

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Gregor ZUPIN

**VPLIV RAZNOLIKOSTI BAKTERIJSKIH  
ENDOTOKSINOV NA IMUNSKI ODZIV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Gregor ZUPIN

**VPLIV RAZNOLIKOSTI BAKTERIJSKIH ENDOTOKSINOV NA  
IMUNSKI ODZIV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF BACTERIAL ENDOTOXIN DIVERSITY ON  
IMMUNE RESPONSE**

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 bila za mentorico imenovana prof. dr. Mojca Narat, za somentorja prof. dr. Roman Jerala, za recenzenta prof. dr. Alojz Ihan, dr. med. ter za predsednika komisije prof. dr. Franc Viktor Nekrep.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Somentor: prof. dr. Roman Jerala

Recenzent: prof. dr. Alojz Ihan, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Mojca Narat

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Roman Jerala

Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za Biotehnologijo

Član: prof. dr. Alojz Ihan, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo  
in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Gregor Zupin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn  
DK UDK 616-097 : 547.915 (043)=863  
KG lipopolisaharidi / LPS / naravna imunost / sepsa / TLR4 / MD-2 / celična kultura HEK / celična kultura MM6 / citokini / kemokini / *Brucella* / *E. coli* / *Yersinia*  
AV ZUPIN, Gregor  
SA NARAT, Mojca (mentorica)/JERALA, Roman (somentor)/IHAN, Alojz (recenzent)  
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2007  
IN VPLIV RAZNOLIKOSTI BAKTERIJSKIH ENDOTOKSINOV NA IMUNSKI ODZIV  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP X, 80 str., 15 preg., 50 sl., 71 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Lipopolisaharid (LPS) predstavlja poglavitno komponento zunanje membrane gramnegativnih bakterij. Struktura LPS se razlikuje od bakterije do bakterije. Mnogi LPS so odlični aktivatorji naravnega imunskega odziva in zato LPS pogosto imenujemo tudi endotoksin. V gostiteljskem organizmu igra pri prepoznavi LPS najpomembnejšo vlogo receptorski kompleks proteinov, ki ga sestavljata receptor podoben toll (TLR4) in mieloidni diferenciacijski faktor 2 (MD-2). Vezavi LPS s tem kompleksom lahko sledi aktivacija znotrajceličnih signalnih poti, ki vodijo v sintezo različnih citokinov. Le-ti pa uravnavajo nadaljni potek imunskega odziva, ki se lahko v skrajnem primeru konča s septičnim šokom in smrtjo. V diplomskem delu smo ugotavljali vpliv strukturno različnih LPS izoliranih iz bakterij *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis* in *Y. enterocolitica* na imunski odziv in proizvodnjo citokinov v celični kulturi iz humanih zarodnih ledvičnih celic (HEK293) in celični kulturi monocitov Mono Mac 6 (MM6) v pogojih *in vitro*. Strukturno različni LPS so različno aktivirali sintezo citokinov zaradi razlik v interakciji med MD-2 in različnimi kemotipi LPS. Ugotovili smo, da LPS brucel in okrobaktruma ne aktivirajo signalizacije preko receptorjev TLR/MD-2, ker se ne vežejo na protein MD-2. Pokazali smo tudi, da so LPS jersinij in salmonele biološko najbolj aktivni LPS izmed testiranih.

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn  
 DC UDK 616-097: 547.915 (043)=863  
 CX lipopolysaccharides / LPS / innate immunity / sepsis / TLR4 / MD-2 / cell culture HEK / cell culture MM6 / cytokine / chemokine / *Brucella* / *E. coli* / *Yersinia*  
 AU ZUPIN, Gregor  
 AA NARAT, Mojca (supervisor)/JERALA, Roman (co - advisor)/ALOJZ, Ihan (reviewer)  
 PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
 PY 2007  
 TI INFLUENCE OF BACTERIAL ENDOTOXIN DIVERSITY ON IMMUNE RESPONSE  
 DT Graduation thesis (university studies)  
 NO X, 80 p., 15 tab., 50 fig., 71 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB Lipopolysaccharide (LPS) represents the major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Structure of LPS differs from one bacteria to another. Many LPS are excellent activators of immune system which is the reason that LPS is sometimes also called endotoxin. The most important role in recognition of LPS in host organism plays a protein receptor complex, which is composed of Toll-like receptor 4 (TLR4) and myeloid differentiation factor 2 (MD-2). Binding of LPS to this complex activates the intracellular signal pathways that triggers the synthesis of different cytokines. These cytokines are responsible for mediation of immune response which can lead to septic shock and death of a patient. Our goal was to test influence of structurally different LPS isolated from bacteria *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis* and *Y. enterocolitica* on immune system and synthesis of cytokines in human kidney cell culture 293 (HEK293) and Mono Mac 6 cell culture in *in vitro* conditions. Structurally different LPS activated synthesis of cytokines in different manner, which is a consequence of differences in interactions between the MD-2 and different chemotypes of LPS. Our experiments have shown that LPS isolated from *Brucella* and *Ochrobactrum* do not activate the synthesis of cytokines through TLR4/MD-2 signaling pathway, because they do not bind to protein MD-2. We have also shown that among the tested LPS biologically most active LPS are from *Yersinia* and *Salmonella*.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	II
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	III
KAZALO VSEBINE.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
1.3 NAMEN DELA.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>2</b>
2.1 NARAVNA IMUNOST.....	2
2.2 SEPSA.....	3
2.3 POVZROČITELJI.....	4
2.4 CITOKINI.....	5
2.4.1 IL-1 $\beta$ (interlevkin-1 $\beta$ ).....	5
2.4.2 IL-6 (interlevkin-6).....	5
2.4.3 IL-12p70 (interlevkin-12p70).....	6
2.4.4 TNF $\alpha$ (ang. tumor necrosis factor- $\alpha$ ; sl. dejavnik tumorske nekroze).....	6
2.4.5 IL-8 (interlevkin-8).....	7
2.4.6 IP-10 (ang. interferon- $\gamma$ -induced protein-10; sl. protein 10 induciran z interferonom $\gamma$ ).....	7
2.4.7 RANTES (ang. regulated upon activation, normal T-cells expressed, and secreted; sl. protein reguliran z aktivacijo, ga izražajo normalne celice T in se izloča).....	7
2.4.8 MCP-1 (ang. monocyte chemoattractant protein-1; sl. protein-1 kemotaktičen za monocite).....	7

2.5	CELIČNA STENA GRAMNEGATIVNIH BAKTERIJ .....	8
2.6	LIPOPOLISAHARIDI (LPS) .....	8
<b>2.6.1</b>	<b>Struktura LPS .....</b>	<b>8</b>
2.6.1.1	Lipid A .....	9
2.6.1.2	Oligosaharidna sredica .....	10
2.6.1.3	O-specifična veriga .....	10
<b>2.6.2</b>	<b>Biološka aktivnost endotoksinov .....</b>	<b>10</b>
2.7	AGREGATI .....	12
2.8	PREDSTAVITEV LPS, KI SMO JIH UPORABILI PRI DIPLOMSKEM DELU IN OPIS BAKTERIJ, IZ KATERIH SO BILI IZOLIRANI .....	13
<b>2.8.1</b>	<b>LPS Ba-187 iz <i>Brucella abortus</i> in Bm-046 iz <i>Brucella melitensis</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.8.2</b>	<b>LPS Oa-001 iz <i>Ochrobactrum anthropi</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>2.8.3</b>	<b>LPS Ec-003, Ec-004 in Ec006 iz <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>2.8.4</b>	<b>LPS 506 .....</b>	<b>14</b>
<b>2.8.5</b>	<b>LPS Sa-LPS iz <i>S. enteritidis</i> podvrsta <i>abortus</i> serotip Equi .....</b>	<b>14</b>
<b>2.8.6</b>	<b>LPS Ye3-002, Ye3-003 in Yp-001 iz jersinij .....</b>	<b>15</b>
2.9	PREPOZNAVANJE LPS .....	17
<b>2.10.1</b>	<b>LBP .....</b>	<b>18</b>
<b>2.10.2</b>	<b>CD14 .....</b>	<b>18</b>
<b>2.10.3</b>	<b>TLR4 in MD-2 .....</b>	<b>19</b>
2.10	SIGNALNE POTI .....	20
<b>2.10.1</b>	<b>Od MyD88-odvisna signalna pot .....</b>	<b>20</b>
<b>2.10.2</b>	<b>Od MyD88-neodvisna signalna pot .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>METODE IN MATERIALI .....</b>	<b>23</b>
3.1	MATERIALI .....	23
<b>3.1.1</b>	<b>Kemikalije .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Gojišča .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Lipopolisaharidi .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Plazmidi .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Celične kulture .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Laboratorijska oprema .....</b>	<b>29</b>
3.2	METODE .....	30
<b>3.2.1</b>	<b>Sterilizacija opreme in gojišč .....</b>	<b>30</b>

<b>3.2.2</b>	<b>Gojenje in vzdrževanje celičnih kultur .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Pridobivanje plazmidne DNA .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Določanje aktivnosti MD-2/TLR4 kompleksa .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Ugotavljanje vezave spojin na MD-2 .....</b>	<b>34</b>
3.2.5.1	Priprava proteina MD-2 .....	34
3.2.5.2	Določanje koncentracije MD-2 .....	34
3.2.5.3	Priprava bis-ANS .....	35
3.2.5.4	Priprava Pluronic F127.....	35
3.2.5.5	Ugotavljanje vezave bis-ANS na MD-2 ob prisotnosti P175 .....	35
3.2.5.6	Ugotavljanje vezave bis-ANS na MD-2 ob prisotnosti LPS Ba-187 .....	35
<b>3.2.6</b>	<b>Merjenje koncentracij citokinov (IP-10, TNF<math>\alpha</math>, IL-8) z ELISA testom .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Merjenje koncentracije citokinov s pretočnim citometrom .....</b>	<b>36</b>
3.2.7.1	Opis pretočne citometrije .....	36
3.2.7.2	Priprava in stimulacija celic MM6 .....	37
<b>3.2.8</b>	<b>Detekcija bakterij v celični kulturi .....</b>	<b>38</b>
3.2.8.1	Detekcija mikoplazem v celični kulturi .....	39
3.2.8.2	Detekcija ostalih bakterij v celični kulturi .....	40
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>41</b>
4.1	UGOTAVLJANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI SISTEMA ZA DETEKCIJO AKTIVACIJE TLR4 SIGNALNE POTI .....	41
4.2	UGOTAVLJANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE LPS ZA AKTIVACIJO CELIC .....	41
4.3	UGOTAVLJANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE PLAZMIDA pDNM $\gamma$ D88 ZA TRANSFEKCIJO CELIC .....	43
4.4	AKTIVACIJA OD MyD88-ODVISNE IN -NEODVISNE POTI .....	43
4.5	UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJ CITOKINOV TNF, IP10 IN IL-8 V HEK293 CELIČNI KULTURI S TESTOM ELISA .....	46
4.6	UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJ CITOKINOV OZIROMA KEMOKINOV S PRETOČNIM CITOMETROM .....	48
<b>4.6.1</b>	<b>Vpliv različnih LPS na sintezo kemokinov v celični liniji Mono Mac 6 .....</b>	<b>48</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Vpliv različnih LPS na sintezo citokinov v celični liniji MonoMac 6 .....</b>	<b>54</b>
4.7	UGOTAVLJANJE MOREBITNEGA INHIBITORNEGA UČINKA BA-187 NA AKTIVACIJO CELIC .....	61



4.8	UGOTAVLJANJE OKUŽBE CELIČNE LINIJE Z BAKTERIJAMI .....	67
4.8.1	Ugotavljanje okužbe z mikoplazmami .....	67
4.8.2	Ugotavljanje okužbe z drugimi bakterijami.....	67
5	RAZPRAVA IN SKLEPI .....	68
5.1	RAZPRAVA .....	68
5.2	SKLEPI .....	73
6	POVZETEK.....	74
7	VIRI.....	75
<b>ZAHVALA</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: PAMP in PRR (Aderem in Ulevitch, 2000: 783).....	3
Preglednica 2: Izrazi povezani s sepsa (Riedemann in sod., 2003; Ulloa in Tracey, 2005).	4
Preglednica 3: Seznam kemikalij uporabljenih pri diplomskem delu.....	23
Preglednica 4: Seznam gojišč.....	24
Preglednica 5: Opis LPS. ....	25
Preglednica 6: Sestava LPS iz sevov <i>E. coli</i> , ki sta rasla pri 26 °C oziroma 37 °C.....	26
Preglednica 7: Podroben opis LPS sevov jersinij.....	26
Preglednica 8: Pregled plazmidov uporabljenih pri diplomskem delu. ....	27
Preglednica 9: Seznam laboratorijske opreme uporabljene pri diplomskem delu. ....	29
Preglednica 10: Potek izolacije plazmida.....	32
Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za PCR. ....	39
Preglednica 12: Program PCR reakcije.....	39
Preglednica 13: Opis krivulj iz slike 47. ....	65
Preglednica 14: Opis krivulj iz slike 48. ....	66
Preglednica 15: Aciliranost LPS. ....	69

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Primer celične stene pri gramnegativnih bakterijah (Wyckoff in sod., 1998). .....	8
Slika 2: Struktura molekule LPS (Chaby, 1999). .....	9
Slika 3: Kemijska struktura lipida A in prekursorja lipida A (Holst in sod., 1996). .....	11
Slika 4: Prostorska predstavitev oblik različnih lipidov A. ....	12
Slika 5: Struktura lipidov A bakterije <i>Brucella</i> in <i>Ochrobactrum</i> . ....	13
Slika 6: Salmonelin heptaaciliran lipid A (Tanamoto in Azumi, 2000). ....	15
Slika 7: Lipid A in analogne strukture z navedenimi masami v oklepajih, ki so prisotne v enterobakterijah oziroma pri <i>E. coli</i> in <i>Yersinia</i> sp. ....	16
Slika 8: LPS se po vezavi na LBP lahko nevtralizira s HDL ali veže na receptorski kompleks MD-2/TLR4 ob pomoči CD14 (Miyake, 2004). ....	17
Slika 9: Kwartarna struktura proteina CD-14. ....	18
Slika 10: Shematski prikaz strukture MD-2. ....	19
Slika 11: Poenostavljen model signalizacije po od MyD88-odvisni poti in –neodvisni poti. ....	21
Slika 12: Postopek metode multipleks. ....	37
Slika 13: Princip metode multipleks. ....	38
Slika 14: Ugotavljanje aktivnosti sistema za detekcijo aktivacije TLR4 signalne poti. ....	41
Slika 15: Odvisnost relativne luciferazne aktivnosti od koncentracije Sa-LPS. ....	42
Slika 16: Odvisnost relativne luciferazne aktivnosti od koncentracije pDNMyD88 in stimulacije celic z LPS. ....	43
Slika 17: Primerjava relativnih luciferaznih aktivnosti pri od MyD88-odvisni (NF- $\kappa$ B reporter) in -neodvisni poti (ISRE reporter). ....	44
Slika 18: Odvisnost RLA od različnih LPS v od MyD88-odvisni poti. ....	45
Slika 19: Odvisnost RLA od različnih LPS v od MyD88-neodvisni poti. ....	45
Slika 20: Odvisnost RLA od različnih LPS v od MyD88-neodvisni poti brez transfekcije s plazmidom pDNMyD88. ....	46
Slika 21: Vpliv različnih LPS na indukcijo IL-8 v celični kulturi HEK293 po 4-urni stimulaciji z LPS. ....	47
Slika 22: Vpliv različnih LPS na indukcijo IL-8 v celični kulturi HEK293 po 8-urni stimulaciji z LPS. ....	47

Slika 23: Vpliv različnih LPS na indukcijo IL-8 v celični kulturi HEK293 po 12-urni stimulaciji z LPS. ....	48
Slika 24: Vpliv različnih LPS na sintezo kemokinov v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	49
Slika 25: Vpliv različnih LPS na sintezo IP-10 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	50
Slika 26: Vpliv različnih LPS na sintezo MCP-1 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	50
Slika 27: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-8 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	51
Slika 28: Vpliv različnih LPS na sintezo kemokinov v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	51
Slika 29: Vpliv različnih LPS na sintezo IP-10 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	52
Slika 30: Vpliv različnih LPS na sintezo kemokinov v celicah MM6 gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. ....	53
Slika 31: Vpliv različnih LPS na sintezo MCP-1 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. ....	53
Slika 32: Vpliv različnih LPS na sintezo RANTES v celicah MM6 gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. ....	54
Slika 33: Vpliv različnih LPS na sintezo citokinov v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	55
Slika 34: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-6 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	56
Slika 35: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-1 $\beta$ v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	56
Slika 36: Vpliv različnih LPS na sintezo TNF $\alpha$ v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	57
Slika 37: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-12p70 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. ....	57
Slika 38: Vpliv različnih LPS na sintezo citokinov v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. ....	58

Slika 39: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-1 $\beta$ v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom.....	59
Slika 40: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-6 v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom.....	59
Slika 41: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-8 v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom.....	60
Slika 42: Vpliv različnih LPS na sintezo MCP-1 v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom.....	60
Slika 43: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-12p70 v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom.....	61
Slika 44: Odvisnost relativne luciferazne aktivnosti od aktivacije celične linije HEK293 #BF1 TLR4 (s ali brez transfekcije s plazmidom za CD14) z LPS (Ba-187 in Sa-LPS) v različnih molarnih koncentracijah.....	62
Slika 45: Osrednji del molekule bis-ANS je sestavljen iz naftalenskih obročev, ki dajejo molekuli hidrofoben značaj.....	63
Slika 46: Absorpcijski spekter bis-ANS in MD-2.....	64
Slika 47: Emisijski spekter bis-ANS in MD-2.....	65
Slika 48: Emisijski spekter bis-ANS pri valovni dolžini vzbujanja 385 nm.....	66
Slika 49: Ugotavljanje okužbe z mikoplazmami.....	67
Slika 50: Struktura lipidov A bakterije <i>Brucella</i> in <i>Ochrobactrum</i> , ki se od drugih lipidov A razlikujeta predvsem po eni dolgi verigi z 28-imi C atomi.....	71

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AK	aminokislina
Amp	ampicilin
A <sub>260</sub> , A <sub>280</sub>	absorbanca pri navedeni valovni dolžini
ang.	angleško
AP-1	aktivatorski protein 1 (ang. activator protein-1)
bp	bazni par
bis-ANS	bis 1,8-anilinaftalensulfonat
<i>B. abortus</i>	<i>Brucella abortus</i>
<i>B. melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
CpG	bakterijski nemetilirani 2'-deoksiribo dinukleotid (citidin-fosfat-guanozin)
CRP	C-reaktivni protein
Da	dalton, enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega <sup>12</sup> C
DD	smrtna domena (ang. death domain)
ddH <sub>2</sub> O	dvakrat deionizirana voda
DMEM	gojišče za celično kulturo (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNMyD88	protein MyD88 s TIR domeno na C-koncu in brez DD domene
dNTP	2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBS	fetalni goveji serum (ang. fetal bovine serum), dodatek gojišču za celične kulture
GPI	glikozilfosfatidilinozitol
HDL	lipoprotein visoke gostote (ang. high density protein)
HEK	trajna celična kultura iz humanih zarodnih ledvičnih celic (ang. human kidney culture 293)
HEPES	N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-etansulfonska kislina
hMD-2,	črka h (ang. human) pred drugimi oznakami, pove, da je protein ali gen
<i>luc...</i>	homologen človeškemu proteinu oz. genu

HSP	proteini toplotnega šoka (ang. heat-shock proteins)
IFN	interferon
IKK	inhibitorna kapa B kinaza (ang. IκB kinase)
IL-1 (-6, -12...)	interlevkin-1 (-6, -12...)
iNOS	inducirana NO-sintaza (ang. inducible nitric oxide synthase)
IP-10	z interferonom inducirani protein 10 (ang. IFN-inducible protein 10)
IRAK	kinaza, povezana z receptorjem IL-1 (ang. IL-1 receptor-associated kinase)
IRF3	regulatorni faktor 3 za interferon (ang. IFN regulatory factor 3)
JAK/Tyk2	tirozin kinaza JAK (Janus kinaza)/nereceptorska tirozin kinaza 2
JNK	N-terminalna kinaza c-Jun
KDO	2-keto-3-deoksioktanska kislina
LB	gojišče po Luria Bertaniju
LBA	gojišče LB, kateremu smo dodali ampicilin
LBP	LPS-vezavni protein (ang. LPS-binding protein)
LPS	lipopolisaharid
LRR	ponovitve bogate z levcini (ang. leucine rich repeats)
MAPK	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (ang. mitogen-activated protein kinase)
mCD14	na membrano vezan CD14
MCP5	proteinski kemoatraktant 5 za monocite (ang. monocyte chemoattractant protein 5)
MD-2	mieloidni diferenciacijski faktor 2 (ang. myeloid differentiation factor 2)
Mw	molecular weight
MyD88	diferenciacijski faktor 88 mieloidov (ang. myeloid differentiation factor 88)
NF-κB	jedrni faktor kapa B
NO	dušikov oksid
<i>O. anthropi</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
OD <sub>600</sub>	optična gostota celic pri 600 nm (ang. optical density)
PAI-1	inhibitor 1 plazminogenskega aktivatorja (ang. plasminogen activator inhibitor-1)

PAMPs	molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (ang. pathogen-associated molecular patterns)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov $H_3O^+$
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat (ang. phorbol 12-myristate 13-acetate)
PRR	receptorji, ki prepoznajo molekulske motive patogenih mikroorganizmov (ang. pattern recognition receptors)
RLA	relativna luciferazna aktivnost
rpm	obrati rotorja v minuti pri centrifugiranju
sCD14	topna (serumska) oblika CD14
SIRS	sindrom sistemskega vnetnega odgovora (ang. systemic inflammation response syndrome)
Sa-LPS	LPS izoliran iz bakterije <i>Salmonella</i>
sLPS	s polisaharidi bogat LPS
STAT1	prenašalec signala in aktivator transkripcije (ang. signal transducer and activator of transcription)
TAB	protein, ki veže TAK1
TAK1	s TGF- $\beta$ aktivirana kinaza 1
TIR	Toll/interlevkin (IL)-1 receptorska domena (ang. Toll/interleukin (IL)-1 receptor domain)
TLR	receptor podoben Toll (ang. Toll-like receptor)
TNF $\alpha$	dejavnik tumorske nekroze $\alpha$ (ang. tumor necrosis factor $\alpha$ )
TRAF6	s TNF-receptorjem aktivirani faktor 6 (ang. TNF receptor-activated factor 6)
TRIF/TICA M-1	adapter, ki vsebuje domeno TIR in inducira IFN- $\beta$ (ang. TIR-domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) ali adapterska molekula, ki vsebuje domeno TIR (ang. TIR domain-containing adaptor molecule)
Tris	2-amino-2(hidroksimetil)-1,3-propandiol
v/v	razmerje volumen/volumen
wt	wild-type
w/v	razmerje masa/volumen
<i>Y. pestis</i>	<i>Yersinia pestis</i>



## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Nastanek večceličnih organizmov je zahteval razvoj obrambnega mehanizma pred paraziti in le-ta je postal neobhodno potreben za preživetje večceličarjev. Imunski sistem višjih organizmov se je skozi evolucijo izpopolnjeval in vzporedno z njim so se razvijali tudi infekcijski mehanizmi patogenov. Med njimi in obrambnimi sistemi gostitelja se je vzpostavilo ravnotežje, ki se lahko prevesi bodisi v bolezensko stanje bodisi v odstranitev patogena iz/z gostitelja.

Ob vstopu mikroorganizma v gostiteljski organizem se imunski sistem sreča s strukturnimi komponentami mikroorganizma, ki aktivirajo mehanizme naravne imunosti. Pri po gramnegativnih bakterijah je ena izmed takšnih komponent lipopolisaharid (LPS). Proces prepoznavanja LPS je prvi korak v odstranjevanju patogenov iz organizma, vendar lahko v nekaterih primerih prisotnost LPS privede v bolezensko stanje imenovano sepsa. Sepsa se razvije, ko se začetni gostiteljski odziv na bakterijsko okužbo prekomerno ojača.

Pri prepoznavi endotoksina v gostiteljskem organizmu sodelujejo proteini LBP, CD14, TLR4 in MD-2, ki sprožijo signal za proizvodnjo citokinov v celici. Jakost celičnega odziva se razlikuje od bakterije do bakterije in je odvisna od strukture LPS. Poznavanje mehanizmov interakcij med LPS in receptorji ter signalnih poti je torej eno ključnih za razumevanje in zdravljenje ter preprečevanje sepse.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavljamo, da je LPS znotrajceličnih bakterij strukturno tako prilagojen, da izzove imunski odziv v manjši meri kot izvencelične bakterije oz. da bodo strukturno različni LPS preko MD-2 proteina sprožili sintezo različnih citokinov.

### 1.3 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti vpliv strukturno različnih LPS na imunski odziv in proizvodnjo citokinov, kar je posledica razlik v interakciji med MD-2 in različnimi kemotipi LPS.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 NARAVNA IMUNOST

Vretenčarji so skozi evolucijo poleg mehanizmov naravne imunosti razvili tudi mehanizme specifične imunosti. Naravna ali prirojena imunost obsega mehanske (koža, sluznica), kemične (izločki žlez), genetske dejavnike, fagocitozo z makrofagi in nevtrofilci ter različne efektorske molekule, kot so citokini in glikoproteini komplementnega sistema. Specifična ali pridobljena imunost vsebuje poleg mehanizmov naravne imunosti tudi imunski spomin in specifičnost prepoznavanja tujih antigenov (Vozelj, 2000).

Velika razlika med naravno in pridobljeno imunostjo je tudi v receptorjih, ki jih sistema uporabljata za prepoznavanje patogenov. Receptorji naravne imunosti so enako kodirani v zarodnih in somatskih celicah in so izraženi na različnih celicah predvsem na efektorskih celicah, kot so makrofagi in nevtrofilci ter epitelijskih celicah, ki so v neposrednem stiku z okoljem. Receptorji pridobljenega imunskega sistema pa nastanejo po preureditvi somatskih genov in po številnih procesih, ki vodijo v nastanek milijonov različnih receptorjev z naključnimi specifičnostmi in so izraženi na celicah B in T (Medzhitov in Janeway, 2000).

Strukturno in funkcijsko različni receptorji naravne imunosti lahko sprožijo vrsto obrambnih mehanizmov, kot je aktivacija komplementa, fagocitoza in ekspresija genov povezanih z vnetjem. Ti receptorji prepoznajo ohranjene strukture mikroorganizma, ki so relativno nespremenljive znotraj določene skupine mikrobov in jih imenujemo »molekularni vzorci povezani s patogenom« ali s kratico PAMP (ang. pathogen-associated molecular pattern) (preglednica 1). Omenjene receptorje, ki prepoznajo PAMP, imenujemo »receptorji, ki prepoznavajo vzorce« PRR (ang. pattern-recognition receptors). PAMP najdemo samo pri mikrobih in ne pri višjih evkariontih, tako da gostitelj lahko razlikuje lastno od tujega. Poleg tega so te molekule esencialne za preživetje ali patogenost mikroorganizma in zato niso podvržene hitrim mutacijam. Te strukture so značilne za določeno skupino mikrobov (Medzhitov in Janeway, 2000; Aderem in Ulevitch, 2000).

Receptorje, ki prepoznajo vzorce, lahko razvrstimo na podlagi različnih kriterijev. Strukturne značilnosti so pogosto uporabljen kriterij, ki razvršča proteine v družine:

- družina receptorjev, ki imajo domeno bogato z levcinskimi ponovitvami (družina proteinov Toll in NOD),
- družina receptorjev z lektinsko domeno odvisno od kalcija,
- družina receptorjev z odstranjevalno receptorsko domeno,
- družina proteinov podobnim RIG-I (Medzhitov in Janeway, 2000).

Preglednica 1: PAMP in PRR (Aderem in Ulevitch, 2000: 783).

