088

Rakoff-Nahoum S., Hao L., Medzhitov R. 2006. Role of Toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity*, 25, 2: 319–329

Rakoff-Nahoum S., Medzhitov R. 2007. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science*, 317, 5834: 124–127

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 Sciences of the United States of America*, 95: 588–593

Rowe D.C., McGettrick A.F., Latz E., Monks B.G., Gay N.J., Yamamoto M., Akira S., O'Neill L.A., Fitzgerald K.A., Golenbock D.T. 2006. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 16: 6299–6304

Sacre S.M., Andreacos E., Kiriakidis S., Amjadi P., Lundberg A., Giddins G., Feldmann M., Brennan F., Foxwell B.M. 2007a. The Toll-Like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *American Journal of Pathology*, 170, 2: 518–525

Sacre S.M., Lo A., Medghalchi M., Gregory B., Williams L., Brennan F., Williams R., Foxwell B. 2007b. Do TLRs contribute to driving inflammation in RA? V: Pattern-recognition receptors in human disease, August 8–10, 2007. Cambridge, UK. Biochemical Society, UK.

<http://www.biochemistry.org/meetings/abstracts/SA061/SA061S018.pdf> (avgust 2007): 1 str. S018

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

Sankar S., Chan H., Romanow W.J., Li J., Bates R.J. 2006. IKK- α signals through IRF3 and NF- κ B to mediate the production of inflammatory cytokines. *Cellular Signalling*, 18, 7: 982–993

Serbina N.V., Kuziel W., Flavell R., Akira S., Rollins B., Pamer E.G. 2003. Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity*, 19, 6: 891–901

Toshchakov V.U., Basu S., Fenton M.J., Vogel S.N. 2005. Differential involvement of BB loops of Toll-IL-1 Resistance (TIR) domain-containing adapter proteins in TLR4- versus TLR2-mediated signal transduction. *Journal of Immunology*, 175: 494–500

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

Wyckoff T.J., Raetz C.R., Jackman J.E. 1998. Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin. *Trends in Microbiology*, 6: 154–159

Xu Y., Tao X., Shen B., Horng T., Medzhitov R., Manley J.L., Tong L. 2000. Structural basis for signaling transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature*, 408: 111–115

Yamamoto M., Sato S., Mori K., Hoshino K., Takeuchi O., Takeda K., Akira S. 2002. Cutting Edge: A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- β Promoter in the Toll-like receptor signaling. *Journal of Immunology*, 169, 12: 6668–6672

Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Uematsu S., Kaisho T., Hoshino K., Takeuchi O., Takeda K., Akira S. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology*, 4: 1144–1150

ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorju prof. dr. Romanu Jerali za izkazano zaupanje ter dano priložnost.

Iskrena hvala Gabrieli Panter za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela, za vse nasvete, ter predvsem za potrpežljivost.

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

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem prof. dr. Tomu Turku.

Najlepša hvala vsem iz Laboratorija za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu za pomoč pri reševanju laboratorijskih težav.

Nenazadnje, velika zahvala gre mojim najdražjim, ki so me ves čas izobraževanja podpirali in mi omogočili doseganje zastavljenih ciljev.

PRILOGE

Priloga A: Okrajšave aminokislinskega koda za aminokislino, pomembne v diplomskem delu.

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

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

Priloga B: Statistična obdelava rezultatov eksperimentov merjenja luciferazne aktivnosti (preizkus domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc z uporabo Studentove porazdelitve pri 99-odstotnem intervalu zaupanja).

Domneva	\bar{X}		s		t- vrednost	Df	Kritična vrednost
	\bar{X}_1	\bar{X}_2	S ₁	S ₂			
inhibicija TLR signalne poti pri razmerju 1 : 4 med receptorjem TLR4 in dnMyD88	9,6411	8,7443	0,2835	0,9427	1,5779	2,7176	4,541
inhibicija TLR signalne poti pri razmerju 1 : 6 med receptorjem TLR4 in dnMyD88	9,6411	5,7829	0,2835	0,4759	12,0636	4,5214	3,365
inhibicija TLR signalne poti pri razmerju 1 : 8 med receptorjem TLR4 in dnMyD88	9,6411	2,3465	0,2835	0,2653	32,5405	5,9650	3,143
inhibicija TLR signalne poti z dodanim dnMyD88 pri nestimuliranih celicah	1,0343	0,4953	0,1524	0,0589	5,7139	3,1688	4,541
inhibicija z dnMyD88 (*1)	22,6893	5,9032	0,9533	0,8156	26,7595	7,7661	2,896
inhibicija z dnMyD88 (*2)	12,4089	3,2507	1,0363	0,0254	15,3022	2,0048	6,965
razlika v inhibiciji med in dnMyD88- PIP2 in dnMyD88 (*1)	7,5387	5,9032	0,9596	0,8156	2,8922	9,4944	2,821 (3,250 za $\alpha=0,005$)

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga B: Statistična obdelava rezultatov eksperimentov merjenja luciferazne aktivnosti (preizkus domneve o razliki povprečij v primeru različnih varianc z uporabo Studentove porazdelitve pri 99-odstotnem intervalu zaupanja).

Domneva	\bar{X}		S		t-vrednost	Df	Kritična vrednost
	\bar{X}_1	\bar{X}_2	S ₁	S ₂			
razlika v inhibiciji med in dnMyD88-PIP2 in dnMyD88 (*2)	3,2507	4,4878	0,0254	0,1950	10,8962	2,1356	6,965
inhibicija z Rluc-dnMyD88 (vrednosti Fluc)	28567,3	13935,3	1901,9	1172,2	11,7555	4,2011	3,747
inhibicija z dnMyD88-Rluc (vrednosti Fluc)	463596	457802	50372,7	59648,2	0,1484	7,7273	2,896

*Opombe: (*1): Rezultati poskusa: Vpliv prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.

(*2): Rezultati poskusa: Ponovno ugotavljanje vpliva prisotnosti PIP2-vezavnega peptida na C-terminalnem koncu proteina dnMyD88 na TLR4/MD-2-signalizacijsko pot.

\bar{X} – povprečje, s – varianca, Df – stopinje prostosti. t-vrednost in stopinje prostosti izračunamo po enačbah 3 in 4 (Anderson, 1987).

Enačba 3:
$$df = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} - 2$$

Enačba 4:
$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

V primeru, ko je t-vrednost večja od kritične vrednosti (odčitana iz statističnih tabel), zavrnamo hipotezo o enakosti povprečnih vrednosti in potrdimo hipotezo, da je $\overline{X}_1 > \overline{X}_2$ pri izbranem intervalu zaupanja.