<b>PAMP</b>	<b>Patogen</b>	<b>Biološko aktivni del</b>	<b>PRR</b>	<b>Biološki učinek</b>
LPS	večina gram-negativnih bakterij	lipid A	LBP, CD14, TLR4, MD-2	vnetni odgovor
lipoproteini	evbakterije	tripalmitinski cys na aminskem koncu	TLR2	vnetni odgovor
peptidoglikan	večina bakterij	muropeptid	CD14, TLR2, NOD	vnetni odgovor
lipotejhojska kislina	večina grampozitivnih bakterij	nepoznan	TLR2	vnetni odgovor
CpG	večina mikrobnih patogenov	oligonukleotidi, ki vsebujejo nemetiliran CpG	TLR9	vnetni odgovor
lipoarabino-manan	mikobakterije	nepoznan	TLR2, CD1	vnetni odgovor
N-formil-Met	prokarionti	N-formil-Met na N koncu	f-Met receptorja 1 in 2	kemotaksa in sproščanje mediatorjev vnetja
manani in manano-proteini	kvasovke	nepoznan	manozni receptor in protein, ki veže manozo	vnetni odgovor, fagocitoza, endocitoza
dvoverižna RNA	virusi	dvoverižna RNA	TLR3, RIG-I	vnetni odgovor
flagelin	večina bakterij	N-konec in C-konec	TLR5	vnetni odgovor
cimosan	kvasovke	nepoznan	TLR2, manozni in $\beta$ -glukanski receptor	vnetni odgovor, fagocitoza
HSP	prokarionti in evkarionti	neznan	neznan	vnetni odgovor

## 2.2 SEPSA

Sepsa je zapleten klinični sindrom, ki je posledica sistemskega imunskega odgovora na okužbo (Ulloa in Tracey, 2005). Klinični znaki so pogosto prikriti in vključujejo vročino, zmedenost, prehodno hipotenzijo, zmanjšano izločanje urina in nerazložljivo trombocitopenijo. Nezdravljenje bolezni lahko privede do pljučne in ledvične odpovedi, nepravilnosti v koagulaciji in neodzivne hipotenzije (Cohen, 2002). Glede na klinične znake in potek bolezni ločimo sepsa, hudo sepsa in septični šok, kot je prikazano v preglednici 2. V primerih, ko ne moremo dokazati prisotnosti bakterij, govorimo o

sindromu sistemskega vnetja SIRS (systemic inflammatory response syndrom) (Riedemann in sod., 2003).

Preglednica 2: Izrazi povezani s sepsa (Riedemann in sod., 2003; Ulloa in Tracey, 2005).

<b>SIRS</b>	Kadar ima bolnik prisotna dva ali več kliničnih znakov sistemskega vnetja: - znižana ali zvišana telesna temperatura $<36^{\circ}\text{C}$ ali $>38^{\circ}\text{C}$ , - zvišana srčna frekvenca $> 90/\text{min}$ , - povečana frekvenca dihanja $> 20$ vdihov na minuto ali $\text{pCO}_2 < 32$ mm Hg ( $< 4,3$ kPa), - število levkocitov je $< 12 \times 10^9$ celic/L ali $> 4 \times 10^9$ celic/L ali več kot 10 odstotkov nezrelih oblik.
<b>Sepsa</b>	SIRS + okužba.
<b>Huda sepsa*</b>	Sepsa in odpoved delovanja organa: znaki organske disfunkcije, nezadostne prekrvavitve ali arterijske hipotenzije, oligurija, laktična acidoza, zvišani jetrni encimi ali spremenjena cerebralna funkcija. Je počasni ubijalec: progresija preko 7 do 14 dni, smrtnost 30 do 70 odstotna.
<b>Septični šok*</b>	Huda sepsa in arterijska hipotenzija, neodzivna na nadomestne tekočine . Značilna je visoka smrtnost; smrt nastopi v 24 do 48 urah po začetku bolezni.

\*Če bolniki preživijo septični šok, ponavadi le ta preide v hudo obliko sepse. V nekaterih primerih pa bolniki dobijo hudo sepsa brez razvoja septičnega šoka.

Sepsa je po pogostosti tretji največji vzrok smrti v razviti družbi, kar jo po številu primerov enači z akutnim miokardnim infarktom (Ulloa in Tracey, 2005). V Evropi naj bi zaradi sepse umrlo približno 150 000 bolnikov in v ZDA 200 000 letno (Jereb in Trampuž, 2003). Smrtnost je približno 30 odstotna oziroma do 40 odstotna pri starejših in 50 odstotna ali celo višja za bolnike s hujšo obliko bolezni, ki se imenuje septični šok. Podatki veljajo za hospitalizirane bolnike. Najpogostejša mesta okužbe so pljuča, abdominalna votlina, urinarni trakt in primarna okužba krvnega obtoka (Cohen, 2002). Sepsa običajno povzroča ena bakterijska vrsta, medtem ko je polimikrobnih le 1,5 % (Gubina, 2002).

### 2.3 POVZROČITELJI

Bakterije so glavni povzročitelji sepse in septičnega šoka. Poleg bakterij lahko tudi okužba z glivami, virusi in paraziti povzroči enak vnetni odziv (Amersfoort in sod, 2003). Razmerja odgovornih patogenov se s časom spreminjajo. Do konca osemdesetih let prejšnjega stoletja so bile najpogostejši vzrok sepse gramnegativne bakterije (npr. *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp.), kasneje dominirajo grampozitivne bakterije (npr. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* sp., *Streptococcus pneumoniae*) (Riedemann in sod., 2003).

## 2.4 CITOKINI

Citokini so majhni proteini, ki sodelujejo v medcelični komunikaciji in uravnavajo zapletene interakcije, kot so razmnoževanje, diferenciacija, efektorske funkcije in preživetje celic v limfoidnih, vnetnih in hemopoetskih organih. Izločajo jih skoraj vse celice, predvsem pa makrofagi in limfociti. V nasprotju s hormoni, ki delujejo na velike razdalje, deluje večina citokinov lokalno. Vežejo se na posebne receptorje na membrani tarčne celice in sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov v njej. Na splošno se citokini vežejo na receptorje z močno afiniteto in zato lahko posredujejo biološke učinke v pikomolarnih koncentracijah. Citokini obsegajo družine molekul, kot so rastni faktorji, interferoni, interlevkini in kemokini, ki se navadno izločajo ob aktivaciji določene celice. Njihovo izločanje je kratkotrajno, le nekaj ur ali dni (Vozelj, 2000).

Organizem septičnega bolnika proizvaja prekomerne količine vnetnih citokinov, kot so  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ , HMGB-1 in drugi. Običajno ti citokini sprožijo koristen vnetni odgovor, ki na primer omogoči lokalno koagulacijo za omejitev poškodbe tkiva. Vendar v primeru prekomerne proizvodnje vnetnih citokinov pride do nenormalne regulacije imunskega odziva, kar vodi v patološko stanje imunskega sistema (Ulloa in Tracey, 2005).

Med citokine spadajo tudi kemokini, ki predstavljajo veliko družino strukturno homolognih majhnih molekul, velikih približno 8-12 kD. Te molekule spodbudijo naključno gibanje (kemokineza) in usmerjajo potovanje (kemotaksa) fagocitov in T celic in jih zato imenujemo kemokini (**kemotaktični citokini**) (Madigan in sod., 2000).

### 2.4.1 IL-1 $\beta$ (interlevkin-1 $\beta$ )

IL-1 obstaja v dveh oblikah:  $IL-1\alpha$  in  $IL-1\beta$ ; oba imata enake biološke funkcije. Posledice njunega delovanja so povišana telesna temperatura, kaheksija, resorpcija kosti, proteoliza mišic in povečano nastajanje proteinov akutne faze. Delujeta lahko neposredno ali posredno preko spodbuditve drugih citokinov (npr.  $IL-6$ ,  $TNF\alpha$ ) na različne celice. Izločajo ju predvsem aktivirani makrofagi v odgovor na mikrobnе (npr. lipid A, celična stena grampozitivnih bakterij, eksotoksini), imunske (npr. aktivirane celice T) in druge dražljaje (npr. silikatni delci) (Vozelj, 2000). IL-1 uvrščamo med t.i. zgodnje citokine skupaj s  $TNF\alpha$ , ker se začneta izločati že nekaj minut po okužbi in njuni koncentraciji padeta na bazalno raven že po nekaj urah (Ulloa in Tracey, 2005).

### 2.4.2 IL-6 (interlevkin-6)

IL-6 je izrazit pleiotropni citokin, ki ga izdelujejo različni celični tipi v odgovor na IL-1 in  $TNF\alpha$ . Je poglavitni mediator reakcije akutne faze in deluje neposredno na hepatocite, da sintetizirajo C-reaktivni protein (CRP), komponente komplemента in druge proteine akutne faze. Na celice B deluje s pospeševanjem razmnoževanja in zorenja in tako okrepi izločanje imunoglobulinov (Vozelj, 2000).

### 2.4.3 IL-12p70 (interlevkin-12p70)

IL-12 je pomemben regulatorni citokin naravnega in specifičnega imunskega odziva. Biološko aktivna oblika IL-12 je heterodimer z molsko maso 75 kDa, ki se imenuje IL-12p70 in je sestavljen iz dveh različnih podenot: p40 in p35 (Klinke, 2006).

IL-12 izdelujejo celice B, monociti in makrofagi. Je edini citokin, ki ga ne izdelujejo celice T in ga imamo zaradi njegovega delovanja na celice NK za mediatorja naravne imunosti. V celicah NK spodbudi izdelovanje IFN- $\gamma$ , ki je močan aktivator makrofagov, iz katerih se začnejo izločati NO, TNF $\alpha$  in IL-1 in tako se poveča zmožnost makrofagov, da ubijejo znotrajcelične parazite in tumorske celice. IL-12 deluje sinergistično z IL-2 in skupaj okrepi citolitično aktivnost celic NK. Poleg tega spodbuja diferenciacijo celic T CD8 v zrele, funkcijsko aktivne citotoksične celice (Vozelj, 2000).

### 2.4.4 TNF $\alpha$ (ang. tumor necrosis factor- $\alpha$ ; sl. dejavnik tumorske nekroze)

TNF $\alpha$  je primarni regulator naravnega imunskega sistema in ključen dejavnik pri vzpostavitvi lokalnega zaščitnega imunskega odziva na okužbo, travmo ali ishemijo. Večje koncentracije TNF $\alpha$  v krvnem obtoku povzročijo šok, hipotenzijo, intravaskularno koagulopatijo, hemoragične nekroze in poškodbo tkiva, kar so znaki septičnega šoka (Ulloa in Tracey, 2005).

Izdelujejo ga makrofagi, celice T, celice NK, astrociti in Kupfferjeve celice v odgovor na viruse, bakterije, različne citokine in imunske komplekse. Najpomembnejši celični vir TNF $\alpha$  so z LPS aktivirani mononuklearni fagociti (Vozelj, 2000). TNF $\alpha$  se prične izločati iz celic nekaj minut po okužbi. Po 3 do 4 urah se izločanje ustavi in ga v serumu ne moremo več zaznati (Ulloa in Tracey, 2005).

Biološke aktivnosti TNF $\alpha$  (kot posledica delovanje LPS) najbolje pojasnimo kot funkcijo količine. Pri majhnih koncentracijah spodbudi žilne endotelijske celice k izražanju površinskih adhezijskih molekul, ki napravijo endotelijske celice lepljive najprej za nevtrofilce in nato za monocite in limfocite. To delovanje prispeva k nakopičenju levkocitov v vnetišču in je verjetno fiziološko najpomembnejši lokalni učinek TNF $\alpha$ . Poleg tega TNF $\alpha$  aktivira vnetne levkocite, da ubijejo mikrobo, spodbudi mononuklearne fagocite k izločanju citokinov, predvsem IL-1, IL-6, sam TNF $\alpha$  in kemokine. Vsi ti učinki so kritični za vnetni odziv na mikrobo (Vozelj, 2000).

Če je dražljaj LPS dovolj močan, se izločajo večje količine TNF $\alpha$ . V takih razmerah vstopi TNF $\alpha$  v krvni obtok in deluje kot endokrini hormon. TNF $\alpha$  je endogeni pirogen, ki deluje v hipotalamusnem termoregulacijskem centru in inducira vročino. Poleg tega deluje na hepatocite, da povečajo izločanje nekaterih proteinov akutne faze. TNF $\alpha$  zavira delitev matičnih celic v kostnem mozgu. Kronično izpostavljanje TNF $\alpha$  povzroči limfopenijo in imunsko pomanjkljivost. Dolgotrajno dajanje TNF $\alpha$  poizkusnim živalim povzroči spremembo presnove, kaheksijo (zato se imenuje tudi kahektin) (Vozelj, 2000).

Pri bakterijski sepsi z gramnegativnimi bakterijami se sprostijo v serum velike količine TNF $\alpha$ . Živali, ki dobijo takšne količine TNF $\alpha$ , poginejo zaradi kolapsa obtoka. Nevtralizirajoča protitelesa anti-TNF $\alpha$  preprečijo smrt, kar kaže na to, da je citokin poglavitni mediator septičnega šoka (Vozelj, 2000).

Eksperimentalno so pokazali, da se gramnegativni septični šok lahko prepreči z nevtralizacijo vnetnih citokinov (IL-1, IL-6 in TNF $\alpha$ ) ali z dajanjem protivnetnega citokina IL-10 (Henderson in sod., 1996).

#### **2.4.5 IL-8 (interlevkin-8)**

IL-8 je najbolj opredeljen kemokin in je najmočnejši kemoatraktant za nevtrofilce, monocite, celice T in bazofilce. Sproži respirativni izbruh v nevtrofilcih in sproščanje histamina in levkotrientov iz bazofilcev (Vozelj, 2000). Stimulira nastanek IFN- $\gamma$  in IL-1 (Ulloa in Tracey, 2005).

#### **2.4.6 IP-10 (ang. interferon- $\gamma$ -induced protein-10; sl. protein 10 induciran z interferonom $\gamma$ )**

IP-10 je protein z molsko maso 10 kDa, ki se v 30 minutah po stimulaciji celic z IFN- $\gamma$  prične sintetizirati v relativno visokih koncentracijah, ki jih zaznamo še do 34 ur kasneje. Biološke funkcije IP-10 so: aktivacija monocitov, stimuliranje migracije celic T in celic NK na mesto vnetja, regulacija dozorevanja celic T, modulacija ekspresije adhezijskih molekul in inhibicija angiogeneze (Neville, 1997).

#### **2.4.7 RANTES (ang. regulated upon activation, normal T-cells expressed, and secreted; sl. protein reguliran z aktivacijo, ga izražajo normalne celice T in se izloča)**

RANTES je protein z molsko maso 8 kDa, ki je kemotaktičen za celice T, eozinofilce in bazofilce. Izdelujejo ga celice T in makrofagi (Maghazachi, 1996). Induciran je z IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  in IFN $\gamma$  (McInnis in sod., 2004).

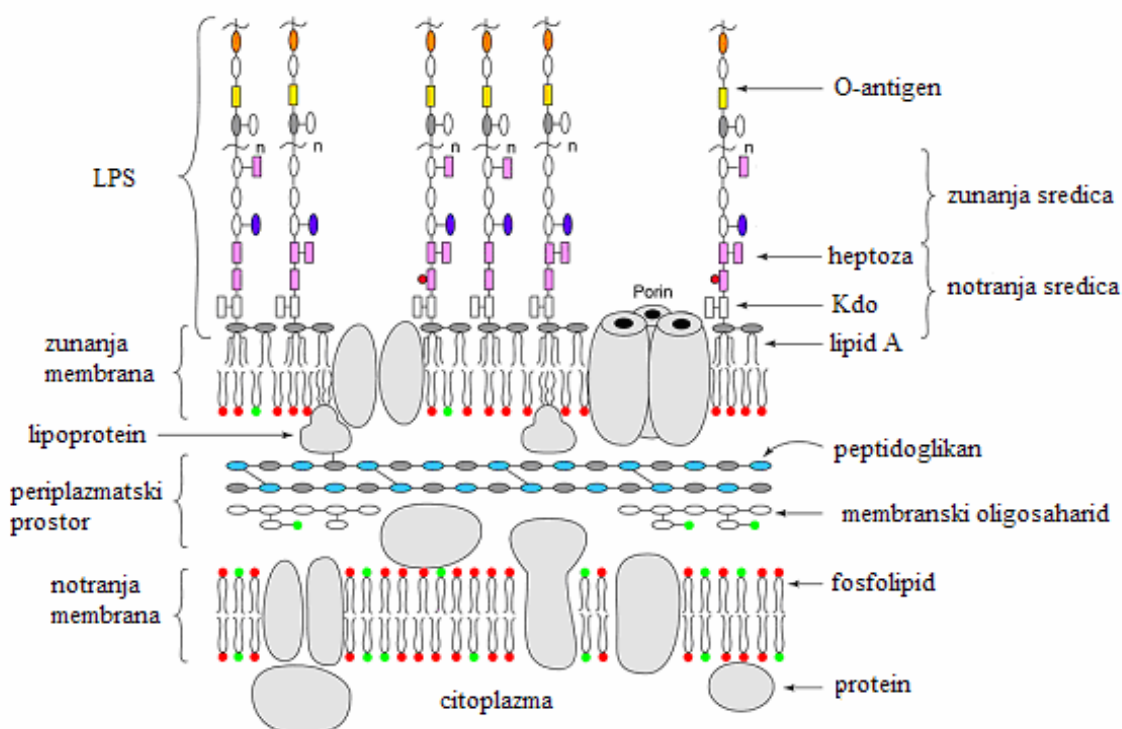
#### **2.4.8 MCP-1 (ang. monocyte chemoattractant protein-1; sl. protein-1 kemotaktičen za monocite)**

MCP-1 je kemokin iz 76 aminokislin, ki je induciran z različnimi vnetnimi aktivatorji, vključno z mikrobno okužbo. Glavni receptor za MCP-1 je izražen na skupini monocitov in aktiviranih celicah T (Serbina in sod., 2003). Privablja imunske celice kot so monociti na mesto poškodbe tkiva in okužbe (Yoshimura, 1989).

## 2.5 CELIČNA STENA GRAMNEGATIVNIH BAKTERIJ

Pri bakterijah razlikujemo dva tipa celične stene: grampozitivno in gramnegativno celično steno. Gramnegativne bakterije imajo tanjšo (od 20 do 30 nm debela) in bolj zapleteno zgrajeno celično steno.

Notranja plast celične stene, ki leži ob citoplazemski membrani je sestavljena iz peptidoglikana (slika 1). Na zunanji strani se nahaja zunanja membrana, v kateri so zasidrani Braunovi lipoproteini, ki so ponekod kovalentno vezani na peptidoglikan (Singleton in Sainsbury, 1999). Tudi LPS se nahaja v zunanji membrani in varuje bakterijo pred žolčnimi solmi, hidrofobnimi antibiotiki in aktivacijo komplemента (Bäckhed in sod., 2003).



Slika 1: Primer celične stene pri gramnegativnih bakterijah (Wyckoff in sod., 1998).

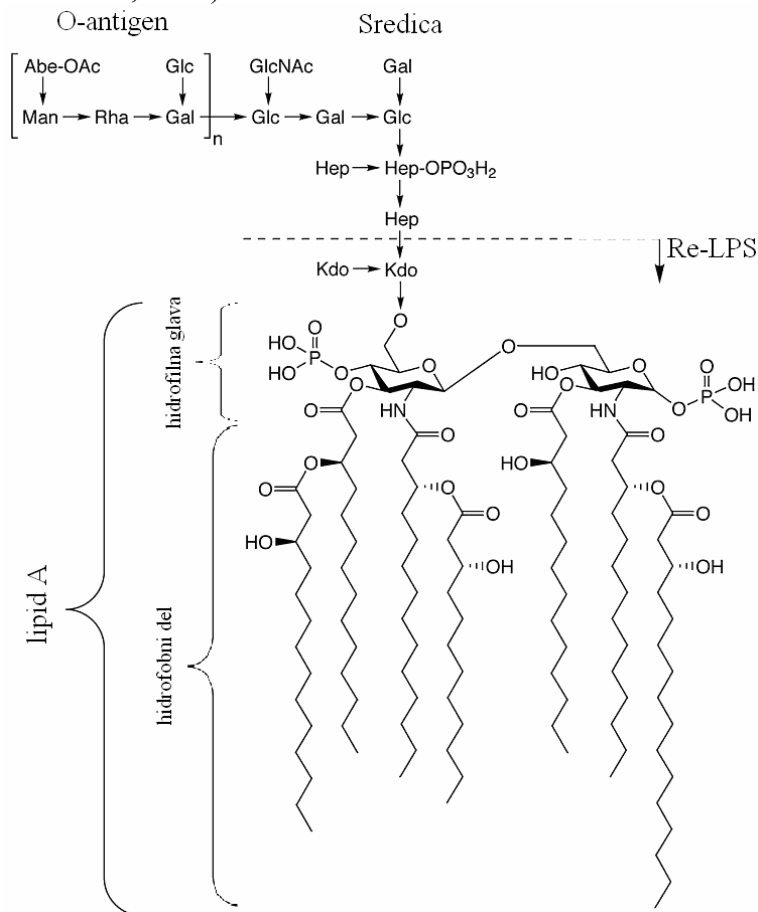
## 2.6 LIPOPOLISAHARIDI (LPS)

### 2.6.1 Struktura LPS

Glavna komponenta površine gramnegativnih bakterij so lipopolisaharidi (LPS) (slika 2). Predstavlja 45 odstotkov komponent zunanje membrane oz. 75 % komponent zunanjšega sloja zunanje membrane. LPS različnih bakterij imajo podobno zgradbo, vendar razlike med njimi močno vplivajo na biološko aktivnost. Osnovo LPS predstavlja lipid A, na katerega je kovalentno vezana oligosaharidna sredica. Gladki LPS ima na glikozid pripet še polisaharidni O-antigen (Caroff in Karibian, 2003, Amersfoort in sod., 2003).



LPS se med rastjo in delitvijo bakterije postopoma sprošča v okolico, vendar v velikih količinah šele po smrti bakterije. Je toplotno zelo obstojen in ga normalna sterilizacija ne uniči. Za inaktivacijo je potrebna temperatura nad 180° C. V raztopini ima negativni naboj. (Gorbet in Sefton, 2005).



Slika 2: Struktura molekule LPS (Chaby, 1999).

### 2.6.1.1 Lipid A

Lipid A zasidra molekulo LPS v zunanjo membrano. Predstavlja najbolj ohranjen del LPS in je odgovoren za biološko aktivnost endotoksina (Gorbet in Sefton, 2005). Večina lipidov A je sestavljenih iz fosforiliranega disaharida β-D-Glc pN-(1-6)-α-D-Glc pN, ki je aciliran. Običajne acilne skupine so (R)-3-hidroksi maščobne kisline, ki so delno zaestrene na 3-hidroksi skupini z drugimi maščobnimi kislinami (Holst in sod., 1996). Čeprav velja lipid A za najbolj ohranjeno regijo LPS molekule, so med različnimi skupinami bakterij prisotne razlike, ki se kažejo v:

- tipu glukoamina, ki sestavlja disaharidno ogrodje, stopnji fosforilacije in prisotnosti dodatnih skupin, vezanih na fosfatni ostanek
- v tipu, dolžini, številu in poziciji acilnih skupin (Amersfoort in sod., 2003).

### 2.6.1.2 Oligosaharidna sredica

Oligosaharidna sredica molekule LPS se pri enterobakterijah deli na notranji in zunanji del, ki skupaj obsegata 8 do 12 razvejanih sladkorjev. Notranja sredica je sestavljena iz dveh ali več skupin Kdo (2-keto-3-deoksioktanska kislina) in dveh ali treh heptoznih sladkorjev (L-glicero-D-mano heptoza), ki so prisotni samo med bakterijami. Hep in Kdo ostanki imajo običajno vezane fosfatne, pirofosfatne ali fosforiletanolaminske skupine, kar vodi do dodatnega negativnega naboja v bližini disaharidnega ogrodja lipida A. Visoka gostota negativnega naboja naj bi imela fiziološki pomen, ker naj bi posledično koncentriranje dvovalentnih kationov ( $Mg^{2+}$  in  $Ca^{2+}$ ) pomagalo pri vzdrževanju strukturne in funkcionalne integritete zunanje membrane. Re-LPS (Kdo ostanek vezan na lipid A) je najmanjša LPS molekula gramnegativnih bakterij v naravnih pogojih in je hkrati tudi najmanjša LPS struktura, potrebna za delitev in rast celice. Zunanja sredica LPS je sestavljena iz različnih sladkorjev (do 6 enot pri enterobakterijah) in predstavlja bolj variabilen del v primerjavi z notranjo sredico (Amersfoort in sod., 2003; Caroff in Karibian, 2003; Rietschel in sod., 1994).

### 2.6.1.3 O-specifična veriga

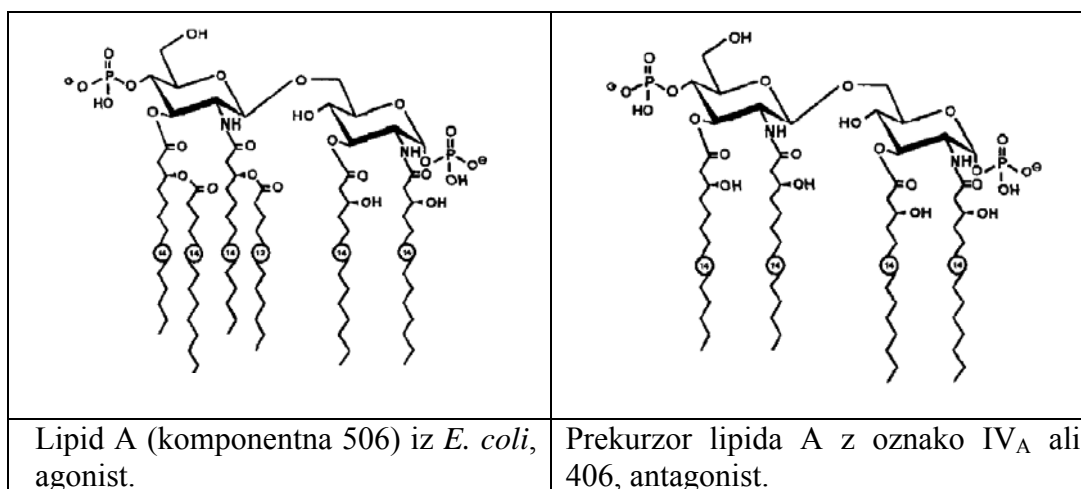
O-specifična veriga je prisotna le v gramnegativnih bakterijah, ki tvorijo gladke kolonije in zato ima LPS s to verigo oznako sLPS (ang. smooth). Kolonije bakterij brez O-specifične verige imajo na gojitvenih ploščah hrapav izgled in so zato dobile oznako rLPS (ang. R-rough). Veriga je zgrajena iz do štiridesetih ponavljajočih se oligosaharidnih enot, ki vsebujejo do osem različnih sladkornih ostankov. Polisaharid se nadaljuje nad ravnino bakterijske membrane in zato je ta veriga pri patogenih bakterijah v neposrednem kontaktu z gostiteljsko površino. O-veriga predstavlja pomemben površinski antigen, ki določa serološko specifičnost sevov. Zaradi te lastnosti O-specifično regijo imenujemo tudi O-antigen. Izredna raznolikost O-specifične regije se kaže v strukturi obroča, vezanih skupinah in tipu glikozidne vezi. Do heterogenosti O-antigena prihaja tudi znotraj istega serotipa, ki se kaže v dolžini O-antigena oz. številu ponavljajočih se oligosaharidnih enot (Caroff in Karibian, 2003, Rietschel in sod., 1994).

## 2.6.2 Biološka aktivnost endotoksinov

Endotoksin in njegovo biološko aktivnost je prvi opisal Richard Pfeiffer že leta 1892 kot temperaturno stabilni material, izoliran iz bakterije *Vibrio cholerae*, ki povzroči toksične reakcije pri budri. Opazil je, da se endotoksini zelo razlikujejo od temperaturno občutljivih eksotoksinov, ki jih nekatere bakterije izločajo v okolje (Holst in sod., 1996).

Bakterija *E. coli* vsebuje okoli 2 milijona molekul LPS na celico (Gorbet in Sefton, 2005). Le-te so preko lipida A zasidrane v bakterijsko zunanjo membrano in kot take ne aktivirajo imunskega sistema. Sposobnost stimulacije imunskega sistema pridobijo šele, ko se sprostijo iz membrane in postane lipid A izpostavljen celicam imunskega sistema

(Amersfoort in sod., 2003). Sproščanje LPS in drugih komponent celične stene je povezano z delitvijo, smrtjo in lizo celice (Rietschel in sod., 1994).



Slika 3: Kemijska struktura lipida A (levo) in prekurzorja lipida A (desno) (Holst in sod., 1996).

Aktivnost molekul LPS je odvisna od tipa disaharidnega ogrodja, dolžine in števila acilnih verig, asimetrije njihove porazdelitve in prisotnosti fosfatnih skupin (Netea in sod., 2002).

Največjo biološko aktivnost naj bi imel lipid 506 (slika 3), ki je sestavljen iz difosforiliranega  $\beta$ -1,6-glukozaminskega disaharida in ta je substituiran s 3-hidroksil miristinsko (C14:0) skupino na 2, 2', 3 in 3' mestu, od katerih sta 2' in 3' mesto zaestrena z miristinsko (C14:0) in lavrinsko maščobno kislino (C12:0) (Netea in sod., 2002, Holst in sod., 1996). Molekule, ki jim manjka eden od zgornjih elementov so manj aktivne ali celo neaktivne, torej so nezmožne inducirati sintezo citokinov v človeških monocitih. Na primer tetraaciliran prekurzor lipida A ali komponenta 406 ali lipid IV<sub>A</sub> je neaktiven in zato ne sproži proizvodnje IL-1, IL-6 in TNF $\alpha$  v človeških monocitih (Holst in sod., 1996). Lipid IV<sub>A</sub> je prekurzor LPS in predstavlja zelo majhen delež lipida A prisotnega v bakterijskih celicah, medtem ko ga na površini bakterije sploh ni (Hajjar in sod., 2002).

Različni kemotipi LPS lahko delujejo agonistično ali antagonistično. Heksaacilni lipid A v človeških monocitih sproži sintezo citokinov in je zato agonistična molekula. Molekule, ki kompetitivno preprečijo vezavo LPS na receptor na tarčni celici ali molekule, ki inhibirajo aktivacijo celic, da bi sproščale bioaktivne mediatorje, pa so antagonisti LPS (npr. lipid IV<sub>A</sub>) (Holst in sod., 1996; Zughair in sod., 2005).

Za aktivacijo monocitov in makrofagov so v pogojih *in vitro* potrebne zelo nizke koncentracije agonističnega LPS. Celice pričnejo že pri koncentraciji 0,01 ng LPS/ml proizvajati IL-1 $\beta$  in TNF $\alpha$ . *In vivo* je bil pri ljudeh opažen odziv na endotoksin pri vbrizgani koncentraciji 4 ng/kg telesne teže (Gorbet in Sefton, 2005).

Poleg IL-1 $\beta$  in TNF $\alpha$  LPS v monocitih in makrofagih sproži sintezo tudi drugih vnetnih citokinov (npr. IL-6, IL-8, IL-12). Makrofagi v odziv na LPS sproščajo tudi mnoge druge mediatorje imunosti kot so PAF (platelet-activating factor), prostaglandini, encimi in prosti radikali (npr. dušikov oksid) (Raetz, 1990, Cohen, 2002).

Monociti ali makrofagi, ki jih stimuliramo z nizkimi koncentracijami LPS, lahko postanejo neodzivni ob ponovni stimulaciji z visokimi koncentracijami LPS. Ta fenomen imenujemo endotoksinska toleranca (Fujihara in sod., 2003). Tudi pri živalih so opazili, da se le-te odzovejo na prvo dozo LPS s proizvodnjo citokinov oziroma s simptomi sepse, medtem ko druga doza LPS pri isti živali ne sproži imunskega odgovora ali je le-ta minimalen (Holst in sod., 1996).

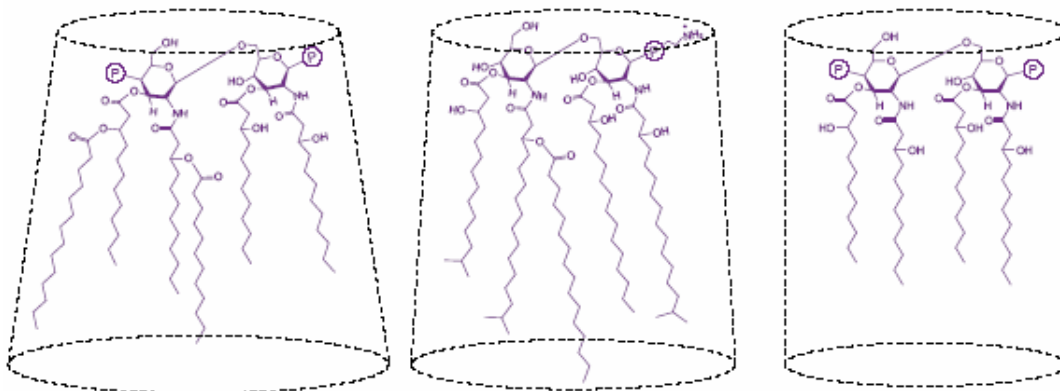
Zanimivo je tudi dejstvo, da se mišji in človeški monociti oz. makrofagi različno odzovejo na enak lipid A. Tako ima na primer komponenta 406, ki ne aktivira človeških monocitov, v pogojih *in vitro* in *in vivo* endotoksično aktivnost za mišje monocite (Holst in sod., 1996).

Poleg monocitov in makrofagov se na LPS odzivajo tudi polimorfonuklearni levkociti, in limfociti B in T, vaskularne in epiteljske celice (Holst in sod., 1996).

## 2.7 AGREGATI

Lipidi A lahko tvorijo agregate z veliko stabilnostjo odvisno od lastnosti raztopine (pH, ioni, surfaktanti itd.). Zato je velikost endotoksina od 10-20 kDa ( $M_w$ :  $1-2 \times 10^4$ ) za monomere in več kot 1000 kDa za agregat ( $M_w$ :  $4 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ ) (Gorbet in Sefton, 2005).

Biofizikalne in imunološke raziskave bioloških aktivnosti lipidnih agregatov so pokazale, da imajo molekule lipida A stožčaste oblike (slika 4), ki tvorijo agregate nelamelarne (kubične ali heksagonalne) oblike, največjo endotoksično aktivnost. Agregati v obliki lamel, ki jih sestavljajo lipidi A valjaste oblike, imajo nizko endotoksično aktivnost ali pa je sploh nimajo. Obstaja tudi vmesna oblika, ki je ponavadi po biološki aktivnosti med stožčasto in lamelarno obliko (Mueller in sod., 2004). Možen je prehod iz ene v drugo obliko, na kar vpliva temperatura, pH in jonska jakost (Seydel in sod., 1993).



Slika 4: Prostorska predstavitev oblik različnih lipidov A. Od leve proti desni: Heksaacilni asimetrični lipid A iz *E. coli* s stožčasto obliko, pentaacilni lipid A iz *Porphyromonas gingivalis*, tetraacilni simetrični prekurzor lipida A, IV<sub>A</sub> (komponenta 406) z obliko valja (Netea in sod., 2002).

## 2.8 PREDSTAVITEV LPS, KI SMO JIH UPORABILI PRI DIPLOMSKEM DELU IN OPIS BAKTERIJ, IZ KATERIH SO BILI IZOLIRANI

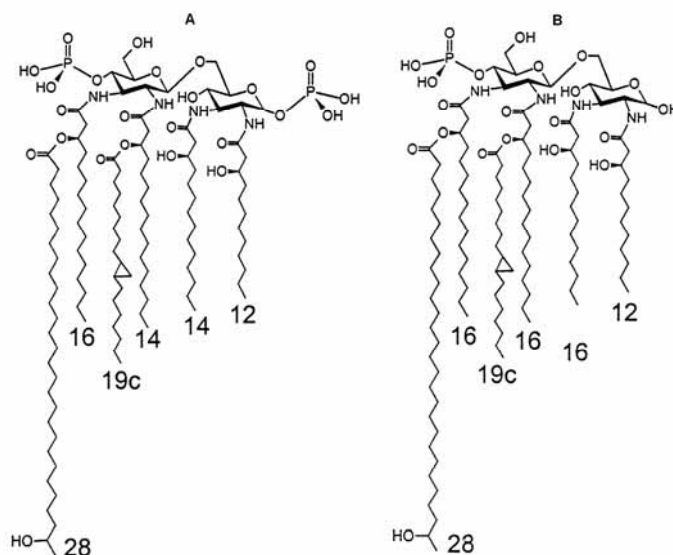
Pri diplomskem delu smo uporabili LPS iz bakterij: *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *Escherichia coli*, *Ochrobactrum anthropi*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia pestis* in *Y. enterocolitica*.

### 2.8.1 LPS Ba-187 iz *Brucella abortus* in Bm-046 iz *Brucella melitensis*

Rod *Brucella* spada med gramnegativne bakterije iz domene *Proteobacteria* (podskupina  $\alpha$ -2). Brucele ne proizvajajo eksotoksinov, protifagocitnih kapsul, proteinskih adhezinov ali virulenčnih faktorjev kodiranih na plazmidu. So odporne na vrsto bakteriocidnih kationskih peptidov, imajo zmožnost preprečiti fuzijo lizosoma in vezikla in so zmožne živeti v veziklih podobnih avtofagosomu. Njihov LPS ima nizko endotoksično aktivnostjo (Bengoechea in sod., 2000). Lipid A je heksaacililni in se od drugih molekul razlikuje predvsem po eni dolgi verigi z 28-imi C-atomi (slika 5).

*B. abortus* je primarni patogen goveda, vendar lahko okuži tudi človeka in druge živali. Okužba breje živali vodi v placentitis (vnetje posteljice), posledica je splav. Znotrajcelično razmnoževanje *B. abortus* v makrofagih glodalcev ni bila inhibirana s TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6 ali GM-CSF ampak z IL-2 oziroma IFN- $\gamma$  (Henderson in sod., 1996).

*B. melitensis* je patogena za koze in ovce, redkeje za govedo, prašiče in človeka (Singleton in Sainsbury, 1999).



Slika 5: Struktura lipidov A bakterije *Brucella* in *Ochrobactrum*, ki se od drugih lipidov A razlikujeta predvsem po eni dolgi verigi z 28-imi C atomi. A) Heksaacilni lipid A z molekulsko maso 2101,6 Da. B) Mono-P-heksaacilni lipid A z molekulsko maso 2079,7 Da (Moriyon, 2005).

### **2.8.2 LPS Oa-001 iz *Ochrobactrum anthropi***

Rod *Ochrobactrum* je zelo soroden rodu *Brucella* glede na analizo DNA, rRNA in proteinov, vendar se razlikujeta glede na habitat in sposobnost virulence. Bakterije *Ochrobactrum* so primarno talni mikroorganizmi. Najdemo jih v rizosferi korenin rastlin kot so krompir, riž in žito. Patogeni so le izjemoma za hudo bolne in imunsko oslABLJENE bolnike ali za bolnike z vstavljenimi katetri. *Ochrobactrum* sicer lahko povzroči meningitis, osteomielitis, bakteriemijo in septikemijo, vendar je nezmožen vzpostaviti kronično okužbo in zato po odstranitvi katetra ni več prisoten v gostitelju. Mehanizmi odgovorni za kolonizacijo rizosfere in mehanizmi antagonistične aktivnosti proti rastlinskih patogenom so podobni tistim odgovornim za kolonizacijo človeških organov in tkiv oziroma obrambo (Berg in sod., 2005, Bendoechea in sod., 2000). Tudi tu je lipid A heksaaciliran z eno verigo z 28-imi C-atomi (slika 5).

### **2.8.3 LPS Ec-003, Ec-004 in Ec006 iz *Escherichia coli***

*Escherichia coli* je gramnegativna bakterija, ki spada v družino *Enterobacteriaceae*. Bakterija je normalno prisotna v gastrointestinalnem traktu človeka in živali, lahko pa jo najdemo tudi v prsti in vodi, kar je posledica fekalnega onesnaženja. Določeni sevi so patogeni ali/in toksigeni (Singleton in Sainsbury, 1999).

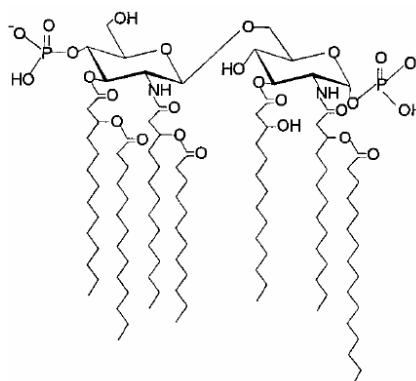
LPS so po sestavi pretežno tetra- ali pentaacilni (slika 7) in zato nimajo visoke biološke aktivnosti. Prisoten je tudi heksaacilni LPS. Podrobna sestava lipidov je prikazana v podpoglavju 3.1 Materiali.

### **2.8.4 LPS 506**

Kemijsko sintetiziran lipid A s šestimi acilnimi verigami in molekulska masa 1797,2 Da je zaradi heksaacilne strukture stožčaste oblike in ima največjo biološko aktivnost. Prikazan je na sliki 3.

### **2.8.5 LPS Sa-LPS iz *S. enteritidis* podvrsta *abortus* serotip Equi**

Sa-LPS je gladki LPS in je biološko zelo aktiven, medtem ko je samo lipid A, ki je heptaaciliran (slika 6), neaktiven oziroma deluje kot antagonist (Tanamoto in Azumi, 2000).

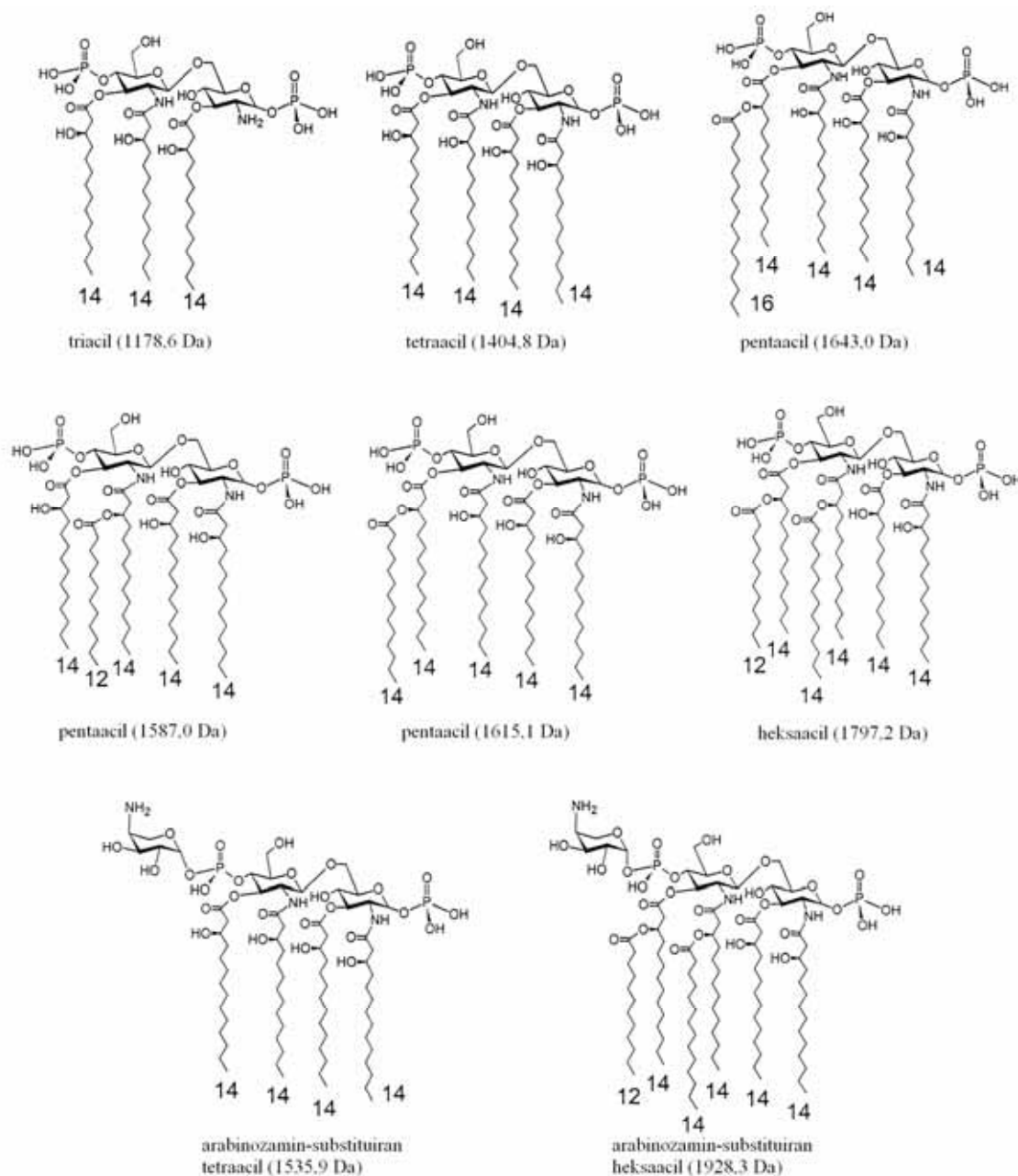


Slika 6: Salmonelin heptaacilirani lipid A (Tanamoto in Azumi, 2000).

Sa-LPS je izoliran iz bakterije *S. Equi*, ki je gramnegativen bacil iz družine *Enterobacteriaceae*. To je invazivna bakterija, ki povzroča genitalne okužbe in splave fetusov pri konjih (Salmonella, 2000; Andlovič, 2002).

### 2.8.6 LPS Ye3-002, Ye3-003 in Yp-001 iz jersinij

Pri diplomskem delu smo uporabili LPS izolirane iz bakterij *Yersinia pestis* (Yp-001) in *Yersinia enterocolitica* (Ye3-002, Ye3-003). Sestava teh LPS je mešana in je prikazana v preglednicah 5 in 7 v podpoglavju 3.1 Materiali. Večinsko tetraacilirani lipid A (Yp-001) naj bi imel najmanjšo biološko aktivnost, medtem ko naj bi bil večinsko heksaacilirani lipid A (Ye3-002) biološko najbolj aktiven. Za Ye3-003, ki ima podoben odstotek tetra- in heksaacilnega lipida A smo pričakovali srednji odziv.



Slika 7: Lipid A in analogne strukture z navedenimi masami v oklepajih, ki so prisotne v enterobakterijah oziroma pri *E. coli* in *Yersinia* sp (Moriyon, 2005).

Našteti LPS so iz jersinij, ki sodijo v rod gramnegativnih bakterij in spada v družino *Enterobacteriaceae*. Jersinije so paraziti ali patogeni človeka, živali (perutnina in ribe), nekatere živijo v vodi, hrani (Singleton in Sainsbury, 1999).

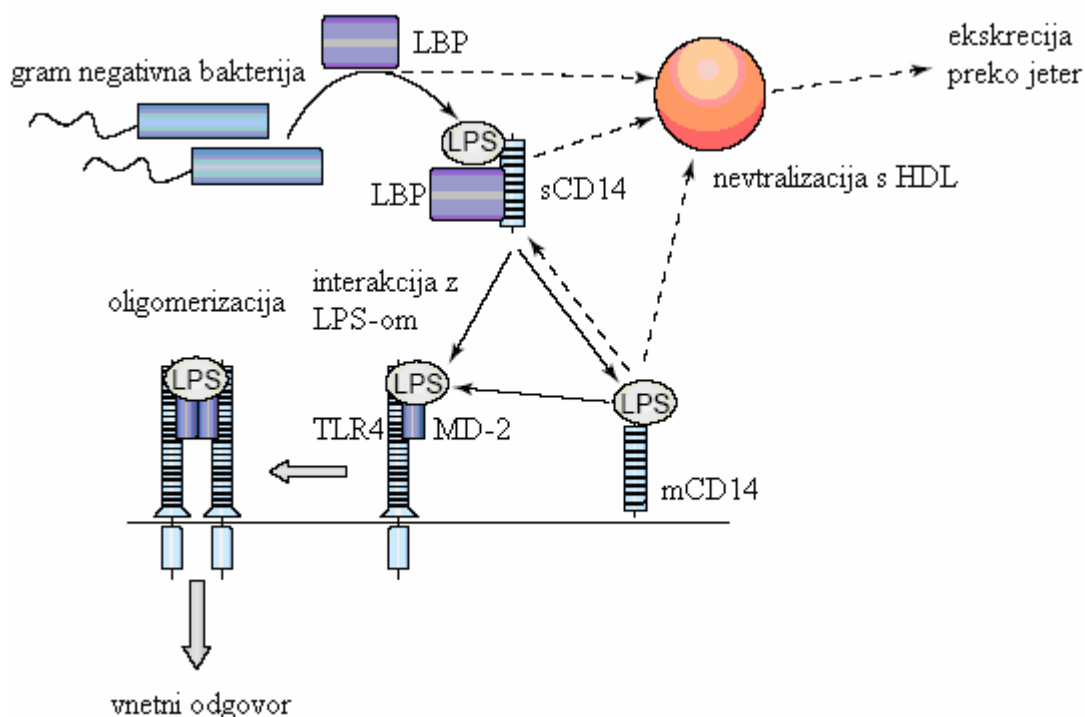
*Yersinia pestis* je zelo virulentna bakterija, ki povzroča kugo in je ena najnevarnejših zoonoz. Ima več virulentnih faktorjev: LPS, kapsulo, ki omogoča preživetje v fagocitih, ter koagulazo in fibrinolizin. Povzroča bubonsko, septično in septikemično kugo (Andlovic, 2002).



*Yersinia enterocolitica* je psihrotrofna fakultativno intracelularna bakterija, ki se pojavlja v mleku in mesu (predvsem v svinjskem mesu) in lahko povzroča vnetje mezenteričnih bezgavk, enterokolitis, sepso, terminalni ileitis, zunajčrevesne okužbe idr. Možna je tudi okužba z vodo in s transfuzijo krvi. Dodatek protiteles proti IFN- $\gamma$  ali TNF $\alpha$  miškam, okuženim s to bakterijo, pospeši napredovanje primarne okužbe, kar kaže na pomembno vlogo teh citokinov v obrambi pred bakterijo (Henderson in sod., 1996; Singleton in Sainsbury, 1999; Andlovic, 2002).

## 2.9 PREPOZNAVANJE LPS

Molekule LPS se po sproščanju iz gramnegativnih bakterij organizirajo v agregate zaradi njihove amfilne narave. Disociacija iz agregatov poteka s proteinom, ki veže LPS (LPS-binding protein, LBP) in tako nastane LPS-LBP kompleks. Le-ta se veže na membranski protein CD14 (mCD14), ki se nahaja na monocitih ali se veže na topni protein CD14 (soluble CD14, sCD14), ki je prisoten prosto v serumu (slika 8).



Slika 8: LPS se po vezavi na LBP lahko nevtralizira s HDL ali veže na receptorski kompleks MD-2/TLR4 ob pomoči CD14 (Miyake, 2004).

V naslednji stopnji aktivacije se nastali kompleks poveže še z izvenceličnim receptorskim kompleksom, ki ga tvorita MD-2 in TLR4, ki sta prisotna na membrani antigen predstavitevni celici (APC). Vezava sproži kaskado znotrajceličnih reakcij, ki vodijo v aktivacijo transkripcijskih faktorjev kot sta NF- $\kappa$ B (jedrni faktor  $\kappa$ B) in AP-1 (aktivatorski protein-1), kar ima za posledico sintezo vnetnih citokinov in mediatorjev imunosti (Fujihara in sod., 2003).

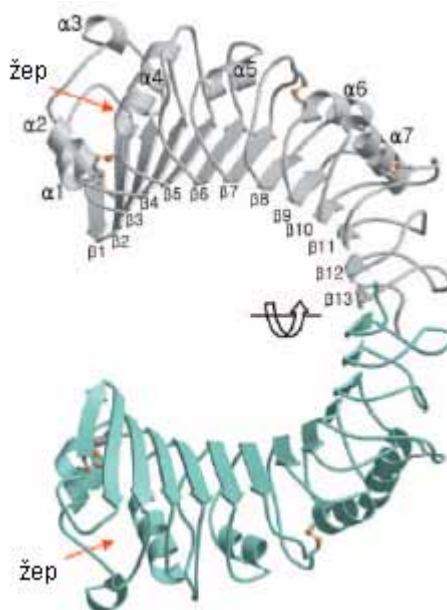
### 2.10.1 LBP

LBP je plazemski glikoprotein z molsko maso 60 kDa, ki prenaša fosfolipide, predvsem monomere LPS iz LPS agregatov na mCD14 ali na sCD14 ali na fosfolipide, kot je lipoprotein velike gostote (high-density lipoprotein, HDL). Prenos LPS na CD14 sproži aktivacijo celice, prenos na HDL pa nevtralizira LPS. Študije kinetike vezave LPS so pokazale, da se najprej veže na LBP in šele nato na HDL (Heumann in Roger, 2002).

### 2.10.2 CD14

Je glikoprotein z molsko maso 53 kDa, ki je preko glicerolfosfat inozitola zasidran v membrano mieloidnih celic (mCD14). Lahko pa se nahaja v topni obliki (sCD14) v serumu. mCD14 lahko deluje kot funkcionalni LPS receptor ali pa kot »čistilec« LPS, saj omogoči internalizacijo endotoksina (Heumann in Roger, 2002).

CD14 spada v skupino proteinov, ki imajo ponavljajoče se domene, bogate z levcini (leucine rich repeats, LRR) (Juan s sod., 1995). LRR se prekrivajo z beta ploščami; od  $\beta 3$  do  $\beta 13$  (slika 9).



Slika 9: Kvartarna struktura proteina CD-14. Dva monomera CD14 sta obarvana sivo in turkizno. Disulfidni mostički so prikazani v oranžni barvi. S puščicama sta označena hidrofobna žepa, ki igrata pomembno vlogo pri vezavo LPS in drugih ligandov in se nahajata na  $\text{NH}_2$  koncu polipeptidne verige (Kim in sod., 2005).

CD14 ni nujno potreben za vezavo LPS na receptor TLR4/MD-2, vendar nastanek kompleksa CD14-LPS zniža koncentracijo LPS potrebnega za aktivacijo makrofagov od 100 do 1000-krat (Fujihara s sod., 2003). Poleg tega se lahko kompleks sCD14-LPS veže na CD14-negativne celice (endotelijske in nekatere epiteljske celice) in tako tudi v njih sprožijo sintezo citokinov. Ob zelo visokih koncentracijah (nefizioloških) sCD14, lahko le-ta tekmuje z mCD14 za vezavo LPS in tako deluje kot antagonist

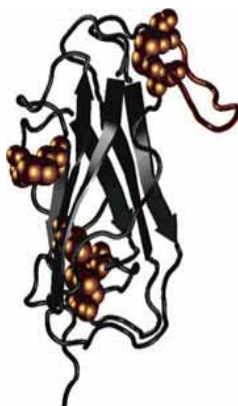
aktivacije celic. Tako kot LBP tudi CD14 deluje kot prenašalec LPS na HDL (nevtralizacija) (Heumann in Roger, 2002).

CD14 naj bi imel sposobnost razlikovati med različnimi bakterijskimi komponentami in jih usmerjati proti različnim TLR receptorjem. Ne razlikuje pa med različnimi strukturami lipida A (Fujihara in sod., 2003).

### 2.10.3 TLR4 in MD-2

Insekti in vretenčarji se na okužbo s patogeni hitro odzovejo z mehanizmi naravne imunosti. V vinski mušici *Drosophila melanogaster* patogene prepozna protein Toll, katerega homologe najdemo pri človeku in jih imenujemo receptorji podobni Toll (toll-like receptors, TLR). Z levcinom bogate domene (leucine-rich repeats, LRR) v zunajcelični domeni TLR so udeležene pri prepoznavi PAMP (Guha in Mackman, 2001). TLR4 je eden od receptorjev iz družine TLR in prepozna predvsem LPS gramnegativnih bakterij (Fujihara in sod., 2003).

Kompleks LPS-LBP-CD14 ni zmožen posredovati signala preko membrane brez TLR4, ki ima izvencelično, transmembransko in znotrajcelično ali citoplazemsko domeno. Za aktivacijo je nujno potreben še zunajcelični protein MD-2 (16 kDa), ki se veže na izvencelično domeno TLR4 (Miyake, 2003).



Slika 10: Shematski prikaz strukture MD-2. Kroglice predstavljajo disulfidno povezane cisteinske ostanke in široke puščice  $\beta$ -liste, ki tvorijo hidrofobni žep. V žep naj bi se vezal LPS. (Gruber in sod., 2004).

Protein MD-2 spada v nadružino proteinov ML (ang. MD-2-related lipid-recognition), katerih predstavniki vsebujejo domene bogate z beta ploščami. Takšno strukturo najdemo v nadružini proteinov, ki sodelujejo pri prepoznavanju in metabolizmu lipidov (Inohora in Nuñez, 2002). Ker ni znana tridimenzionalna struktura so na podlagi struktur homolognih proteinov naredili model MD-2 (Slika 10) (Gruber in sod., 2004). Model predvideva skupino bazičnih aminokislinskih ostankov na robu hidrofobnega žepa v razdalji 13 do 25 Å, kar se ujema z razdaljo med fosfatnimi skupinami lipida A, ki znaša 15 Å (Manček-Keber in Jerala, 2006).

## 2.10 SIGNALNE POTI

Po vezavi liganda na izvencelični segment receptorjev pride verjetno najprej do homodimerizacije citoplazemskega dela TLR4 (Anderson, 2000). Citoplazemski del TLR4 je homologen družini receptorjev IL-1 in se imenuje TIR (Toll/IL-1 receptor) domena (Janssens in Beyaerd, 2003).

Po homodimerizaciji TLR4 receptorja lahko pride do sprožitve signala preko dveh poti: od MyD88-odvisne in od MyD88–neodvisne poti (Slika 11). V **MyD88-odvisni** poti je aktiviran NF- $\kappa$ B, ki posredno povzroči indukcijo genov za vnetne citokine: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, MIP-3 $\alpha$ , IL-8, IL-12 idr. (Sankar in sod., 2006; Serbina in sod., 2003).

Signaliziranje preko **MyD88-neodvisne** poti vodi v disociacijo IRF3, ki ima za posledico sproščanje IFN- $\beta$  in zakasnelo aktivacijo NF- $\kappa$ B. IFN- $\beta$  se veže na receptor IFN- $\alpha/\beta$  tipa 1 in sledi aktivacija STAT1, ki posredno sproži sintezo IFN- $\alpha/\beta$ , IP-10, MCP-1, IRF3, MIG, RANTES idr. (Sankar in sod., 2006; Serbina in sod., 2003).

V nadaljevanju sta obe poti opisani bolj podrobno.

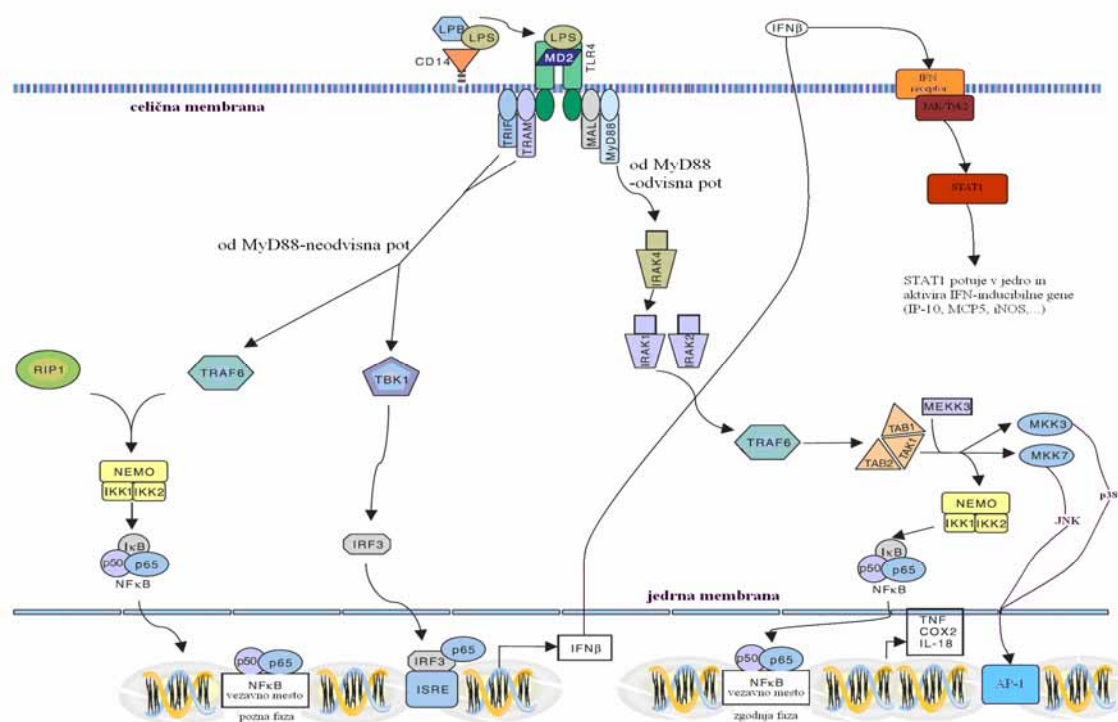
### 2.10.1 Od MyD88-odvisna signalna pot

Prvi protein, ki je bil odkrit »navzdol« od TLR4 po signalni poti, je bil adapterski protein MyD88, ki tudi vsebuje TIR-domeno (Takeda in sod., 2004).

Človeški MyD88 je sestavljen iz 296 AA in ima dve domeni: na C-koncu je TIR-domena, preko katere se poveže s TIR domeno TLR4 in na N-koncu je DD domena (ang. death domain). Ta domena reagira z DD IRAK. Poleg DD domene ima IRAK še serin/treonin kinazno domeno. V družini IRAK poznamo štiri člane: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M in IRAK-4. IRAK-1 in IRAK-2 se po aktivaciji receptorskega kompleksa pridružita MyD88, kar ima za posledico fosforilacijo IRAK-1. Ta protein disociira v citosol in reagira z drugim adaptorskim proteinom TRAF6.

Kompleks IRAK-1/TRAF6 tvori interakcije s TAK1 in s proteinoma TAB1 in TAB2, ki se vežeta na TAK1. IRAK-1 se razgradi, preostali kompleks pa se poveže še z drugimi proteini. Novonastali kompleks fosforilira kompleks IKK (sestavljajo ga IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  in NEMO/IKK $\gamma$ ) in MAPK, ki posredno aktivira transkripcijo AP-1 (Fujihara in sod., 2003 in Takeda in Akira, 2004).

Fosforilirana IKK $\alpha$  in IKK $\beta$  inducirata fosforilacijo I $\kappa$ B (Takeda in Akira, 2004), ki ji sledi poliubikvitinacija in s proteasomom posredovana razgradnja I $\kappa$ B. Razgradnja I $\kappa$ B povzroči translokacijo transkripcijskega faktorja NF- $\kappa$ B v jedro in s tem je omogočen prepis mnogih od NF- $\kappa$ B odvisnih genov, vključno z geni za sintezo citokinov vnetja kot so TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 in drugih (Medzhitov in sod., 1997).



Slika 11: Poenostavljen model signalizacije po od MyD88-odvisni poti in –neodvisni poti. LPS se ob pomoči LBP in CD14 veže na receptorski kompleks, ki je sestavljen iz TLR4 homodimera in dveh molekul MD-2. Sledi prenos signala preko membrane do TIR domene TLR4. Od tu naprej signal »potuje« po od MyD88 odvisni poti (desna stran slike) in z zakasnitvijo po od MyD88 neodvisni poti (leva stran slike).

Okrajšave: IFN, interferon; IKK, IκB kinaza, IRAK, kinaza povezana z receptorjem za interleukin-1 (ang. interleukin-1 receptor-associated kinase); IRF, na interferon odzivni faktor (ang. interferon response factor); ISRE, na interferon občutljiv odzivni element (ang. interferon-sensitive response element); LPS, lipopolisaharid; LBP, LPS-vezavni protein (ang. LPS-binding protein); Mal, adaptor podoben MyD88 (ang. MyD88 adaptor like); MAPK, z mitogenom aktivirana protein kinaza (ang. mitogen-activated protein kinase); MKK, z mitogenom aktivirana protein kinaza kinaza (ang. mitogen-activated protein kinase kinase); MyD88, diferenciacijski faktor 88 mieloidnih celic (ang. myeloid differentiation factor 88); NF-κB, jedrni faktor- κB (ang. nuclear factor-κB); RIP, protein, ki interagira z receptorjem (ang. receptor interacting protein); TBK1, TANK-vezavna kinaza (ang. TANK-binding kinase); TLR, receptor podoben Toll (ang. Toll-like receptor); TRAF6, faktor povezan z receptorjem za interleukin-1 tumorske nekroze (ang. tumor necrosis interleukin-1 receptor-associated factor); TRIF, adaptorska molekula, ki vsebuje TIR (ang. TIR-containing adapter molecule); TRAM, adaptorska molekula sorodna TRIF (ang. TRIF-related adapter molecule) (Fujihara in sod., 2003; Pallson-McDermott in O'Neill, 2004).

NF-κB je zgrajen iz dveh podenot (p50 in p65) in se nahaja v citoplazmi celice. Njegova N-končna domena je zelo ohranjena in je odgovorna za dimerizacijo,

asociacijo z I $\kappa$ B in vezavo na DNA. V mirujočih celicah je NF- $\kappa$ B v citoplazmi povezan z inhibitorynimi  $\kappa$ B-proteini (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  in I $\kappa$ B $\epsilon$ ) (Karin in Ben-Neriah, 2000).

### 2.10.2 Od MyD88-neodvisna signalna pot

Poizkusi na makrofagih brez MyD88 so pokazali, da po stimulaciji z LPS pride do aktivacije NF- $\kappa$ B in MAPK z zamudo oz. kasneje kot v primeru wt makrofagov (Takeda in Akira, 2004). Torej obstaja pot aktivacije, ki ne vključuje MyD88 in jo zato imenujemo od MyD88-neodvisna pot.

Odkrili so nov protein, ki vsebuje TIR-domeno in ga poimenovali TRIF ali TICAM-1. TRIF je vključen v od MyD88-neodvisno signalno pot. Veže se na TIR-domeno TLR4 in aktivira IRF3. Pride do fosforilacije IRF3 in do njegove translokacije v jedro, kar privede do izražanja IFN- $\beta$ . Ta vpliva na JAK/Tyk2 in preko njiju sledi aktivacija STAT1, ki stimulira izražanje IFN-inducibilnih genov za iNOS, IP-10 in MCP5. Z indukcijo teh genov pride po od MyD88-neodvisni poti do aktivacije NF- $\kappa$ B in MAPK (Fujihara s sod., 2003).

Obe poti sta povezani, saj v primeru pomanjkanja TRIF/TICAM-1 pride do zmanjšane proizvodnje citokinov, iz česar sledi, da sta tako od MyD88-odvisna kot tudi neodvisna pot potrebni za ustrezno izražanje citokinov (Takeda in Akira, 2004).

Na aktivacijo od MyD88-odvisne in -neodvisne signalne poti naj bi vplivala struktura endotoksina (Zughaier in sod., 2005). Zato imajo različni LPS različno biološko aktivnost, ki se kaže v afiniteti vezave LPS na LBP, CD14 in MD-2 in posledično v razlikah agregacije TIR adaptorskih proteinov in v aktivaciji transkripcijskih faktorjev ali drugih signalnih molekul navzdol od TLR4 (TRAF6, TAK1, TAB1) (Zughaier in sod., 2005).

Zanimivo je, da nekateri LPS uporabljajo poleg TLR4 tudi TLR2 receptor ali pa samo TLR2. Tak LPS je heksaacilni LPS bakterije *Neisseria meningitidis*, ki nima oblike stožca ali valja, ampak sodi nekje vmes med obe strukturi (Netea, 2002).

Interakcija endotoksina s TLR4 kompleksom, ki ima za posledico agregacijo različnih adaptorskih proteinov, naj bi bil vzrok za razlike v indukciji od MyD88-odvisne in od MyD88–neodvisne poti. Razlike v afiniteti endotoksina do TLR4 ali do MD-2, ki vodijo v različne konformacijske spremembe, naj bi povzročile nastanek bolj ali manj specifičnih vezavnih mest na TIR domeni TLR4 za posamezne adaptorske proteine. Tako naj bi potekalo uravnavanje od MyD88-odvisne in od MyD88–neodvisne signalne poti (Zughaier in sod., 2005).

Obstaja tudi druga razlaga, po kateri naj bi bilo število TLR4-MD-2 molekul agregiranih z endotoksinom različno, kar naj bi vodilo k razlikam v vezavi adaptorskih proteinov na citoplazemsko domeno TLR4 (Zughaier in sod., 2005).

Različna indukcija od MyD88-odvisne in od MyD88–neodvisne poti z endotoksinom je verjetno posledica razlik v strukturi maščobnih acilnih skupin lipida A ali v strukturi in konformaciji skupin v hidrofilni glavi lipida A (Zughaier in sod., 2005).

### 3 METODE IN MATERIALI

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije

Preglednica 3: Seznam kemikalij uporabljenih pri diplomskem delu.

<b>proizvajalec</b>	<b>kemikalije</b>
BioTools	DNA polimeraza (kataloška št. 52-0200), 10x reakcijski pufer za PCR
BioWhittaker	FBS
Fluka	DMSO
Gibco (Invitrogen)	OptiMEM® I Medium, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Trypsin-EDTA solution 1x, Lipofectamine™ 2000 (lipofektamin), RPMI 1640 + Glutamax, penicilin/streptomycin
HyCult biotechnology	HBT ELISA test kits for human IP-10
ImmunoTools	Human IL-8 ELISA kit, Human TNF $\alpha$ ELISA kit
Krka	virkon
Kemika	glicerol
Merk	etanol, metanol
New England BioLabs	100kb DNA standard
Promega	Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System
Sigma-Aldrich	ampicilin, bromfenolmodro, Tris, HEPES, agaroz, TAE, Bis-1,8- anilinonaftalensulfonat (bis-ANS), etidijev bromid, OPI Media Supplement, neesencialne AK (100x), PMA, G418 (antibiotik)

### 3.1.2 Gojišča

Preglednica 4: Seznam gojišč.

Ime gojišča	Opis gojišča
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, medij, ki vsebuje različne anorganske soli, amino kisline, vitamine, glukozo, Na-piruvat. Le-te so potrebne za optimalno rast celičnih kultur. Rdeča barva je posledica indikatorja (fenolrdeče). Gojišču za celice HEK293 sem dodal še 10 % seruma FBS.
OPTI-MEM	OptiMEM je modificiran Eagle minimalni esencialni medij, zapufran s HEPES in natrijevim bikarbonatom, z dodatkom hipoksantina, timidina, natrijevega piruvata, L-glutamina (ali Glutamaxa), elementov v sledovih ter rastnih faktorjev. Koncentracija proteinov je minimalna (15 µg/ml), z insulinom in transferinom kot edinima proteinskima dodatkom. Fenolrdeče je dodano v nizki koncentraciji kot pH-indikator. Koncentracija CaCl <sub>2</sub> je zmanjšana na 99,9 mg/l, za pripravnost pri delu s hibridomi. Gojišče sem uporabljal pri transfekciji celičnih kultur HEK293 s plazmidi.
RPMI 1640 + Glutamax	Za 1L gojišča, ki sem ga uporabljal za gojenje celične kulture MonoMac6, je bilo potrebno dodati: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 vialo OPI (oksaloacetat, piruvat, goveji insulin)</li> <li>• 20 ml raztopine neesencialnih AK (2 % v/v)</li> <li>• 10.000 U penicilin G/streptomycin</li> <li>• 100 ml FBS (10 % v/v)</li> </ul> preostali volumen je predstavljal RPMI 1640 + Glutamax.  Za diferenciacijo monocitov v makrofage sem dodal PMA v končni koncentraciji 50 ng/ml. PMA (forbol 12-miristat 13-acetat), sinonima sta 12-O-tetradekanoilforbol 13-acetat in 4β, 9α, 12β, 13α, 20-pentahidroksitiglia-1,6-dien-3-one 12-tetradekanoat 13-acetat. Formula molekule je C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>8</sub> . Molekulska teža je 616.83 Da.
LB	Luria-Bertani (LB) je tekoče gojišče Sestava: hidrolizat kazeina (10 g/l), kvasni ekstrakt (5 g/l), NaCl (10 g/l), pH 7,0 z NaOH.  Za pripravo trdnega gojišča smo pred avtoklaviranjem dodali 15 g agarja na liter gojišča LB, avtoklavirali, ohladili na 60°C in dodali ampicilin do končne koncentracije 100 µg/ml. Nato smo gojišče vlili na plošče. LBA gojišče: V sterilno gojišče LB dodamo ampicilin do končne koncentracije 100 µg/ml.
TB	Terrific Broth (TB) je tekoče gojišče. Sestava: kazein (12 g/L), kvasni ekstrakt (24 g/L), dikalijev fosfat (9,4 g/L), kalijev fosfat (2,2 g/L). TB (47,6 g) + glicerol (8 ml) + voda (do 1000ml).
PBS	PBS smo uporabili za spiranje celic. Sestava: NaCl (100 g), KCl (2,5 g), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (14,4 g), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2,5 g).

### 3.1.3 Lipopolisaharidi

Pri diplomskem delu smo uporabili LPS, ki so navedeni in opisani v preglednicah 8, 9 in 10.



Preglednica 5: Opis LPS.

Izvor LPS	Oznaka	Sev bakterije	Opis
<b><i>Brucella</i></b>			
<i>B. abortus</i>	Ba-187 (slika 5)	<i>B. abortus</i> 2308 (37°C)	sLPS, prevladujeta heksaacilna lipida A, različnih molekulskih mas; 2101,6 in 2079,7 Da.
<i>B. melitensis</i>	Ba-046 (slika 5)	<i>B. melitensis</i> 16M (37°C)	sLPS, lipid A podoben lipidu A <i>B. abortus</i> .
<b><i>Escherichia</i></b>			
<i>E. coli</i>	Ec-003 (slika 7)	<i>E. coli</i> MLK53; htrB (lauroil-transeferaza) mutantni sev (htrB1::Tn10). (Tetra-R).	rLPS, pentaacilni lipid A (1615,1 Da).
<i>E. coli</i>	Ec-004	<i>E. coli</i> MLK1067; msbB (miristoil- transferaza) mutantni sev (msbB1::*Cam)	rLPS, več kot 90 % pentaacila (1587,0 Da), tetraacil v sledovih (slika 7).
<i>E. coli</i>	Ec006 (slika 7)	<i>E. coli</i> MLK986; msb-, htrB-, dvojna mutanta (MLK53msbB1:: *Cam)	rLPS, 29 % pentaacila (1643,0 Da), 54 % tetraacila (1404,8 Da), 17 % triacila (1178,6).
<b>Sintetični lipid A</b>			
	506 (slika 3)		rLPS, večinoma heksaacilni lipid A.
<b><i>Ochrobactrum</i></b>			
<i>O. anthropi</i>	Oa-001 (slika 6)	<i>O. anthropi</i> LMG 3331	sLPS, heksaacilni lipid (2101,6 Da).
<b><i>Salmonella</i></b>			
<i>S. abortus</i> Equi HL83	Sa-LPS (slika 7)		Heptaacilni sLPS.
<b><i>Yersinia</i></b>			
<i>Y. pestis</i>	Yp-001 (slika 7)	<i>Y. pestis</i> KIM	26° C rLPS, 9 % heksaacila (1797,2 Da), 10 % pentaacila, 40 % tetraacila (1404,8 Da), 7 % arabinozamin-tetraacila (1535,9 Da), 30 % triaacila (1178,6 Da).
<i>Y. enterocolitica</i>	Ye3-002 (slika 7)	<i>Y. enterocolitica</i> O:3 WE245/92	26° C sLPS, 9 % heptaacil, 54 % heksaacila (1795,0 Da), 11 % arabinozamin-heksaacila (1928,3 Da), 18 % tetraacila (1404,8 Da).
<i>Y. enterocolitica</i>	Ye3-003 (slika 7)	<i>Y. enterocolitica</i> O:3 WE245/92	37° C sLPS, 33 % heksaacilni, 11 % pentaacilni, 34 % tetraacilni.

Sa-LPS je bilo darilo dr. Klaus Brandenburg (Forschungszentrum Borstel, Nemčija), ostale LPS je podarila Moriyon Ignacio iz Univerze v Pamploni.

Preglednica 6: Sestava LPS iz sevov *E. coli*, ki sta rasla pri 26 °C oziroma 37 °C.

Stopnja acilacije lipida A	Formula	Sestava lipidov A			
		Ec-004 iz seva MLK1067 (msbB1-) pri 37 °C*		Ec-006 iz seva MLK986 (htbr1-, msbB1-) pri 26 °C*	
		M <sub>w</sub>	%	M <sub>w</sub>	%
Triacil	C <sub>55</sub> H <sub>106</sub> N <sub>2</sub> O <sub>20</sub> P <sub>2</sub>			1176,5	16,7
Tetraacil	C <sub>67</sub> H <sub>128</sub> N <sub>2</sub> O <sub>21</sub> P <sub>2</sub>	1358,8	8,3		
	C <sub>69</sub> H <sub>132</sub> N <sub>2</sub> O <sub>22</sub> P <sub>2</sub>			1402,74	54,2
Pentaacil	C <sub>81</sub> H <sub>154</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub> P <sub>2</sub>	1584,9	91,7		
	C <sub>85</sub> H <sub>162</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub> P <sub>2</sub>			1640,92	29,1

\*Temperatura gojenja bakterijskega seva; M<sub>w</sub> je molekulska masa.

Preglednica 7: Podroben opis LPS sevov jersinij.

Stopnja acilacije lipida A	Formula	Sestava lipidov A pri bakterijah:					
		<i>Y. enterocolitica</i> 0:3 WE245/92				<i>Y. pestis</i> KIM	
		Rast pri 22 °C		Rast pri 37 °C		Rast pri 26 °C	
		M <sub>w</sub>	%	M <sub>w</sub>	%	M <sub>w</sub>	%
Triacilni	C <sub>55</sub> H <sub>106</sub> N <sub>2</sub> O <sub>20</sub> P <sub>2</sub>					1176,3	29,8
Tetraacilni	C <sub>69</sub> H <sub>131</sub> N <sub>2</sub> O <sub>18</sub> P					1306,1	5,6
	C <sub>67</sub> H <sub>128</sub> N <sub>2</sub> O <sub>21</sub> P <sub>2</sub>					1358,2	3,4
	C <sub>69</sub> H <sub>132</sub> N <sub>2</sub> O <sub>21</sub> P <sub>2</sub>			1386,1	28,2		
	C <sub>69</sub> H <sub>132</sub> N <sub>2</sub> O <sub>22</sub> P <sub>2</sub>	1402,1	18,0	1402,1	5,8	1402,1	23,5
	C <sub>74</sub> H <sub>141</sub> N <sub>3</sub> O <sub>25</sub> P <sub>2</sub> (AraN)*					1533,0	7,1
Skupaj			18,0		34,0		39,6
Pentaacilni	C <sub>81</sub> H <sub>154</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub> P <sub>2</sub>			1583,9	2,5	1584,0	3,1
	C <sub>83</sub> H <sub>158</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub> P <sub>2</sub>			1613,5	4,9		
	C <sub>88</sub> H <sub>167</sub> N <sub>3</sub> O <sub>26</sub> P <sub>2</sub>			1743,7	3,8		
Skupaj			0,0		11,2		3,1
Heksaacilni	C <sub>93</sub> H <sub>176</sub> N <sub>2</sub> O <sub>24</sub> P <sub>2</sub>	1765,8	6,9	1765,8	4,3	1765,8	0,6
	C <sub>95</sub> H <sub>180</sub> N <sub>2</sub> O <sub>24</sub> P <sub>2</sub>	1793,8	24,0	1793,8	23,1	1793,8	2,3
	C <sub>97</sub> H <sub>184</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub> P <sub>2</sub>	1809,7	11,5	1809,7	5,8		
	C <sub>100</sub> H <sub>189</sub> N <sub>3</sub> O <sub>27</sub> P <sub>2</sub> (AraN)*	1925,5	11,1				
Skupaj			53,5		33,2		2,9
Nedefiniran		2151,2	8,9	2151,2	5,8		

\*amino-arabinoza

### 3.1.4 Plazmidi

Čprav smo uporabljali različne plazmidne sisteme za izražanje proteinov v HEK 293 celicah, so imeli nekatere skupne lastnosti:

- determinanto za odpornost proti antibiotiku, kar je omogočilo selekcijo bakterijskih transformant;
- ori mesto za pomnoževanje plazmida v *E. coli*;
- element za pomnoževanje plazmida v sesalčjih celicah (ARS: ang. autonomously replicating sequence);
- promotor za začetek prepisovanja in poli A signal za konec prepisovanja inserta v sesalskih celicah;
- druga mesta potrebna za gensko manipulacijo.

Preglednica 8: Pregled plazmidov uporabljenih pri diplomskem delu.

Plazmidni sistem	Kodira	Promotor	Rezistenca na	Vir
pCD14	CD14	neprestano aktiviran	ampicilin	Carsten Kirsching*
pEF-BOS	MD-2	neprestano aktiviran	ampicilin	Carsten Kirsching*
pFLAG	TLR4	neprestano aktiviran	ampicilin	Carsten Kirsching*
pELAM-1	luciferazo iz kresničke <i>Photinus pyralis</i>	od NF- $\kappa$ B odvisen	ampicilin	Carsten Kirsching*
pRL-TK	luciferazo iz mehkužca <i>Renilla reniformis</i>	neprestano aktiviran	ampicilin	Promega
pISRE-LUC	luciferazo iz kresničke <i>Photinus pyralis</i>	od IFN odvisen	ampicilin	BD Clonetech
pDNMyD88	dominantno negativno mutanto gena MyD88	neprestano aktiviran	zeocin	InVivoGen
pRK5	prazen plazmid		ampicilin	Carsten Kirsching*

\*Technische Universität München, Nemčija

### 3.1.5 Celične kulture

#### Bakterijska kultura *E. coli* DH5 $\alpha$

*E. coli* DH5 $\alpha$  iz zbirke kultur na Kemijskem inštitutu.

Genotip: F<sup>-</sup>,  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda^-$ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

#### Sesalčji celični kulturi HEK293 in HEK293 #BF1 TLR4

Uporabljali smo celični kulturi HEK 293 (ang. human embryonic kidney) in HEK293 #BF1 TLR4, ki izhajata iz ledvičnih celic človeškega zarodka, transformiranih z DNA človeškega adenovirusa tipa 5 (Ad5). Celična linija HEK 293 #BF1 TLR4, je linija HEK 293, ki stabilno izraža receptor TLR4.

Celice so zelo občutljive na človeške adenoviruse, astroviruse in adenovirusno DNA. Imajo kontaktno inhibicijo in rastejo samo na stiku s površino (adherentna celična linija). V stekleničkah prerastejo dno in se nanj pritrdijo v monosloju. Celice na površini ne izražajo receptorjev TLR4, vendar imajo vse znotrajcelične proteine, ki sodelujejo pri omenjenih signalnih poteh.

Celična kultura HEK293 je bila darilo inštituta Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Technische Universität München (Nemčija).

**Celična kultura Mono Mac 6 (MM6)**

Celična linija monocitov imenovana Mono Mac 6 izvira iz periferne krvi pacienta z monoblastno levkemijo. Izolirana sta bila dva kloni: Mono Mac I in Mono Mac II, ki sta na podlagi ugotovljenih morfoloških, citokemijskih in imunoloških kriterijev monocitnega izvora. MM6 je edina celična linija, ki neprestano izraža fenotipske in funkcionalne lastnosti zrelih monocitov. Celice se ne pritrjajo na dno, ampak plavajo v gojišču (suspenzijska celična linija). Celična kultura se nahaja v ATCC (American Type Culture Collection) zbirki.

### 3.1.6 Laboratorijska oprema

Preglednica 9: Seznam laboratorijske opreme uporabljene pri diplomskem delu.

<b>proizvajalec</b>	<b>laboratorijska oprema</b>
BD Falcon	epruvete za pretočni citometer
Beckman Coulter	pretočni citometer z možnostjo sortiranja celic
Bender MedSystems	program FlowCytomix 1.0, FlowCytomix Multiplex human Th1/Th2 10plex Kit I
Berthold Technologies	Mithras LB 940 – čitalec mikrotitrskih plošč
Binder	inkubator za tkivne kulture (CO <sub>2</sub> )
BioRad	aparatura za gelsko elektroforezo "Mini-Protean II"
BioSciences	BD <sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit I
Blau Brand	Bürkel-Türk hemocitometer
Eppendorf	avtomatske pipete P-10, P-20, P-100, P-200, P-1000, P-5000, epruvete (600 µl, 1500 µl in 2000 µl ), namizna mini centrifuga
Hellma Suprasil	steklene kivete za spektrofotometer
Hettich	centrifuga Universal 32 R
HP	spektrofotometer
Iskra	pH - meter
Kambič	parni sterilizator
New Brunswick	stresalnik za bakterijske kulture Innova 4230
Olympus	mikroskop "CX41"
Perkin Elmer Instruments	spektrofotometer LS 50, program FL WINLAB, verzija 4.00.02
PerkinElmer	bele mikrotitrerske ploče s 96 luknjicami in prozornim dnom (Wallac Isoplate TC)
Promega	Dual-luciferase Reporter 1000 Assay System
Qiagen	vakumska črpalka (Qiavac 96 Vacuum Regulator)
Sartorius	tehtnica "Analytic A200S"
Sigma-Aldrich	GenElute <sup>TM</sup> Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit
Sorval	centrifuga
Sutjeska	inkubator, vodna kopel
Tehtnica	tehtnica, vibracijsko mešalo
VenorGeM	Mycoplasma detection kit for conventional PCR (kit za detekcijo mikoplazem z običajno PCR reakcijo)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Sterilizacija opreme in gojišč

Gojišča, steklovino in plastiko, ki smo jih uporabljali pri delu s celicami, smo predhodno sterilizirali z avtoklaviranjem 20 min pri  $1,2 \cdot 10^5$  Pa in  $121^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2 Gojenje in vzdrževanje celičnih kultur

#### Celični kulturi HEK293 in HEK 293 #BF1 TLR4

Celični kulturi smo gojili v gojitvenem mediju, ki je bil sestavljen iz DMEM z dodatkom fetalnega govejega seruma (FBS) v končni koncentraciji 10 % (v/v).

Celice HEK 293 #BF1 TLR4 je potrebno gojiti v prisotnosti antibiotika G418 (gentamicin) (0,5 mg/ml), da ne izgubijo informacije o receptorju TLR4 (stabilna transformacija). Zaradi dodanega antibiotika celice na ploščah rastejo počasneje od linije HEK293.

Celični kulturi HEK293 in HEK293 #BF1 TLR4 smo hranili v FBS z 10 % DMSO v tekočem dušiku. Celice smo odtalili in jim dodali 9 ml gojišča DMEM z 10 % FBS in centrifugirali 5 min pri 1200 rpm ter odpipetirali gojišče z DMSO, tako da smo odstranili čim manj celic, ki so se usedle na dno centrifugirke. Celicam smo dodali 5 ml gojišča DMEM z 10 % FBS, dobro premešali s pipeto ter prenesli v male stekleničke za gojenje celičnih kultur. Celice smo gojili v inkubatorju pri  $37^\circ\text{C}$  v prisotnosti 5 % ogljikovega dioksida. Ob 90 % preraščenosti dna s celicami smo jih prenesli v velike stekleničke. Preden smo začeli celice uporabljati, so morale celice prerasti več kot 90 % dna stekleničke.

#### Celična kultura MM6

Celično kulturo MM6 smo gojili v gojitvenem mediju RPMI 1640, kateremu je bil dodan FBS v končni koncentraciji 10 % (v/v), OPI (ena viala za 1 L medija), neesencialne AK (končna koncentracije je 2 % v/v), penicilin in streptomycin (končna koncentracije je 100 U/ml).

Pred stimulacijo z LPS smo celični liniji MM6 zamenjali gojišče brez antibiotika. Za diferenciacijo v monocite smo dodali PMA (50 ng/ml). Takoj zatem ali po 24-urni inkubaciji smo dodali LPS in nadaljevali kot je opisano spodaj (ugotavljanje koncentracije citokinov).

Stekleničke smo hranili pokončno v vlažnem inkubatorju pri temperaturi  $37^\circ\text{C}$  in 5 %  $\text{CO}_2$  atmosferi.

#### Odlepljanje celic s podlage

Iz stekleničke s pritjenimi celicami smo odpipetirali gojišče DMEM in nato celice dvakrat sprali s 5 ml PBS-ja. Dodali smo 3 ml tripsina in počakalo toliko časa, da so se celice odlepili s podlage. Nato smo tripsin nevtralizirali s 5 ml gojišča DMEM. Celice

smo odpipetirali v centrifugirko in odstranili supernatant po 5 minutnem centrifugiranju pri 1200 obr./min. Pelet celic smo resuspendirali v DMEM + 10 % FBS. Po okoli desetih presaditvah (približno 2 meseca) smo celično kulturo zavrgli in vzeli novo.

Celice HEK293 #BF1 TLR4 se slabše pritrjujejo na podlago in jih zato zlahka odlepimo s curkom iz pipete. To smo naredili, tako da smo s pipeto posrkali gojišče in brizgnili gojišče po pritrjenih celicah, ki so se pod curkom iz pipete odlepile. Postopek smo večkrat ponovili, dokler se niso odlepile vse celice. Gojišče s celicami smo posrkali v pipeto in dali v svežo centrifugirko, ter nadaljevali kot pri tripsinizaciji.

### **Štetje celic in prenos na plošče za testiranje**

Celice smo v centrifugirki centrifugirali 5 min pri 1200 rpm. Nato smo odstranili gojišče. Glede na količino celic smo dodali 2 do 4 ml gojišča in celice dobro resuspendirali. Na hemocitometer smo prenesli 10  $\mu$ l suspenzije. S pomočjo svetlobnega mikroskopa in mreže na hemocitometru, smo prešteli celice v treh kvadratih ter izračunali povprečje. Število, ki smo ga dobili, smo pomnožili z  $10^4$ . Dobljen rezultat predstavlja število celic v 1 ml gojišča.

V vsako luknjico mikrotiterske plošče s 96 luknjicami smo dodali  $6 \times 10^4$  celic ter dopolnili z gojiščem do 100  $\mu$ l. Celice so v tem času prerasle luknjice.

### **Trajno shranjevanje celičnih kultur HEK293 IN HEK #BF1 TLR4**

Celice smo gojili v velikih stekleničkah, da so dosegle 100 % konfluentnost. Nato smo celice tripsinizirali in centrifugirali. Odstranili smo gojišče in usedlino resuspendirali v 3 ml FBS, ki je imel dodan DMSO v končni koncentraciji 10 odstotkov. Tako pripravljene celice smo razdelili v 3 krioevice po 1ml in jih za en teden shranili na  $-80^{\circ}\text{C}$ , nato smo jih prestavili v tekoči dušik. Pri pripravi celic za trajno shranjevanje smo uporabili celice, ki so bile presejane le nekajkrat. S tem smo zmanjšali verjetnost vnosa mutacij, ki bi lahko vplivale na potek eksperimentalnega dela.

## **3.2.3 Pridobivanje plazmidne DNA**

### **Transformacija**

Za vnos rekombinantnega plazmida v bakterijske celice smo uporabili metodo s toplotnim šokom. Kompetentne celice *E. coli*, ki so bile shranjene pri  $-80^{\circ}\text{C}$ , smo odmrznili na ledu. Suspenziji celic smo dodali 0,5  $\mu$ L ( $\approx$  5-10 ng) plazmidne DNA in inkubirali 25 minut na ledu. Vmes smo transformacijsko zmes nekajkrat premešali. Sledil je temperaturni šok kompetentnih celic za 90 sekund pri temperaturi  $42^{\circ}\text{C}$  in inkubacija na ledu za 5 minut. Celicam smo dodali 500  $\mu$ L gojišča LB in stresali 1 uro pri  $37^{\circ}\text{C}$ , 150 rpm. 250  $\mu$ L in 50  $\mu$ L celic smo nato razmazali na plošče LBA (LB z dodanim ampicilinom) in jih inkubirali preko noči pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Na ploščah so zrastle kolonije bakterij, ki so prejele plazmidni vektor z determinanto na odpornost proti ampicilinu.

### **Izolacija plazmidne DNA**

Bakterijsko kulturo z želenim plazmidom smo nacepili v 40 ml gojišča LB, oziroma v 25 ml gojišča TB. Celice smo pustili rasti preko noči pri  $37^{\circ}\text{C}$  pri 180 rpm.

Izolacijo plazmidov (brez prisotnosti endotoksina) smo izvedli s kitom Genelute endotoxin-free plasmid midiprep kit. V primerjavi z ostalimi kiti za izolacijo plazmidne DNA, vsebuje ta kit še dodaten korak, s katerim odstranimo LPS, ki se je sprostil pri lizi bakterij. Postopek je prikazan v preglednici 10.

Preglednica 10: Potek izolacije plazmida.

liziranje bakterij	Prekonočno kulturo smo centrifugirali 10 min pri 3000 g - 5000 g in supernatant zavrgli.
	Dodali smo 1,2 ml resuspenzijske raztopine, ki vsebuje RNAzo A in naredi raztopino homogeno.
	Dodali smo 1,2 ml raztopine za lizo in epruveto nekajkrat obrnili, da se je premešala. Nato smo mešanico inkubirali pri sobni temperaturi manj kot 5 min.
priprava lizata	Dodali smo 0,8 ml nevtralizacijske raztopine in dobro zmešali z rahlim obračanjem.
	Centrifugirali smo 15 min pri 15 000 g in čist lizat prenesli v 15 ml centrifugirko.
odstranjevanje endotoksina	Dodali smo 300 µl raztopine za odstranjevanje endotoksina in dobro premešali, ter epico takoj prenesli na led za 5 ali več minut.
	Mešanico smo nato ogreli v vodni kopeli pri 37°C. Po 5 min smo jo dali centrifugirati za 5 min pri 3000g - 5000g.
	Zgornjo plast smo prenesli v čisto centrifugirko in zavrgli modro spodnjo plast. Proces odstranjevanja endotoksina smo ponovili še enkrat.
priprava DNA - vezavne kolone	Dodali smo 3 ml raztopine za pripravo kolone in centrifugirali 1 - 2 min pri 3000 g - 5000 g. Raztopino smo zavrgli.
vezava plazmida na kolono	Dodali smo 0,8 ml DNA vezavne raztopine zgornji plasti in dobro premešali.
	Lizat smo prenesli v pripravljeno vezavno kolono z zbiralno centrifugirko in centrifugirali 1 - 2 min pri 3000g - 5000 g. Preostalo raztopino smo zavrgli.
odstranitev kontaminante	Na kolono smo dodali 2 ml raztopine za dodatno spiranje in jo centrifugirali 2 min pri 3000 g - 5000 g. Ostanek raztopine smo zavrgli.
	Dodali smo 3 ml raztopine za spiranje na kolono in centrifugirali 5 min pri 3000 g - 5000 g.
eluiraj očiščeno plazmidno DNA	Kolono smo prenesli v svežo centrifugirko.
	Dodali smo 1 ml vode, ki ne vsebuje endotoksina in centrifugirali 3-5 min pri 3000 g - 5000 g.

### Določanje koncentracije nukleinskih kislin

Koncentracijo plazmidne DNA smo določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 260 in 280 nm. Pri tem smo upoštevali, da raztopina z absorbanco 1 pri 260 nm vsebuje 50 µg/ml dvovertične DNA. Razmerje  $A_{260}:A_{280} = 1,7 - 1,9$  pove, da so pripravljene vzorci čisti, brez proteinskih primesi. Nečistoče, kot so na primer



kemikalije in proteini, ne samo da zmanjšajo uspešnost transfekcije, ampak so lahko tudi toksične za celice.

### 3.2.4 Določanje aktivnosti MD-2/TLR4 kompleksa

#### Transfekcija

En dan pred transfekcijo smo celice HEK293 in HEK293 #BF1 TLR4 nacepili v mikrotitrsko ploščo tako, da je bilo v eni luknjici v 100  $\mu$ L DMEM suspendiranih 600 000 celic. Na dan transfekcije so celice dosegle 95 % konflueno.

Za transfekcijo smo uporabili na posamezno luknjico naslednje količine plazmidov: 50 ng pEF-BOS-hMD-2, 50 ng pDNMyD88, 80 ng pELAM-1-LUC, 80 ng pISRE-LUC, 5 ng pRL-TK in ustrezno količino pRK5. DNA se je vezala na lipofektamin. DNA in lipofektamin (0,5  $\mu$ L/luknjico) smo vsakega posebej najprej razredčili v 25  $\mu$ L gojišča OptiMEM I in inkubirali pri sobni temperaturi 5 min. Po inkubaciji smo obe redčini združili in pustili 20 min pri sobni temperaturi, da so se tvorili lipofektamin-DNA kompleksi. 50  $\mu$ L transfekcijske mešanice smo dodali v posamezno luknjico s celicami. Ploščo smo z nežnimi premiki premešali in inkubirali preko noči.

#### Priprava LPS in stimulacija celic z LPS

LPS smo zatehtali in raztopili v 2 mM HEPES pH 7.2, tako da je bila končna koncentracija 0,5 mg/ml. Agregate smo razbili, tako da smo raztopljen LPS stresali na vorteksu 15 minut pri 56 °C. Potem smo ga ohladili na 4 °C in celoten postopek trikrat ponovili. Ta postopek povzroči dobro disperzijo LPS zaradi večkratnega faznega prehoda agregatov. Vzorce LPS smo hranili v hladilniku. Po preteku dveh dni smo postopek razbijanja agregatov ponovili.

Po inkubaciji smo transfekcijsko mešanico (150  $\mu$ L) zamenjali s 100  $\mu$ L DMEM z 2 % FBS. V posamezno luknjico smo nato dodali LPS v koncentraciji 100 ng/ml in ploščo prenesli v vlažni inkubator.

#### Merjenje luciferazne aktivnosti

Uporabljali smo encim luciferazo, ki se v celici izraža zaradi dodanega promotorja, ki se posredno aktivira z LPS. Količina sintetizirane kresničkine luciferaze je odvisna od stopnje aktivacije celic, semikvantitativno pa jo lahko določimo z merjenjem sproščene svetlobe ob dodatku substrata, ki ga cepi. Ker uspešnosti transfekcije in števila celic ni mogoče optimizirati, se dobljene rezultate luciferaze normalizira še z drugim reporterskim sistemom, katerega izražanje v celicah je neodvisno od poskusa. To določimo s pomočjo *Renilla*-luciferaze. Enako kot v primeru za kresničkino luciferazo, *Renilla*-luciferazo določimo z merjenjem sproščene svetlobe ob dodatku substrata, ki ga cepi. Dodajanje substrata in spremljanje luminiscence je potekalo avtomatsko na bralcu plošč Mithras.

Celicam smo po inkubaciji previdno odstranili gojišče in dodali 20  $\mu$ L lizatnega pufra. Za maksimalno lizo celic smo ploščo dali še za 1 uro na -20 °C. Preden smo pričeli z merjenjem bioluminiscence smo mikrotitrsko ploščo segreli na sobno temperaturo. Meritve so bile izvedene na Mithras LB 940 (Berthold Technologies), ki omogoča avtomatično dodajanje substratov. Avtomat je najprej v luknjico injiciral 50  $\mu$ L

reagenta za kresničkino luciferazo, počakal 2 sekundi in 1 sekundo meril oddani svetlobni signal. Po končanem kvantifikaciji kresničkine luciferazne aktivnosti je bil 60 s dolg zamik preden je stroj začel dodajati 50  $\mu\text{L}$  Stop & Glo reagenta. Ta reagent je prekinil delovanje kresničkine luciferaze in hkrati aktiviral *Renilla* luciferazo. Po dodatku reagenta je bil zamik dolg 2 s preden je za 0,5 s naprava zbirala oddani signal. Vsi omenjeni reagenti so bili del Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System kompleta. Temperatura aparata je bila med meritvami od 25 do 30  $^{\circ}\text{C}$ .

### Izračun relativne luciferazne aktivnosti (RLA)

Vrednost izmerjene emitirane svetlobe zaradi reakcije substrata s kresničkino luciferazo za določen poskus smo delili z vrednostjo emitirane svetlobe zaradi reakcije substrata z *renilla* luciferazo za isti poizkus.

Izračuni relativne luciferazne aktivnosti, standardne deviacije in izris diagramov je bil narejen s programom Microsoft Excel.

## 3.2.5 Ugotavljanje vezave spojin na MD-2

### 3.2.5.1 Priprava proteina MD-2

Rekombinantni protein MD-2 je bil pridobljen v bakteriji *E. coli* in izoliran v inkluzijskih telescih ter očiščen s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC). Postopek je opravila dr. Mateja Manček Keber. Ko smo potrebovali protein MD-2, smo v vsako mikrocentrifugirko s posušenim proteinom dodali 150  $\mu\text{l}$  vode. Mikrocentrifugirke smo 2 min vorteksirali in nato vsebino združili, prenesli v dializno vrečko ter jih dializirali prek noči pri 4 $^{\circ}\text{C}$  proti milliQ vodi. Naslednji dan smo protein prenesli v mikrocentrifugirko ter centrifugirali 10 min pri 14.000 rpm. Oborjeni del proteina smo zavrgli, raztopljeni protein pa prenesli v svežo mikrocentrifugirko.

### 3.2.5.2 Določanje koncentracije MD-2

Najprej smo izračunali relativno vrednost absorbance ( $A$ ) pri 280 nm, tako da smo od absolutne vrednosti absorbance pri 280 nm odšteli absolutno vrednost absorbance pri 320 nm. Koncetracijo ( $c$ ) smo nato izračunali iz relativne absorbance in molarne ekstincijskega koeficienta ( $\epsilon = 1,065 \frac{L}{g \text{ cm}}$ ) za MD-2 pri 280 nm po formuli:

$$c = \frac{A}{l \times \epsilon} \quad \dots$$

(1)

Oznaka  $l$  pomeni premer kivete, ki je enak 1 cm.

### 3.2.5.3 Priprava bis-ANS

V 5 mikrocentrifugirko smo zatehtali bis-ANS in ga raztopili v 100  $\mu$ l etanola. Mikrocentrifugirko smo hitro zavili v aluminijasto folijo, ker fluorescenčne spojine izredno hitro razpadejo na svetlobi in raztopino vorteksirali dokler ni bila homogena. Nato smo raztopino centrifugirali 5 min pri 13.000 rpm in vse razen usedline prenesli v novo mikrocentrifugirko.

Izmerili smo vrednost absorbance (A) pri valovni dolžini 385 nm, ki je značilna za bis-ANS, ter s pomočjo podanega molarne absorpcijskega koeficienta ( $\epsilon=16\,790\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ ) izračunali koncentracijo (c) po formuli (1).

### 3.2.5.4 Priprava Pluronic F127

Zatehtali smo 1 g surfaktanta Pluronic F127 v epruveto in dolili do 10 ml vode. Epruveto smo dali na grelnik z vorteksom za 1 uro, da se je surfaktant popolnoma raztopil.

### 3.2.5.5 Ugotavljanje vezave bis-ANS na MD-2 ob prisotnosti P175

Vezavo bis-ANS smo spremljali na osnovi spremembe intenzitete fluorescence, ki jo spojina oddaja v hidrofobnem okolju. Ekscitacijska valovna dolžina bis-ANS je namreč pri 385 nm, emisijski maksimum pa med 420 in 550 nm.

Uporabljali smo Perkin Elmerjev spektrofotometer LS55 in priloženo programsko opremo (FLWinLab2).

10 % (w/v) raztopini Pluronic P175 smo dodali raztopino MD-2, tako da je bila končna koncentracija MD-2 50 nM. Najprej smo s spektrofotometrom izmerili fluorescenco Pluronic P175 in MD-2 skupaj in nato smo dodajali vedno višje koncentracije bis-ANS in vmes merili porast fluorescence pri 20 °C.

### 3.2.5.6 Ugotavljanje vezave bis-ANS na MD-2 ob prisotnosti LPS Ba-187

Raztopini MD-2 (200 nM) in bis-ANS (200 nM) v milliQ vodi smo dodajali vedno večje koncentracije Ba-187 in vmes merili spremembo jakosti fluorescence na fluorimetru. Pred vsakim dodatkom LPS smo počakali, da se je fluorescenca ustalila. Glede na razliko jakosti fluorescenc kontrole in višjih koncentracij LPS smo lahko ugotovili, ali še prihaja do oviranja vezave bis-ANS na MD-2.

## 3.2.6 Merjenje koncentracij citokinov (IP-10, TNF $\alpha$ , IL-8) z ELISA testom

Celice HEK293 smo pripravili in stimulirali z različnimi LPS kot je bilo opisano zgoraj. Po 24 urah smo iz luknjic mikrotiterske plošče previdno prenesli supernatant

(razen pritrjenih celic) v sveže mikrocentrifugirke in centrifugirali 30 sekund pri 13.000 rpm. Supernatante vzorcev in standarde smo preneseli v luknjice mikrotiterske plošče, ki je bila priložena ELISA kitu. V luknjicah mikrotiterske plošče so že bila vezana protitelesa proti analitu oziroma citokinu. V času enourne inkubacije so se citokini vezali na protitelesa. Nato smo nevezani material sprali s pufrom za spiranje. V naslednjem koraku smo v luknjice dodali biotinizirano protitelo proti citokinu, ki se je vezalo na že ujete citokine. Čas inkubacije je bil 1 h. Prebitek protiteles smo sprali s pufrom za spiranje. Nato smo v luknjice dodali streptovidin-peroksidazne konjugate, ki so specifično reagirali z biotiniziranimi protitelesi in ponovno plošče inkubirali za 1h. Prebitek konjugatov smo sprali s pufrom za spiranje. V zadnjem koraku smo dodali substrat, ki je tetrametilbenzidin (TMB) in mikrotitersko ploščo inkubirali v temi 20 do 30 minut oziroma toliko časa, da se je razvila barva. Encimsko reakcijo smo nato ustavili z dodatkom citronske kisline. S spektrofotometrom smo zmerili absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

S podatki absorpcijskih vrednosti standardov z določenimi koncentracijami smo izrisali umeritveno krivuljo in iz nje odčitali koncentracije merjenih analitov.

Absorbanco vidno obarvanih vsebin luknjic sem meril s Perkin Elmerjevim spektrofotometerom LS55.

### **3.2.7 Merjenje koncentracije citokinov s pretočnim citometrom**

#### **3.2.7.1 Opis pretočne citometrije**

Pretočna citometrija je analizna metoda, ki omogoča ločevanje različnih delcev na podlagi velikosti in barve. Mi smo ugotavljali prisotnost več različnih molekul hkrati, kar imenujemo multipleksing. Pri tej metodi uporabimo serijo kroglic z različnimi jakostmi fluorescence, ki jih zaznava detektor fluorescence v pretočnem citometru.

Kroglice s vezanimi citokini v suspenziji potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe. Svetlobni žarek, ki zadane ob kroglico, se odbije, lomi, ali pa se absorbira v fluorokromih, ki nato oddajajo svetlobo daljše valovne dolžine. Sipano in lomljeno svetlobo detektirata senzorja FSC in SSC, ki sta primerna predvsem za opazovanje celic in njihovih lastnosti. Fotodetektor FSC (ang. Forward Scatter) detektira svetlobo, ki jo delec sipa v smeri laserskega žarka in količina sprejete svetlobe je povezana z velikostjo delca. Fotodetektor SSC (ang. Side Scatter) detektira razpršeno svetlobo pravokotno od smeri laserskega žarka, količina prejete svetlobe je povezana z granularnostjo. Poleg fotodetektorjev FSC in SSC ima pretočni citometer tudi detektorje za fluorescenco, ki merijo svetlobo večjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe. S takšnim detektorjem je citometer razločeval med posameznimi serijami kroglic. Detektor preko sistema filtrov in zrcal prejme svetlobo določene valovne dolžine in izmeri signal, ki ga oddaja fluorokrom. Fotodetektorji pretvorijo svetlobne signale v električne, ki jih izmerimo, obdelamo z ustreznimi računalniškimi programi in prikažemo z grafikoni.

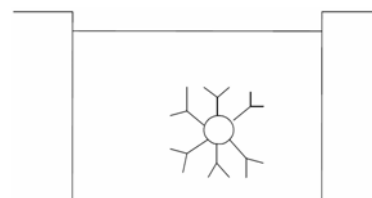
Glavni sestavni deli pretočnega citometra so: vir svetlobe, pretočni sistem za regulacijo toka nosilne tekočine skozi ustrezno svetlobo, optični sistem za fokusiranje in

usmerjanje svetlobe, elektronika, ki omogoča merjenje intenzitete svetlobnega signala in spreminjanje svetlobnega signala v električnega ter računalniški sistem z ustreznimi programi za analizo dobljenih podatkov.

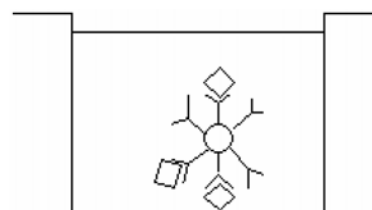
### 3.2.7.2 Priprava in stimulacija celic MM6

Celice MM6 smo iz stekleničke prestavili v centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 1200 rpm. Odstranili smo gojišče in nato smo jim dodali medij in jih prešteli s pomočjo hemocitometra. V vsako luknjico na mikrotiterski plošči smo dodali 100 000 celic in dodali medij do 100  $\mu$ L. Nato smo v vsako luknjico dodali tudi PMA, tako da je bila končna koncentracija 50 ng/ml. PMA omogoči diferenciacijo monocitov v makrofage. Sledil je dodatek (takoj ali po 24 urah) ustreznega LPS v koncentracijah 100 ng/ml, 200 ng/ml ali 500 ng/ml.

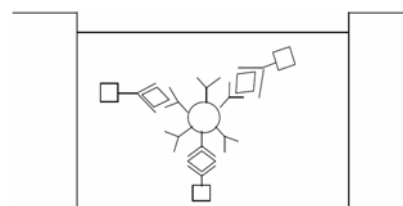
Slika 12 a: Na mikrokroglice so vezana protitelesa, ki specifično reagirajo z molekulami oz. citokini v vzorcu. Takšne kroglice lahko ločujemo na podlagi velikosti in njihovega svetlobnega spektra.



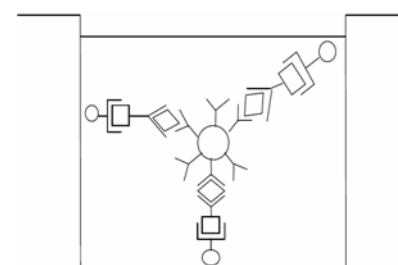
Slika 12 b: Različne kroglice z vezanimi protitelesi, specifičnimi za določeno molekulo oz. citokin zmešamo in to mešanico, inkubiramo z vzorcem ali standardno mešanico. Citokini v vzorcu se vežejo na protitelesa, ki so adsorbirana na fluorescirajoče kroglice.



Slika 12 c: Nato dodamo mešanico biotin-konjugiranih protiteles specifičnih za različne citokine in ta protitelesa se vežejo na citokine, ki so bili prisotni v vzorcu in so se vezali na protitelesa adsorbirana na kroglice.



Slika 12 č: V zadnji fazi dodamo streptavidin-fikoeritrin, ki se veže na biotin konjugat in fluorescira.



Slika 12: Postopek metode multipleks.

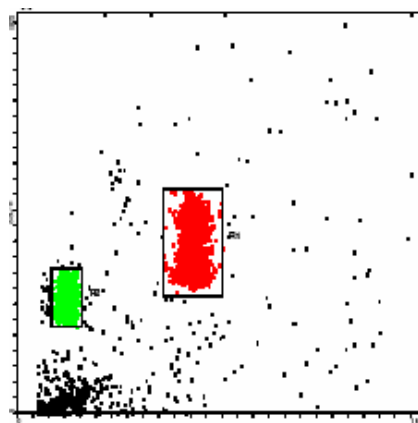
Po 12-ih do 16-ih urah smo 50  $\mu$ l supernatanta prenesli v predpripravljeno ploščo, ki je bila priložena kitu in izvedli test po navodilih proizvajalca. Uporabljali smo dva kita:

- BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit I (BD BioSciences) – s tem kitom smo določali količino kemokinov (IL-8, IP-10, RANTES, MCP-1),
- FlowCytomix Multiplex human Th1/Th2 10plex Kit I (Bender MedSystems) – s tem kitom smo določali količino kemokinov (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, TNF $\alpha$ ).

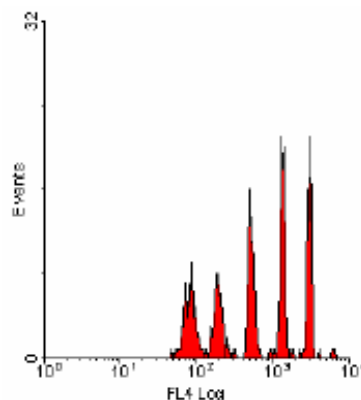
Princip testa s fluorescirajočimi kroglicami prikazuje slika 12 a do č.

Po inkubaciji smo supernatante v mikrotitrskih ploščah kita prenesli v epruveto in vstavili v citometer. Potek metode multipleks prikazuje slika 13 a do b.

a  
Vzemimo na primer dve seriji kroglic različnih velikosti:  
velikost A: 5,5  $\mu\text{m}$   
velikost B: 4,4  $\mu\text{m}$



b  
Vsaka serija vsebuje pet skupin kroglic obarvanih z barvilom različnih intenzitet. Barvilo pri vzbujujanju z laserjem emitira rdečo svetlobo (690 nm). Tako lahko ločimo 10 različnih skupin kroglic, kljub temu da uporabljamo le kroglice dveh različnih velikosti.



Slika 13: Princip metode multipleks.

### 3.2.8 Detekcija bakterij v celični kulturi

Prisotnost bakterij v celičnih kulturah bi lahko popačila rezultate. Zato smo preverjali kontaminacijo z mikoplazmami in drugimi bakterijami.

### 3.2.8.1 Detekcija mikoplazem v celični kulturi

Testirali smo supernatant celične kulture HEK293 in MM6, ki so dosegle okoli 90 odstotno konflueno. 100  $\mu$ L supernatanta smo prenesli v sterilno mikrocentrifugirko in jo 5 min inkubirali na 95 °C. Nato smo jo 5 s centrifugirali pri 13.000 rpm. Supernatant smo prenesli v sterilno svežo centrifugirko in dodali mešanico za polimerazno verižno reakcijo (ang. polymerase chain reaction ali PCR) (preglednica 11). Centrifugirko z mešanico smo vstavili v PCR napravo in zagnali program (preglednica 12).

Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za PCR.

sestavine	volumen (1 reakcija)
voda	35,8 $\mu$ L
10 x reakcijski pufer (3mM MgCl <sub>2</sub> )	5 $\mu$ L
mešanica* nukleotidov in začetnikov	5 $\mu$ L
interna kontrola*	2 $\mu$ L
DNA polimeraza (BioTools)	0,2 $\mu$ L
vzorec ali neg.** ali poz.* kontrola	2 $\mu$ L
skupni volumen	50 $\mu$ L

\*označene sestavine so priložene kitu

\*\*za negativno kontrolo sem uporabil vodo

Preglednica 12: Program PCR reakcije smo izvajali v aparaturi po naslednjem postopku:

stopnja		temperatura	čas
1.	začetna denaturacija	94°C	120 s
2.	35 ciklov	prileganje	94°C
		podaljševanje	55°C
		denaturacija	72°C
3.	zaključno podaljševanje	72°C	30 s
4.	konec	4°C	neskončno

Po zaključku procesa smo vzorec nanesti na gel, kot je opisano v naslednjem razdelku.

#### Elektroforeza DNA na agaroznem gelu

Koncentracija agaroze je bila 1.5 % (w/v) gel. Ustrezno količino agaroze smo raztopili s segrevanjem v pufru TAE v mikrovalovni pečici, ohladili na 60°C, dodali 2  $\mu$ l EtBr (0,5 mg/ml) za 100 ml gela ter vlili v pripravljeno kadičko za elektroforezo. Ko se je gel strdil, smo nanesti 16  $\mu$ L vzorca DNA, katerim smo dodali 4  $\mu$ L nanašalnega puфра (bromfenol modro). Elektroforeza je potekala v pufru TAE pri konstantni napetosti 100 V. Gel smo nato osvetlili z UV svetlobo in fotografirali.

### 3.2.8.2 Detekcija ostalih bakterij v celični kulturi

Celično kulturo smo centrifugirali nekaj minut pri 1200 rpm. Nato smo nekaj ml supernatanta prenesli v petrijevko s premerom 5 cm in jo inkubirali 2 do 3 dni pri 37 °C v 5 % vlažnosti. Prisotnost bakterij smo preverili pod invertnim mikroskopom.

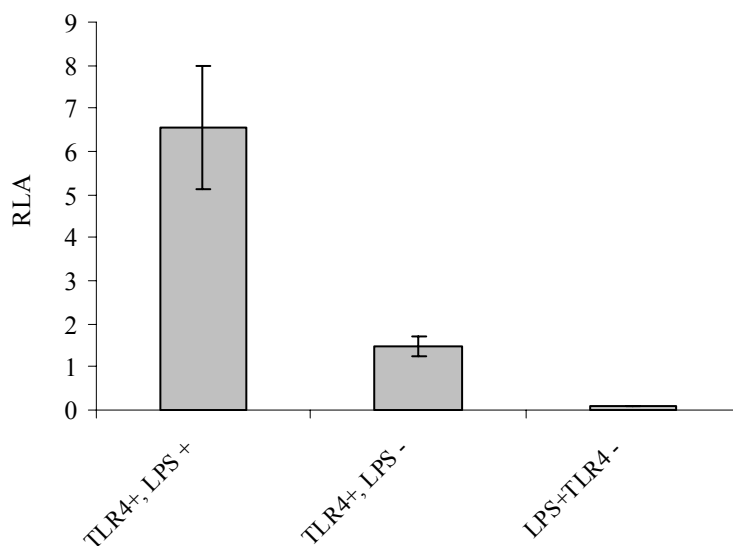


## 4 REZULTATI

### 4.1 UGOTAVLJANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI SISTEMA ZA DETEKCIJO AKTIVACIJE TLR4 SIGNALNE POTI

Po izolaciji ustreznih plazmidov smo preverili delovanje sistema za detekcijo aktivacije TLR4 signalne poti.

Izvedli smo tri različne kombinacije kotransfekcij celic HEK293 s pFLAG-TLR4, pEF-BOS- MD-2, pCD14, pELAM-1-kresničkina luciferaza, pRL-TK-*Renilla* luciferaza in celice stimuliral s Sa-LPS. Rezultat je prikazan na sliki 14.

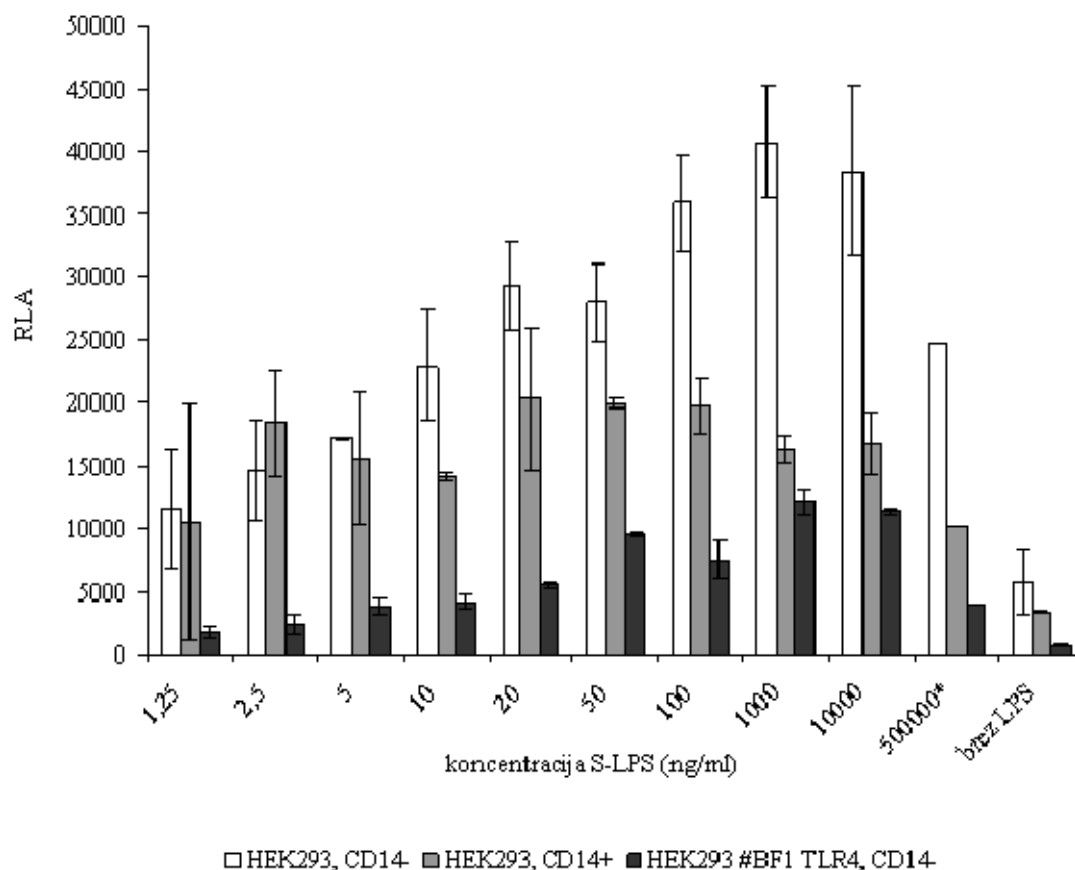


Slika 14: Ugotavljanje aktivnosti sistema za detekcijo aktivacije TLR4 signalne poti (TLR4+ označuje celice, ki izražajo protein TLR4, MD-2 in CD14; LPS+ označuje celice, katerim je bil dodan Sa-LPS; minus (-) pred oznako pomeni odsotnost plazmida oz. LPS).

Iz histograma na sliki 14 je razvidno, da je aktivacija celic, transficiranih s plazmidom za TLR4, nekajkrat večja od aktivacije celic, ki niso bile transficirane s tem plazmidom. To pomeni, da se sistem odziva na aktivacijo z LPS in da je TLR4 nujen za signaliziranje. Aktivnost TLR4 brez dodatka LPS je posledica avtoindukcije zaradi prisotne večje količine proteina TLR4 na površini celic.

### 4.2 UGOTAVLJANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE LPS ZA AKTIVACIJO CELIC

Celični kulturi HEK293 in HEK293 #BF1 TLR4 smo transficirali, tako da sta izražali MD-2, kresničkino luciferazo in luciferazo renilla. HEK293 smo transficirali tudi s pFLAG-TLR4 in v eni seriji poizkusov tudi s pCD14. Celice smo stimulirali z dodatkom Sa-LPS v različnih koncentracijah. Rezultat je prikazan na sliki 15.



Slika 15: Odvisnost relativne luciferazne aktivnosti od koncentracije Sa-LPS. HEK293, CD14- pomeni celično kulturo HEK293, ki ni bila transficirana s plazmidom pCD14. CD14+ pomeni transfekcijo s plazmidom pCD14. Analogno velja za drugo celično linijo. Na abscisni osi so prikazane koncentracije Sa-LPS v ng/ml. Izjema je le 500000\*, ki pomeni 500.000 ng Ba-187/ml (komentar se nahaja v nadaljevanju).

Pri stabilno transficirani celični liniji HEK293 #BF TLR4 smo opazili manjšo relativno luciferazno aktivnost kot pri HEK293 celicah. Vzrok je verjetno v manjšem izražanju proteina TLR4. Posledica je manjši RLA odziv.

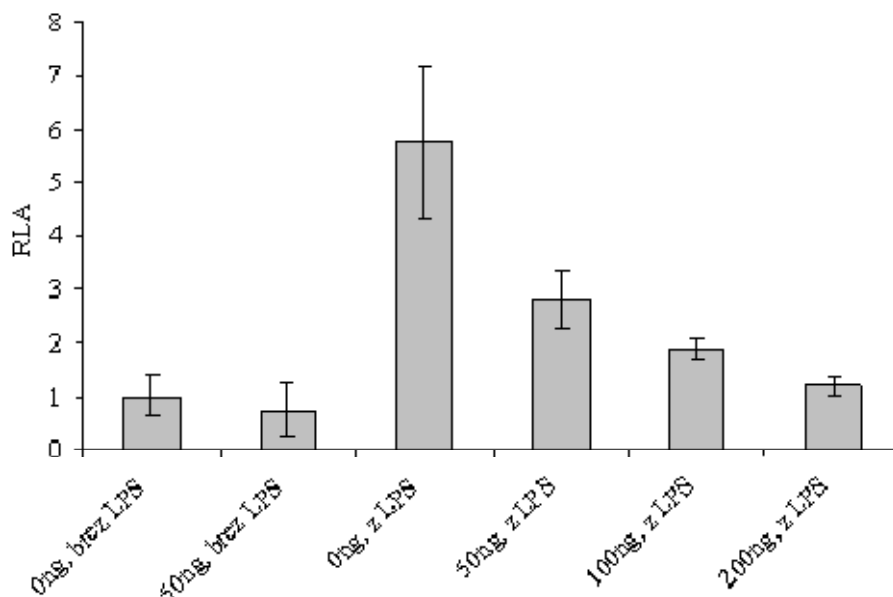
Opazili smo manjši odziv pri HEK293 transficiranih s pCD14 kot pri enakih celicah brez transfekcije s pCD14. Vloga CD14 je, da prenese LPS na MD-2 in tako poveča odzivnost signalne poti. V našem primeru je CD14 zmanjšal signaliziranje. Inhibicija je verjetno posledica nevtralizacije LPS, ki jo CD14 povzroči, kadar je prisoten v večjih količinah.

Glede na rezultate (slika 15) smo se odločili, da v nadaljnjih poskusih uporabljamo koncentracijo 100 ng/ml LPS, saj se pri tej koncentraciji lažje opazi razlike v RLA.

### 4.3 UGOTAVLJANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE PLAZMIDA pDNMyD88 ZA TRANSFEKCIJO CELIC

Plazmidni sistem pDNMyD88 kodira dominantno negativno mutanto gena *MyD88*. Izražen produkt tega gena predstavlja skrajšano obliko proteina MyD88, ki vsebuje C-končno TIR domeno in je brez DD domene. Zato takšna oblika proteina MyD88 ne more vezati TRAF6 preko DD domen in ne aktivira signalne kaskade po od MyD88-odvisni poti.

Celice HEK293 #BF1 TLR4 smo transficirali s plazmidi, ki kodirajo MD-2, luciferazo renilla, kresničkino luciferazo in s plazmidom pDNMyD88 v koncentracijah: 0 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml in 200 ng/ml. Celice smo stimulirali s Sa-LPS v koncentraciji 100 ng/ml (slika 16).



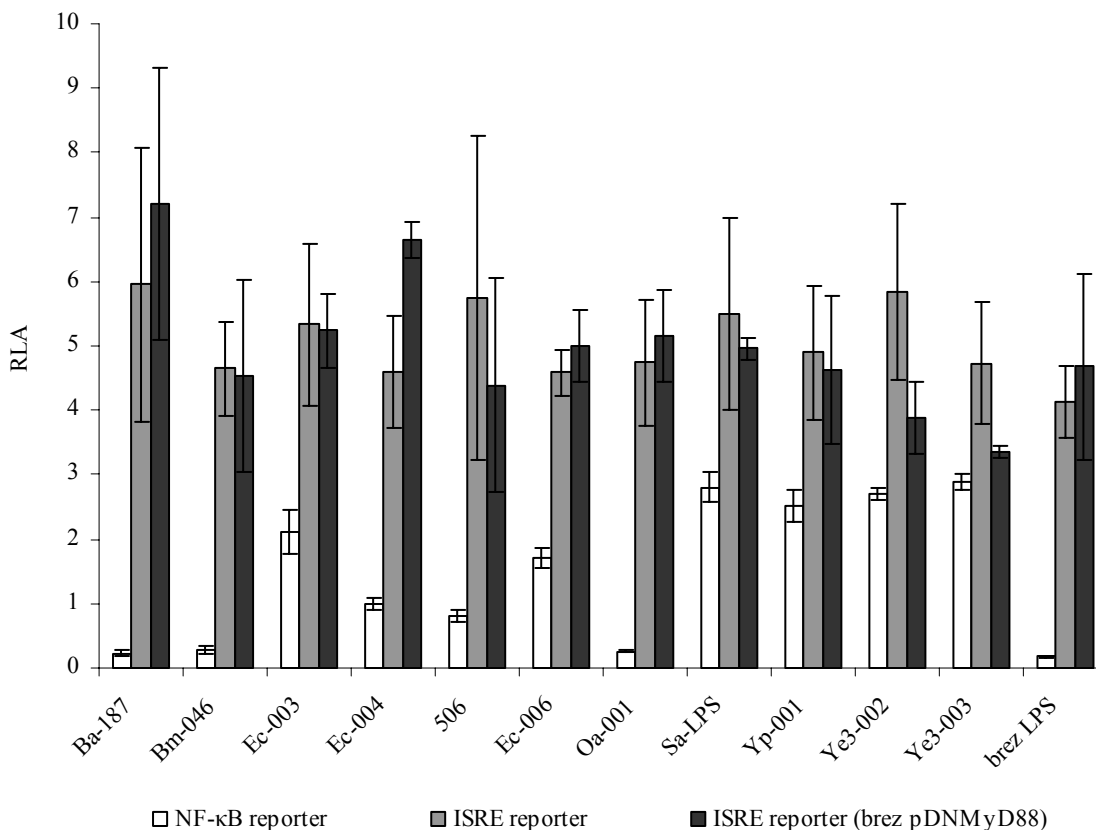
Slika 16: Odvisnost relativne luciferazne aktivnosti od koncentracije pDNMyD88 in stimulacije celic z LPS. Številka z enoto v ng (nanogrami) pomeni število ng plazmida pDNMyD88, s katerim so bile celice v luknji mikrotiterske plošče transficirane. Na primer: zadnji stolpec na desni prikazuje odziv celic, ki so bile transficirane z 200 ng pDNMyD88 in stimulirane s 100 ng/ml LPS.

Rezultati so pokazali, da je optimalna koncentracija plazmida pDNMyD88 za inhibicijo od MyD88-odvisne poti 200 ng/ml, ker imajo celice, transficirane s tolikšno koncentracijo plazmida, približno enako relativno luciferazno aktivnost kot celice, katerim ni bil dodan LPS.

### 4.4 AKTIVACIJA OD MyD88-ODVISNE IN -NEODVISNE POTI

Zanimalo nas je, kako posamezni LPS aktivirajo od MyD88-odvisno in -neodvisno pot. Uporabili smo HEK293 #BF1 TLR4 celično linijo. Za od MyD88-odvisno pot smo celice transficirali s plazmidi pEF-BOS-MD-2, pCD14, luciferazo renilla in pELAM-1-

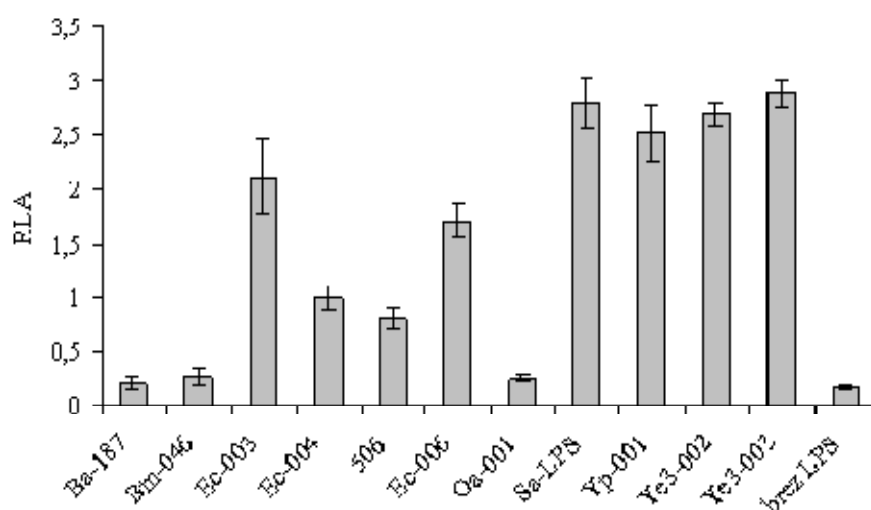
kresničnikino luciferazo. Za od MyD88-neodvisno pot sem uporabil pEF-BOS-MD-2, luciferazo renilla, pCD14, pDNMyD88 in pISRE-LUC-kresničnikina luciferaza. Želeli smo ugotoviti, v kolikšni meri aktivacija od MyD88-odvisne poti vpliva na aktivacijo od MyD88-neodvisne poti posredno preko produktov NF- $\kappa$ B (zakasnjena aktivacija – slika 11). Zato smo v zadnji seriji poizkusov izvedel transfekcije celic z enakimi plazmidi kot pri od MyD88-neodvisni poti, vendar brez plazmida pDNMyD88 (slika 17).



Slika 17: Primerjava relativnih luciferaznih aktivnosti pri od MyD88-odvisni (NF- $\kappa$ B reporter) in - neodvisni poti (ISRE reporter).

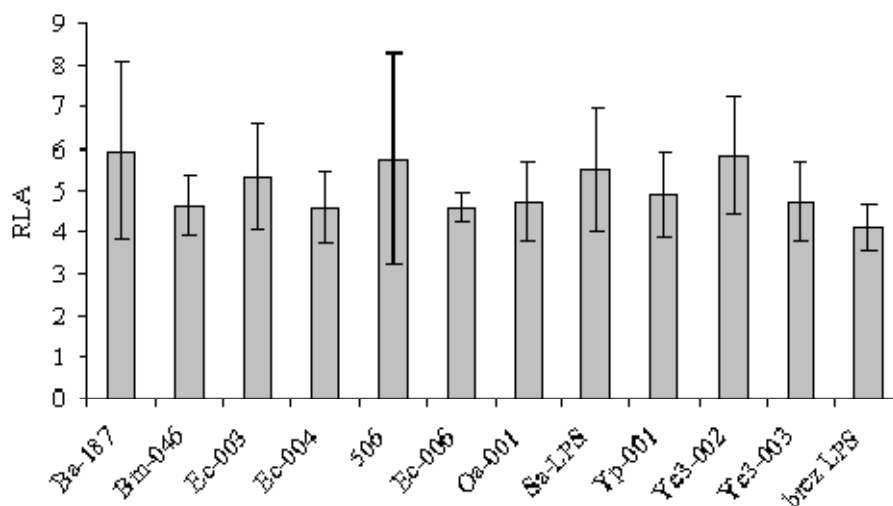
Za bolj pregledno primerjavo razlik v vrednostih RLA od posameznih LPS smo vse tri poti v nadaljevanju prikazali na ločenih histogramih na slikah 18 do 20.

Po pričakovanjih je LPS bakterij *B. abortus* (Ba-187), *B. melitensis* (Bm-046) in *O. anthropi* (Oa-001) najslabše stimuliral celice (slika 18). Ti LPS vsebujejo zelo dolgo verigo, zaradi katere se LPS verjetno ne more vezati v hidrofobni žep proteina MD-2. Predvidevali smo, da bo heksaacilna komponenta 506 močno stimulatorna, vendar je poskus pokazal manjši RLA odziv kot pri tetra- in pentaacilnih LPS (Ec-003, Ec-004 in Ec-006). Za najmočnejše stimulatorje so se izkazali LPS iz jersinij (Yp-001, Ye3-002 in Ye3-003) in salmonele (Sa-LPS).



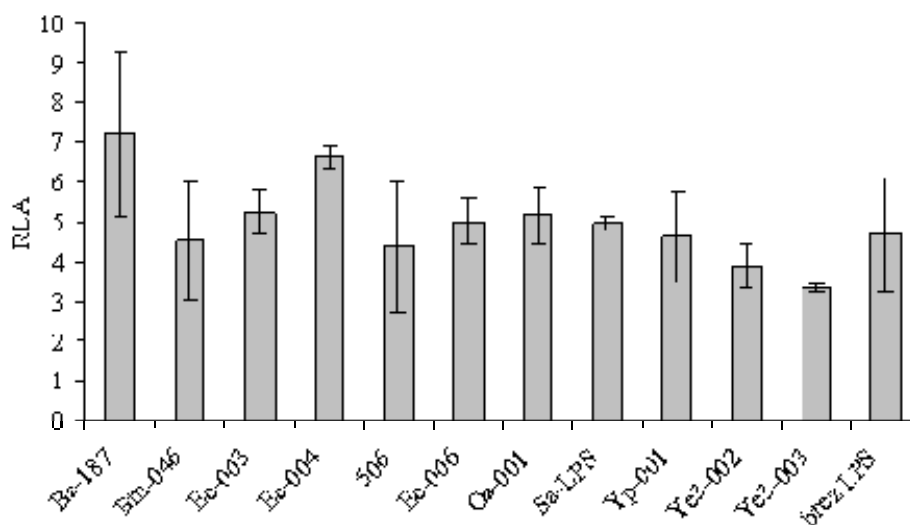
Slika 18: Odvisnost RLA od različnih LPS v od MyD88-odvisni poti.

Odziv celic na vse LPS pri od MyD88-neodvisni poti je bil nepričakovano zelo visok in nespecifičen (slika 19). Verjetno je vzrok v nespecifični oz. konstitutivni aktivaciji promotorja ISRE.



Slika 19: Odvisnost RLA od različnih LPS v od MyD88-neodvisni poti.

Tudi v primeru transfekcije celic s plazmidom pISRE in brez pDNMyD88 je bil odziv visok in nespecifičen (slika 20). Vse druge plazmide sem ločeno preizkusil in dobil pričakovan odziv. Lahko zaključimo, da je pISRE neustrezen plazmid in zato bi morali poskus ponoviti z drugim plazmidnim sistemom.



Slika 20: Odvisnost RLA od različnih LPS v od MyD88-neodvisni poti brez transfekcije s plazmidom pDNMyD88.

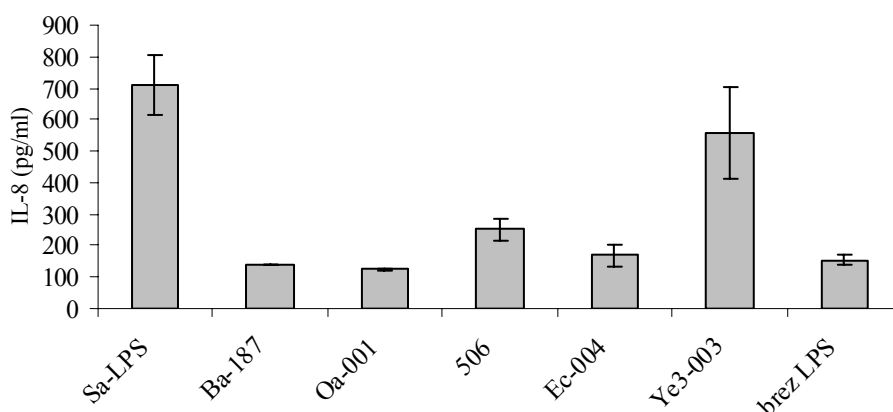
#### 4.5 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJ CITOKINOV TNF $\alpha$ , IP10 IN IL-8 V HEK293 CELIČNI KULTURI S TESTOM ELISA

Celično kulturo HEK293 smo transfcirali s plazmidi pEF-BOS-MD-2, pELAM-1-kresničkina luciferaza in pRL-TK-*Renilla* luciferaza. Naslednji dan smo celicam dodali LPS v končni koncentraciji 100 ng/ml. Po 4h, 8h ali 12h smo iz luknjic mikrotiterske plošče prenesli gojišče brez celic v mikrocentrifugirko in jo centrifugirali 1 minuto. Supernatant smo prenesli v luknjice plošče ELISA kita.

Koncentracije TNF $\alpha$  in IP-10 ugotovljene z ELISA testom oziroma spektrofotometrom so bile enake vrednostim kontrole in nižje od najnižjega standarda. Tudi testi drugih laboratorijev so pokazali, da celična kultura HEK293 ne proizvaja IP-10 in TNF $\alpha$ .

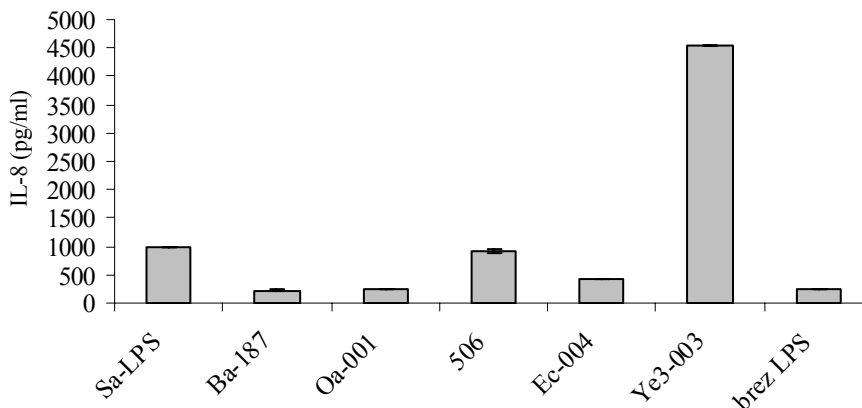
Koncentracije IL-8 so prikazane na slikah 21 do 23. Uporabili smo tri različne inkubacijske intervale: 4, 8 in 12 ur. To smo izvedli, tako da smo 4, 8 ali 12 ur po stimulaciji celic HEK293 z LPS odvzeli supernatant in ga prenesli v mikrotitersko ploščo za ELISA test.

Po štirih urah je že bila vidna razlika v sintezi IL-8 pri stimulaciji celic z različnimi LPS. Odziv celic na stimulacijo z LPS v tem poskusu je primerljiv z rezultati, pridobljenimi z luciferazno aktivnostjo pri »od MyD88-odvisni poti« (slika 18).



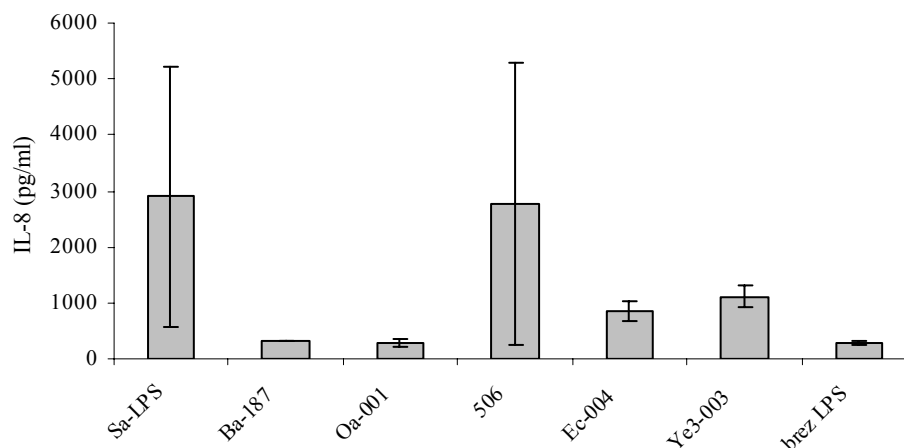
Slika 21: Vpliv različnih LPS na indukcijo IL-8 v celični kulturi HEK293 po 4-urni stimulaciji z LPS.

Razmerja v koncentracijah IL-8 med stimulacijami celic z različnimi LPS so po 8-urni stimulaciji celic ostala podobna (slika 22). Izjema je poskus s Ye3-003, kjer je bila koncentracija IL-8 nenavadno velika. Vzrok je neznan.



Slika 22: Vpliv različnih LPS na indukcijo IL-8 v celični kulturi HEK293 po 8-urni stimulaciji z LPS.

Pri naslednjem poskusu z 12-urno inkubacijo (slika 23) je bila koncentracija IL-8 za enak LPS v nekaterih primerih manjša in je pri aktivaciji celic s Sa-LPS in 506 pokazala velika odstopanja med vzporednimi poskusi, kar je vidno v standardni deviaciji. Poskusa vseeno nismo ponavljali, ker smo se odločili, da bomo koncentracije citokinov v nadaljevanju ugotavljali s pretočnim citometrom.



Slika 23: Vpliv različnih LPS na indukcijo IL-8 v celični kulturi HEK293 po 12-urni stimulaciji z LPS.

#### 4.6 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJ CITOKINOV OZIROMA KEMOKINOV S PRETOČNIM CITOMETROM

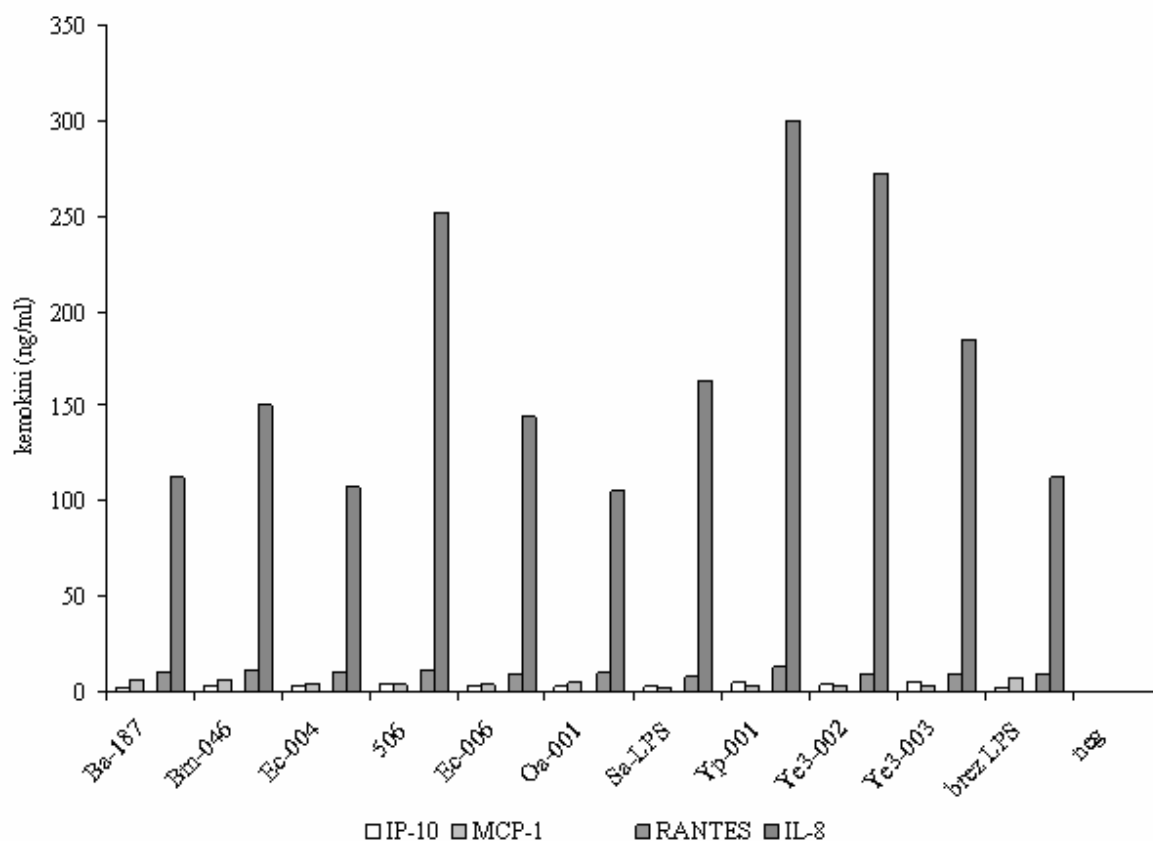
Ugotavljanje koncentracije citokinov smo nadaljevali z metodo pretočno citometrije, ki je bolj občutljiva metoda, bolj enostavna in hitrejša kot ELISA test ter omogoča testiranje več citokinov oziroma kemokinov v istem vzorcu.

##### 4.6.1 Vpliv različnih LPS na sintezo kemokinov v celični liniji Mono Mac 6 (MM6)

MM6 je celična linija monocitov, ki neprestano izraža fenotipske in funkcionalne lastnosti zrelih monocitov. Začeli smo jo uporabljati, ker smo ugotovili, da se celice MM6 močneje aktivirajo kot celice HEK293 in ker je delo z njimi bolj enostavno.

V posamezno luknjico mikrotiterske plošče smo dali  $10^5$  celic in jim dodali PMA v končni koncentraciji 50 ng/ml in takoj zatem LPS v končni koncentraciji 100 ng/ml. Po 12-urni inkubaciji smo celice centrifugirali in supernatant prenesli. Nadaljevali smo, kot je že opisano v poglavju 3.2 (Metode) za ugotavljanje koncentracije citokinov. Rezultati so prikazani na sliki 24.

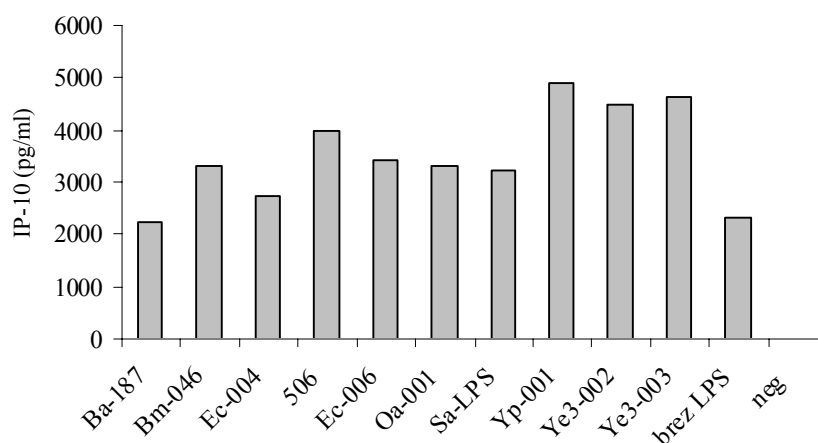




Slika 24: Vpliv različnih LPS na sintezo kemokinov v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 12-urni inkubaciji merili koncentracijo kemokinov.

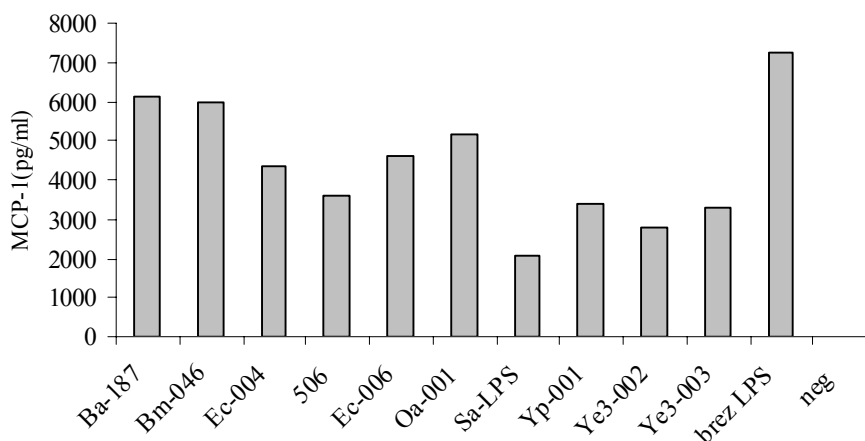
V nadaljevanju so rezultati za posamezne citokine prikazani na ločenih slikah od 25 do 27.

Koncentracije IP-10 na sliki 25 so največje za LPS jersinij in najmanjše za brucelin LPS. Pokazali smo že, da ti LPS dobro stimulirajo od MyD88-odvisno pot (slika 18). Glede na to, da se IP-10 sintetizira po aktivaciji od MyD88-neodvisne poti, lahko sklepamo, da lahko LPS jersinij in salmonela dobro aktivirajo obe poti.



Slika 25: Vpliv različnih LPS na sintezo IP-10 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 12-urni inkubaciji merili koncentracijo kemokina.

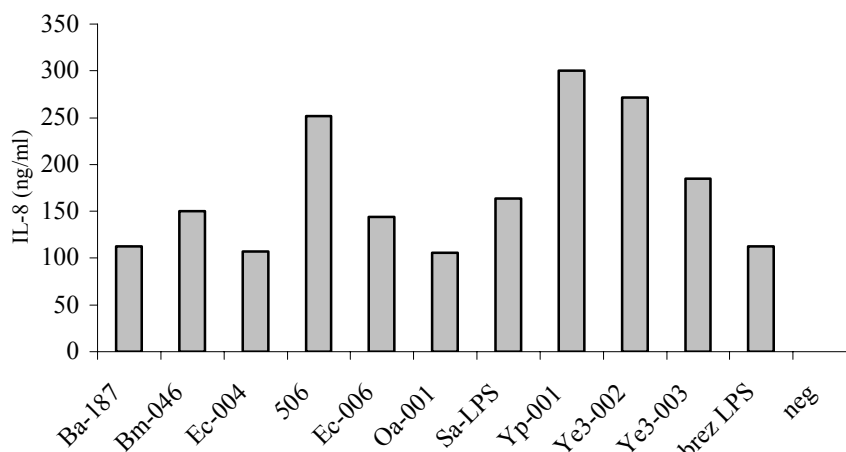
Slika 26 prikazuje koncentracije MCP-1. MCP-1 je sicer induciran ob mikrobnii okužbi, očitno pa LPS ni tista komponenta, ki aktivira njegovo sintezo. LPS, ki so se prej izkazali za biološko izredno aktivne (Sa-LPS, Yp-001, Ye3-002, Ye3-003), so delno inhibirali sintezo MCP-1, česar ne znamo pojasniti.



Slika 26: Vpliv različnih LPS na sintezo MCP-1 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 12-urni inkubaciji merili koncentracijo kemokina.

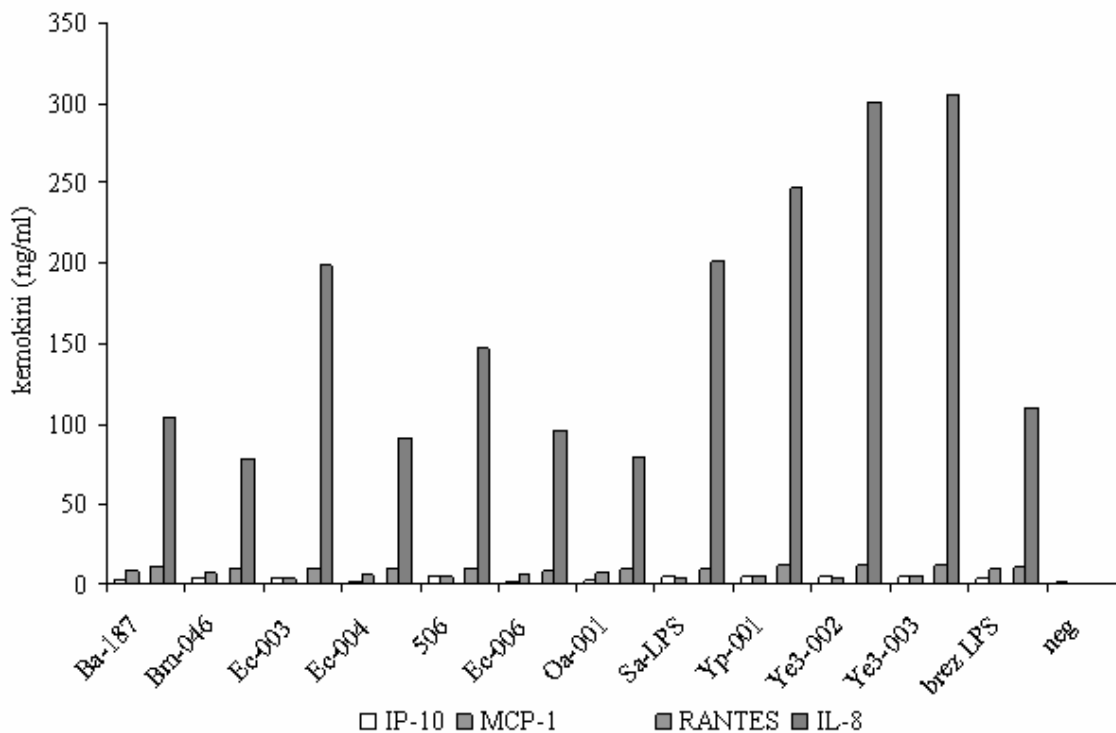
Ugotavljali smo tudi sintezo kemokina RANTES, ki je induciran preko od MyD88-neodvisne poti, vendar nismo opazili razlike v velikostih koncentracij kemokina med stimulacijami celic z različnimi LPS oziroma njegovi odsotnosti.

V poskusu ugotavljanja koncentracij IL-8 so se za najbolj aktivne izkazali LPS jersinij in komponenta 506 (slika 27), manj pa brucelina, okrobaktrumov, tetra- in pentaacilni LPS, kar je pokazal tudi ELISA test (slika 21) že po 4-urni inkubaciji.



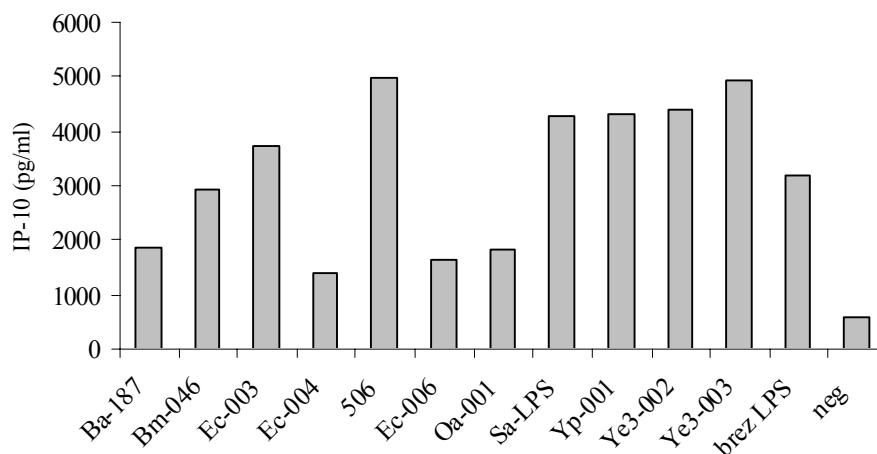
Slika 27: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-8 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 12-urni inkubaciji merili koncentracijo kemokina.

V nadaljevanju smo izvedli poskus enako kot prej, le da smo analizirali supernatant po 24 urah namesto po 12 urah. Dobljeni rezultati so prikazani na sliki 28.



Slika 28: Vpliv različnih LPS na sintezo kemokinov v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo kemokinov.

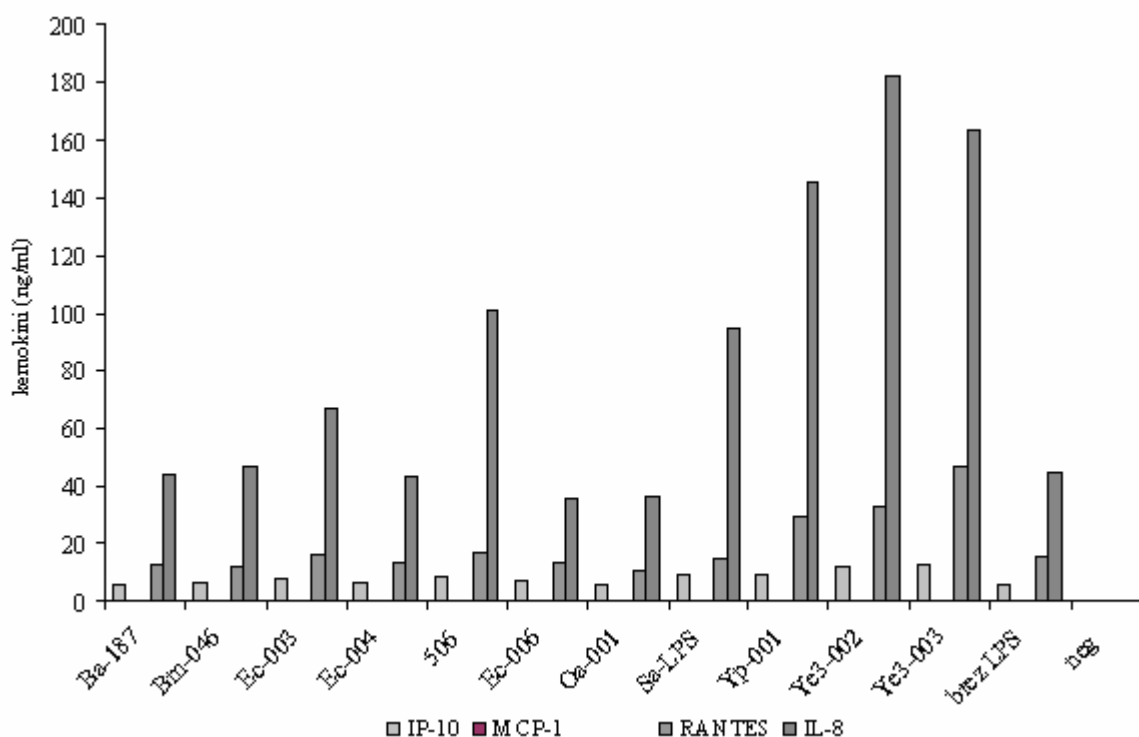
Histogrami za kemokine MCP-1, RANTES in IL-8 niso prikazani na ločenih slikah, ker so bili inducirani podobno kot v poskusu z 12-urno inkubacijo. Posebej smo prikazali le IP-10 na sliki 29.



Slika 29: Vpliv različnih LPS na sintezo IP-10 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo kemokina.

Razlike v koncentracijah IP-10 so pri 24-urni različici poskusa boljše vidne in so prikazane na sliki 29. Komponenta 506, ki je heksaacilni lipid A, je najboljše aktivirala sintezo IP-10. Za zelo dobre aktivatorje IP-10 so se izkazali tudi LPS jersinij in salmonele. Pokazali smo že, da ti LPS dobro stimulirajo od MyD88-odvisno pot (slika 18). Glede na to, da se IP-10 sintetizira po aktivaciji od MyD88-neodvisne poti, lahko sklepamo, da lahko LPS jersinij in salmonele dobro aktivirajo obe poti.

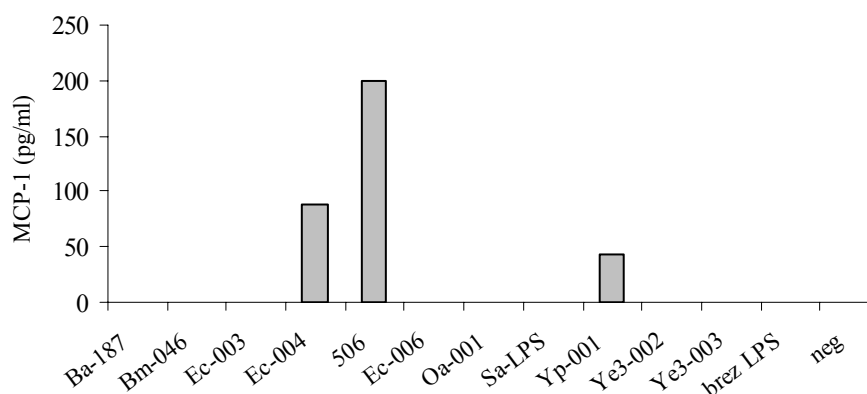
Zanimal nas je tudi vpliv človeškega seruma na sintezo citokinov (slika 30). Poskus smo izvedli enako kot predhodno, le da smo celice MM6 gojili v prisotnosti 1 % človeškega seruma. Inkubacija z LPS je bila 24-urna.



Slika 30: Vpliv različnih LPS na sintezo kemokinov v celicah MM6 gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo kemokinov.

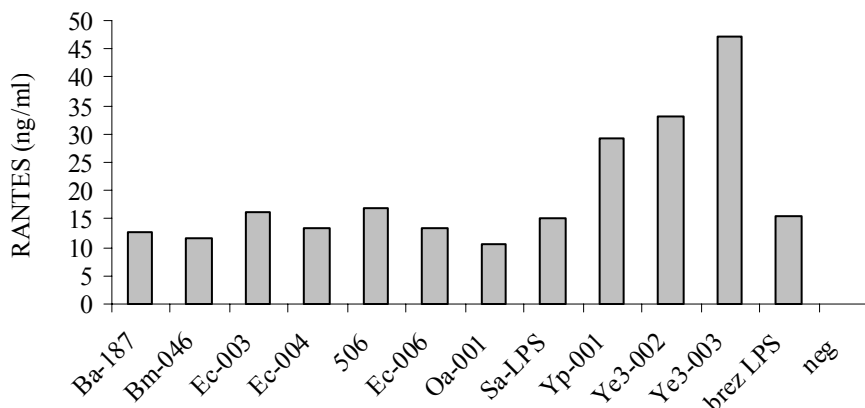
Indukcija MCP-1 in RANTES je prikazana tudi na ločenih slikah od 31 do 32. Indukcija IP-10 je podobna tisti, ki je prikazana na sliki 25 in indukcija IL-8 je podobna kot na sliki 27.

MCP-1 je bil iz neznanega vzroka induciran le ob stimulaciji celic z Ec-004, komponento 506 in Yp-001. Poskus za ta kemokin bi morali ponoviti.



Slika 31: Vpliv različnih LPS na sintezo MCP-1 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo kemokina.

Slika za RANTES se razlikuje od prejšnjih, kjer je bila aktivacija tega kemokine podobna za vse LPS. Tokrat so LPS jersinij inducirali sintezo tega kemokina bolj kot ostali LPS (slika 32).

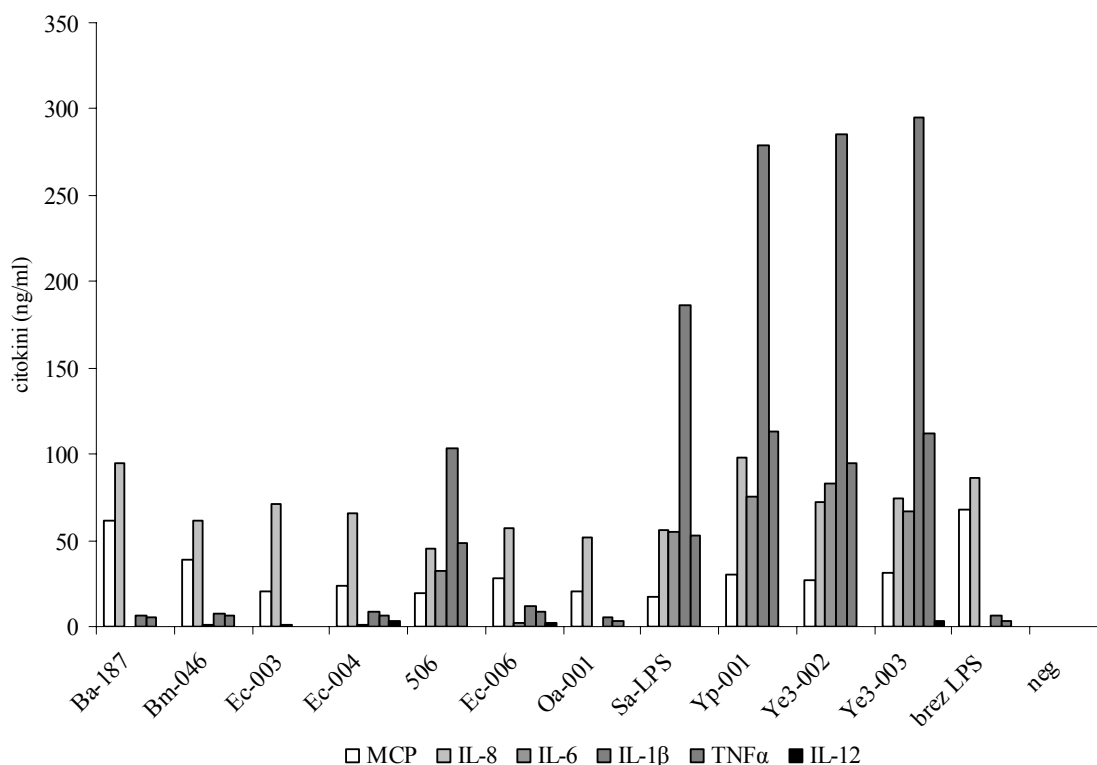


Slika 32: Vpliv različnih LPS na sintezo RANTES v celicah MM6 gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo kemokina.

Razlike v indukciji IP-10 in IL-8 so bile podobne kot pri prejšnji poskusih, zato ti rezultati niso prikazani na histogramu.

#### 4.6.2 Vpliv različnih LPS na sintezo citokinov v celični liniji Mono Mac 6 (MM6)

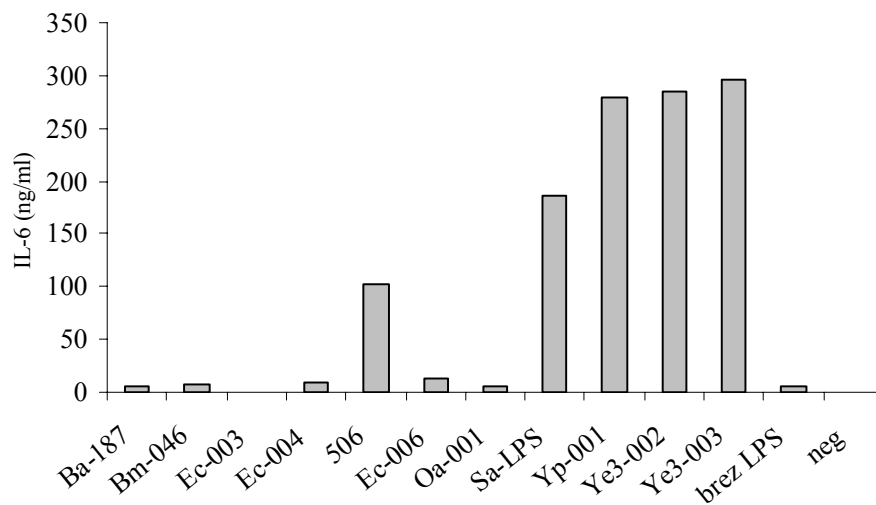
V nadaljevanju smo ugotavljali tudi koncentracije nekaterih citokinov. Poskus smo izvedli enako kot za kemokine. Stimulacija celic z LPS je trajala 24 ur. Celice smo gojili v gojitvenem mediju z 10 % FBS. Rezultati so prikazani s histogramom na sliki 33.



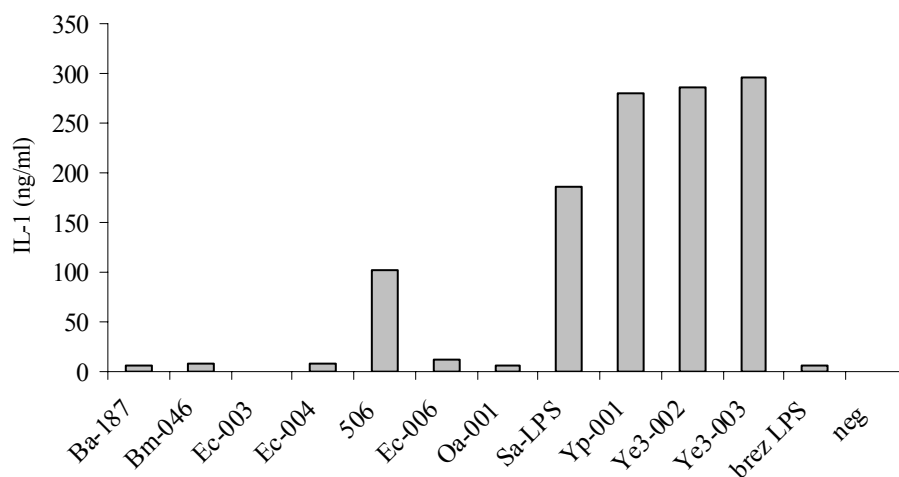
Slika 33: Vpliv različnih LPS na sintezo citokinov v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokinov.

Rezultati so zaradi boljše preglednosti ponovno prikazani ločeno na slikah od 34 do 37.

Sinteza vnetnih citokinov (IL-1β, IL-6 in TNFα) v odgovor na stimulacijo z LPS je dober pokazatelj biološke aktivnosti LPS. Nekaj minut po okužbi se prične sintetizirati TNFα, ki pozitivno deluje na proizvodnjo IL-1β in le-ta ojača sintezo IL-6. Ta povezava je lepo vidna na slikah 34, 35 in 36, na katerih lahko opazimo, da so LPS jersinij, salmonele in komponente 506, stimulirali sintezo vnetnih citokinov neprimerno bolje kot ostali LPS.

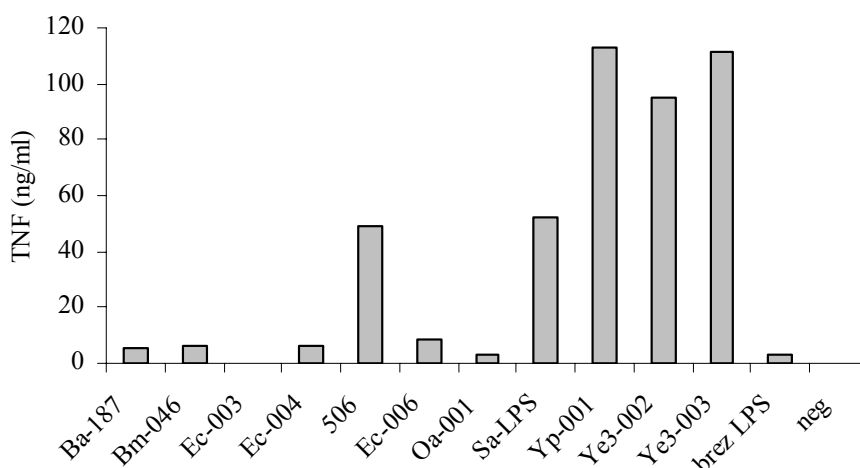


Slika 34: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-6 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokina.



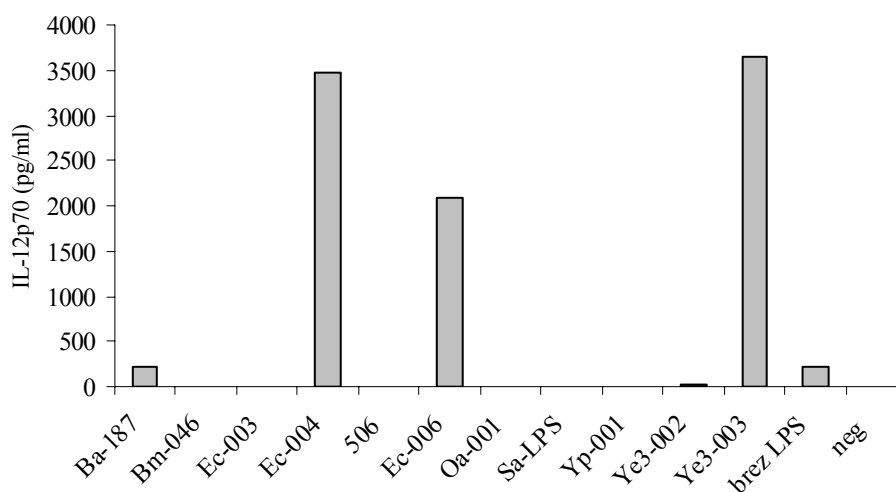
Slika 35: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-1 $\beta$  v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokina.





Slika 36: Vpliv različnih LPS na sintezo TNF $\alpha$  v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokina.

Indukcije IL-12p70, ki naj bi bila pomembna pri omejevanju znotrajceličnih parazitov, ne znamo razložiti (slika 37). Poskus bi morali ponoviti.



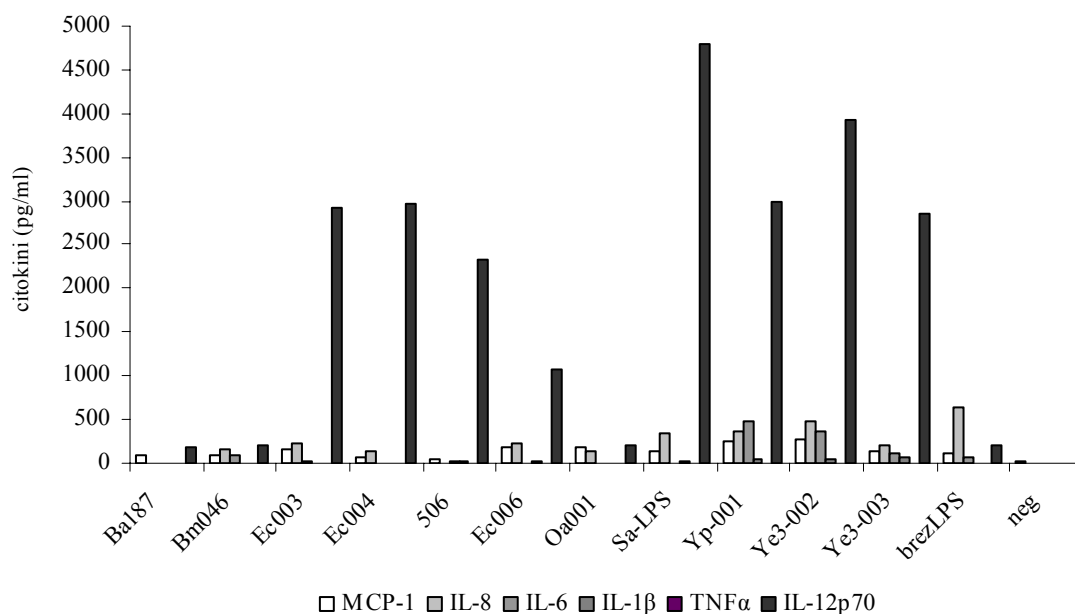
Slika 37: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-12p70 v celicah MM6 gojenih v gojišču z 10 % telečjim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokina.

MCP-1 je bil induciran podobno kot v prejšnjem poskusu (slika 26), zato rezultat za ta kemokin ni prikazan s histogramom.

Pri teh poskusih smo MM6 celicam dodali PMA in kasneje celic nismo spirali s PBS, da bi PMA odstranili. Mogoče PMA vpliva na sintezo nekaterih citokinov, ker so ponekod vrednosti koncentracij citokinov velike, tudi v primerih, ko celicam nismo dodali LPS. Pri naslednjih poskusih smo PMA pred stimulacijo celic z LPS odstranili in dobili manjše vrednosti koncentracij citokinov.

Lahko je vzrok tudi v različni stimulaciji celic z LPS. Takoj po dodatku PMA, ki omogoči diferenciacijo monocitov v makrofage, smo dodali tudi LPS. Zato smo verjetno opazovali odziv tudi monocitov, saj so bili ti stimulirani še pred diferenciacijo v makrofage.

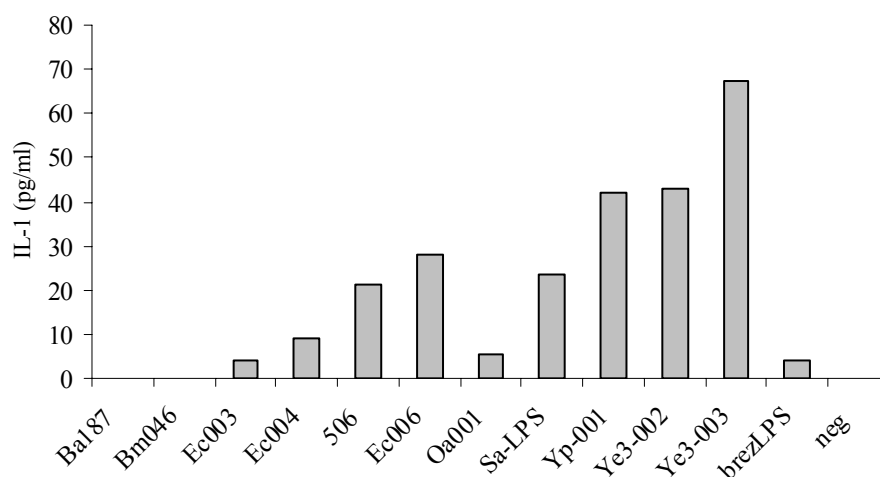
V nadaljevanju smo ugotavljali koncentracijo citokinov. Poskus smo izvedli, tako da smo celicam MM6 menjali gojišče za gojišče brez antibiotika in dodali PMA v koncentraciji 10ng PMA/milijon celic. Pustili smo jih 24 ur, da so se celice diferencirale v makrofage (v mediju niso več plavale posamezno, temveč v skupkih). Celice smo nato centrifugirali, sprali s PBS (odstranili PMA) in dodali 1% človeški serum. V vsako luknjico smo dali po  $10^4$  celic in LPS v končni koncentraciji 100 ng/ml, ter inkubirali 15 ur. Nato smo nadaljevali kot je že opisano v poglavju 3.2 (Metode) za določanje citokinov. Poskus se od prejšnjih razlikuje predvsem v tem, da so se monociti diferencirali v makrofage, preden smo jim dodali LPS.



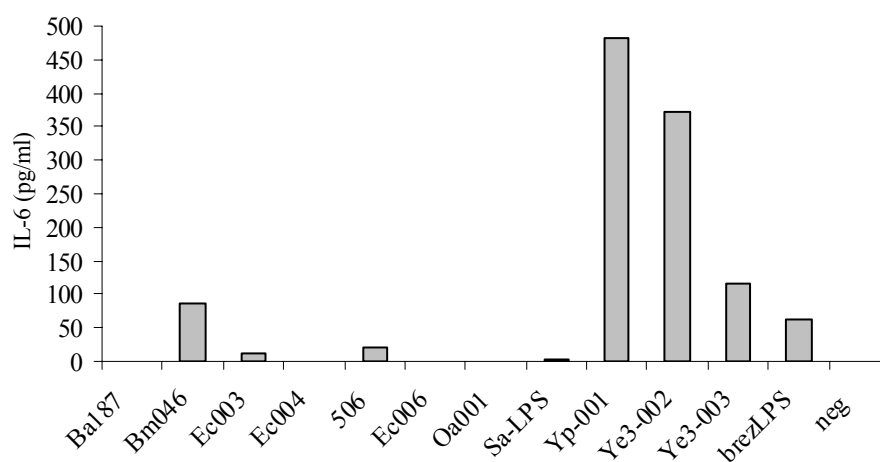
Slika 38: Vpliv različnih LPS na sintezo citokinov v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokinov.

Rezultati s slike 38 so prikazani na ločenih histogramih na slikah od 39 do 43.

Pri tem poskusu smo dobili koncentracije IL-1β, ki so približno 6000-krat manjše (slika 39) kot pri prejšnjem poskusu, medtem ko so koncentracije IL-6 približno 200-krat manjše. Še vedno so LPS jersinij v primerjavi z ostalimi LPS najboljše inducirali sintezo IL-6, medtem ko so sintezo IL-1β inducirali tudi Sa-LPS, komponenta 506 in Ec-006. V tej seriji poskusov prisotnosti TNFα nismo zaznali.

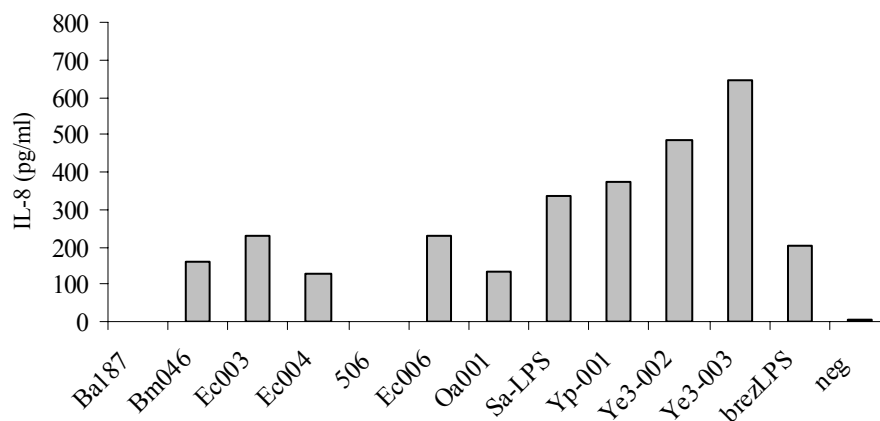


Slika 39: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-1 $\beta$  v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokina.



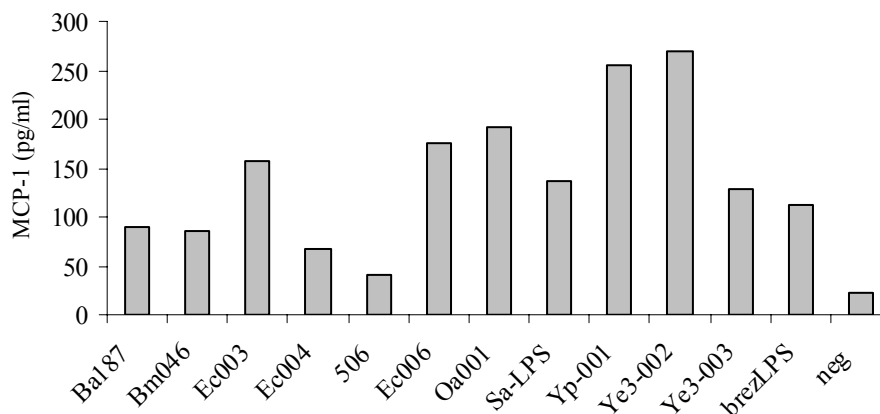
Slika 40: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-6 v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokina.

Največje koncentracije IL-8 so bile ponovno sintetizirane v celicah, ki smo jim dodali LPS jersinij oziroma salmonela. Podoben odziv bi pričakovali tudi za komponento 506, ki pa je v tem primeru najslabše inducirala sintezo IL-8 (slika 41).



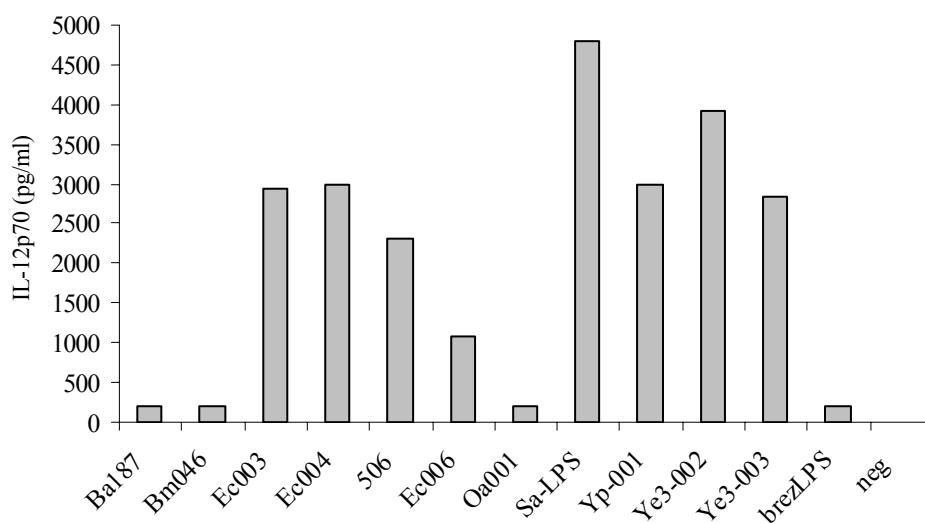
Slika 41: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-8 v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokina.

Koncentracije MCP-1 so nekajkrat nižje od izmerjenih v prejšnjih poskusih (slika 42). Odziv celic na LPS se v tem poskusu razlikuje od odzivov v prejšnjih poskusih. Največjo sintezo sta inducirala LPS jersinije, ki sta v predhodnih poskusih pokazala najmanjšo sposobnost indukcije MCP-1.



Slika 42: Vpliv različnih LPS na sintezo MCP-1 v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokina.

Celice so v tej različici poskusa ugotavljanja proizvodnje IL-12p70 sintetizirale najmanj citokina, ko so bile stimulirane z LPS brucele in okrobaktruma. Ti LPS so se že v prejšnjih poskusih izkazali za biološko neaktivne. Vsi ostali LPS so dobro stimulirali sintezo tega citokina.



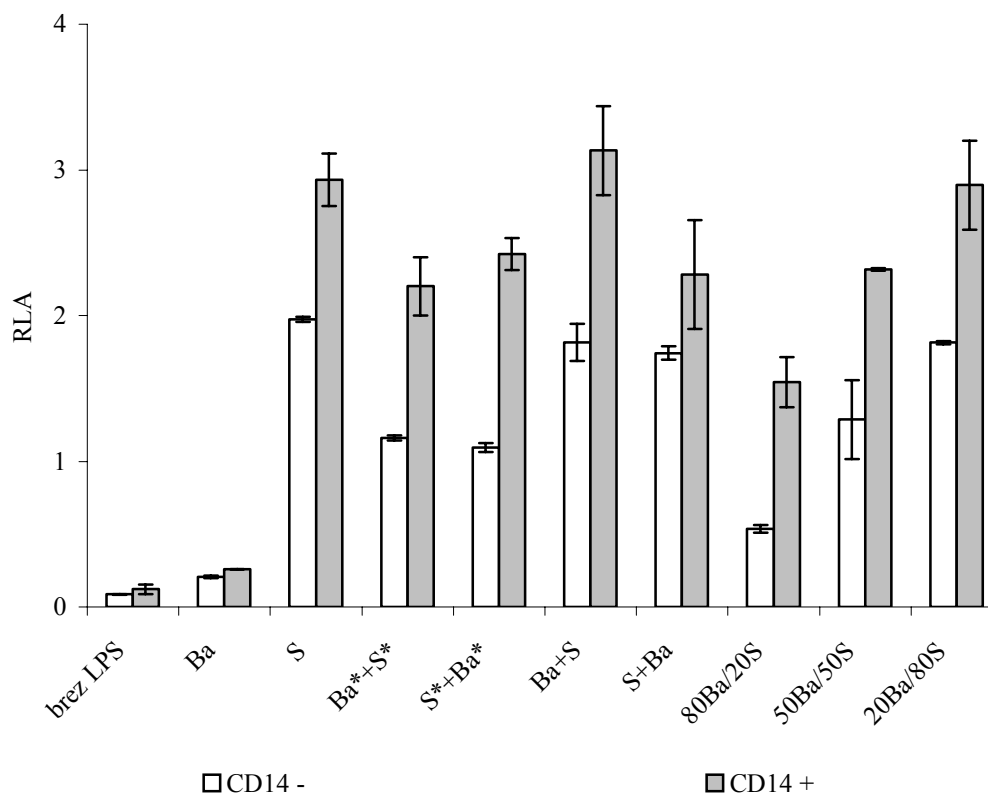
Slika 43: Vpliv različnih LPS na sintezo IL-12p70 v celicah MM6 diferenciranih v makrofage in gojenih v gojišču z 1 % človeškim serumom. LPS smo dodali v končni koncentraciji 100 ng/ml in po 24-urni inkubaciji merili koncentracijo citokina.

Vsak poskus ugotavljanja koncentracije citokinov oziroma kemokinov smo opravili le enkrat in tako tudi nismo mogli izračunati napak. Da bi ugotovili zanesljivost rezultatov bi morali poskuse ponoviti in rezultate med seboj primerjati.

#### 4.7 UGOTAVLJANJE MOREBITNEGA INHIBITORNEGA UČINKA Ba-187 NA AKTIVACIJO CELIC

S prejšnjimi poskusi smo pokazali, da ima LPS *B. abortus* z oznako Ba-187 majhno endotoksično aktivnost. V nadaljevanju smo želeli ugotoviti ali ima ta LPS inhibitorni vpliv na RLA odziv celic s Sa-LPS, ki je dober aktivator imunskega odgovora.

Uporabili smo celično linijo HEK293 #BF1 TLR4 in celice transficirali s plazmidi za MD-2, kresničkino luciferazo in renilla luciferazo. V različnih serijah poskusov brez ali s transfekcijo s plazmidom za CD14 smo preverjali vpliv Ba-187 na aktivacijo promotorja kresničkine luciferaze. LPS smo pred stimulacijo sonicirali, da smo razbili obstoječe agregate in omogočili tvorbo mešanih agregatov med Ba-187 in Sa-LPS. Bilo je namreč že pokazano, da določen delež tetraacilnega LPS v agregatih heksaacilnega LPS poveča njegovo aktivnost (Mueller, 2004). Vzrok je verjetno spremenjena struktura agregatov in tako boljša dostopnost LPS za LBP.



Slika 44: Odvisnost relativne luciferazne aktivnosti od aktivacije celične linije HEK293 #BF1 TLR4 (s ali brez transfekcije s plazmidom za CD14) z LPS (Ba-187 in Sa-LPS) v različnih molarnih koncentracijah. Vse celice so bile transficirane s plazmidi za MD-2, kresničkino luciferazo in renilla luciferazo.

Legenda: Ba = Ba-187 (10 ng/ml), S = Sa-LPS (5 ng/ml), Ba\*+S\* = Ba (5 ng/ml) in po 1 uri še S (5 ng/ml), S\*+Ba\* = S (5 ng/ml) in po 1 uri še Ba (5 ng/ml), 80/20 = 8 ng/ml Ba in 2 ng/ml S, 50/50 = 5 ng/ml Ba in 5 ng/ml S, 20/80 = 2 ng/ml Ba in 8 ng/ml S, Ba+S = Ba (10 ng/ml) in po 1 uri še S (10 ng/ml), S+Ba = S (10 ng/ml) in po 1 uri še Ba (10 ng/ml), brez LPS = celicam ni bil dodan LPS. Navedene so končne koncentracije LPS v posamezni luknjici mikrotiterske plošče.

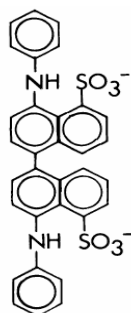
Različne agregate smo pripravili, tako da smo najprej zmešali ustrezne volumne obeh LPS in mešanice stresali na vorteksu, nato še inkubirali 15 minut pri 56 °C. Potem smo jih ohladili na 4 °C in celoten postopek trikrat ponovili. Na koncu smo mešanice še 30 minut sonicirali. Na sliki 44 so mešanice podane z naslednjimi oznakami: 80Ba/20S, 20Ba/80S in 50Ba/50S. Razlaga se nahaja v legendi pod sliko. Potrebno je poudariti, da smo imeli opravka z dvema vrstama agregatov. Omenjene mešanice so vsebovale agregate z obema vrstama LPS, medtem ko so mešanice z oznakami Ba\*+S\*, S\*+Ba, Ba+S in S+Ba vsebovale dve različni vrsti agregatov. V eni so bili prisotni le Sa-LPS in v drugi le Ba-LPS. Vsi so bili pripravljene ločeno z zgoraj omenjeno trikratno ponovitvijo temperaturnega cikla in sonikacijo.

Rezultati, prikazani na sliki 44, kažejo, da brucelin LPS ne aktivira signalne poti TLR4 in ob prisotnosti Sa-LPS tudi ne inhibira njegovega delovanja. Verjetno se ne veže na MD-2. To smo pokazali tudi z meritvami v sistemu *in vitro* (slika 48).

## Vezava Ba-187 na MD-2

LPS se mora vezati na protein MD-2, da se nato lahko aktivira TLR4 signalna pot. Prejšnji rezultati so pokazali, da Ba-187 ne stimulira in ne inhibira imunskega odgovora in zato smo želeli preveriti, ali se Ba-187 sploh veže na MD-2. Ker vezave neposredno ni mogoče meriti, smo uporabili metodo izpodrivanja bis-ANS z MD-2.

Bis-ANS (1,1'-bis(anilino)-4,4'-bis(naftalen)-8,8'-disulfonat) je hidrofobno fluorescentno barvilo, katerega strukturna formula je prikazana na sliki 45. Bis-ANS se veže na hidrofobne površine in pri tem se mu poveča jakost fluorescence in povzroči t.i. modri premik emisijskega maksimuma fluorescence, zaradi česar je to barvilo zelo uporabno za določanje hidrofobnosti in vezavnih lastnosti proteinov. Bis-ANS se veže na protein MD-2, kar kaže na obstoj hidrofobne površine na tem proteinu. Ker ima MD-2 visoko afiniteto do bis-ANS, verjetno ne gre za nespecifično vezavo.

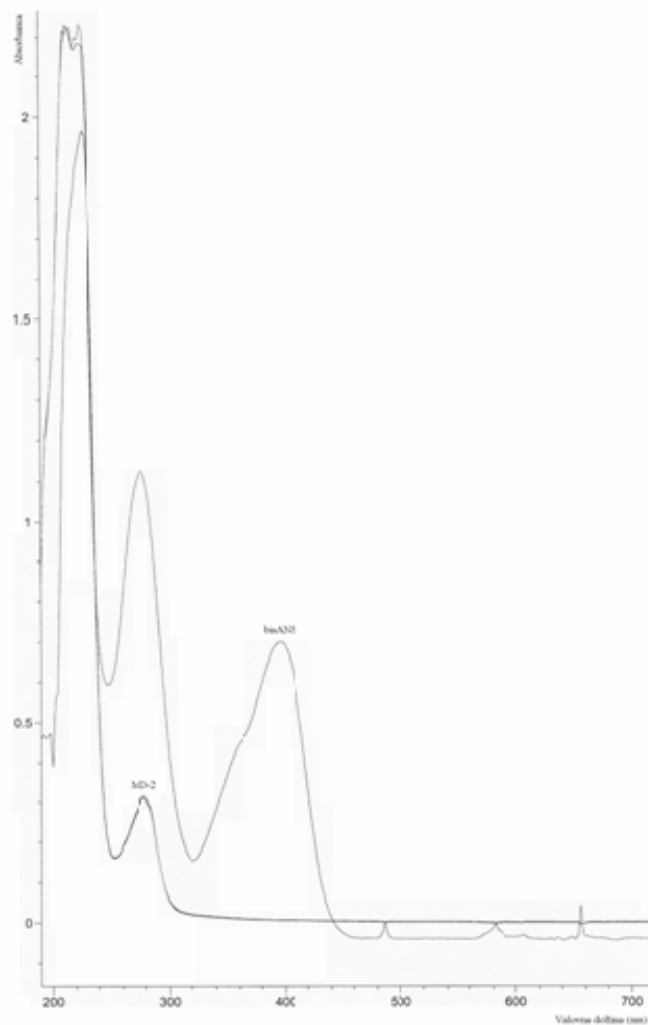


Slika 45: Osrednji del molekule bis-ANS je sestavljen iz naftalenskih obročev, ki dajejo molekuli hidrofoben značaj. Molekula ima zaradi protoniziranih sulfinitnih skupin dva negativnima naboja.

Glava lipida A je hidrofobna in ima negativne naboje tako kot bis-ANS, vendar pa je velikost lipida A zaradi maščobnih kislin seveda večja. Mesto na MD-2 za vezavo bis-ANS se prekriva z mestom za vezavo lipida A, zaradi česar bis-ANS in LPS tekmujeta za isto vezavno mesto. Stehiometrija vezave bis-ANS ali LPS na MD-2 je 1:1. Disociacijska konstanta bis-ANS je 6 nM (Manček-Keber in Jerala, 2006).

Pri diplomskem delu smo ugotavljali, ali Ba-187 izpodrine bis-ANS iz vezavnega mesta na proteinu MD-2, kar se vidi kot zmanjšanje fluorescence bis-ANS. V primeru, da se Ba-187 ne veže v hidrofobno vdolbino MD-2, se intenziteta fluorescence bis-ANS ne spremeni, saj bis-ANS ostane v hidrofobnem okolju.

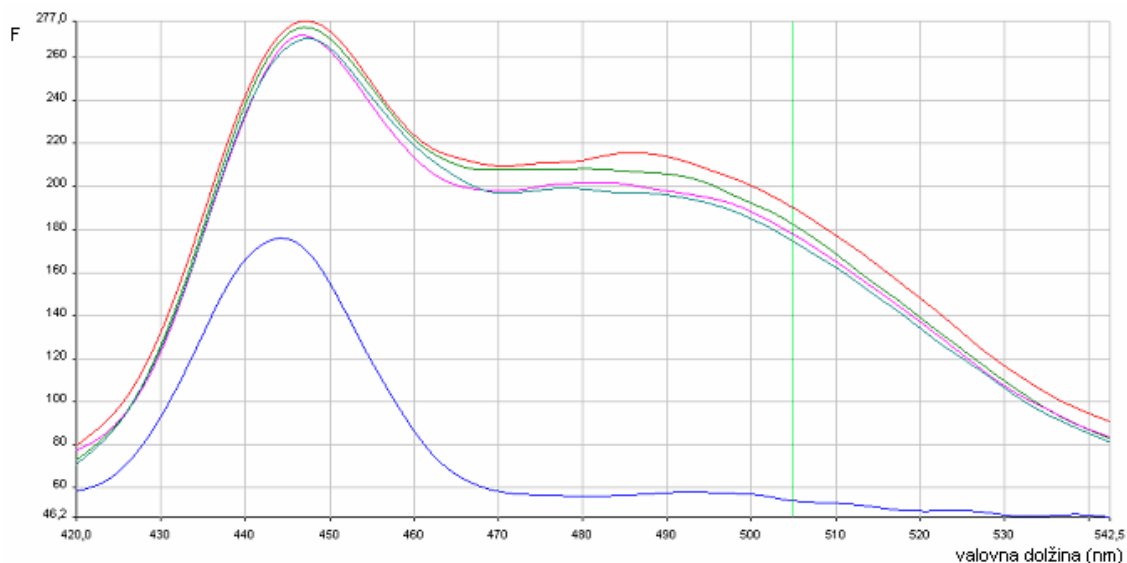
Najprej smo izračunali koncentracije MD-2 in bis-ANS. MD-2 in bis-ANS smo pripravili, kot je opisano v poglavju 3.2 Metode in izmerili njuno absorbanco s spektrofotometrom (slika 46) ter izračunali koncentraciji.



Slika 46: Absorpcijski spekter bis-ANS in MD-2;  $A_{280}(\text{MD-2}) = 0,29$ ,  $A_{385}(\text{bis-ANS}) = 0,65$ . Merjeno proti vodi.

Med merjenjem vezave bis-ANS na MD-2 smo opazili, da jakost fluorescence mešanice s časom pada. Na sliki 47 so s krivuljami prikazane fluorescence bis-ANS in mešanic bis-ANS in MD-2. Bis-ANS v območju 505 nm valovne dolžine ne fluorescira, kar kaže spodnja krivulja na sliki. Fluorescira šele v hidrofobnem okolju oziroma ob prisotnosti MD-2. Vendar fluorescenca mešanice s časom pada. Predvidevali smo, da je vzrok vezava bis-ANS na stene kivete in zato smo poskušali meriti fluorescenco kompleksa bis-ANS-MD-2 ob prisotnosti detergenta Pluronic 175.





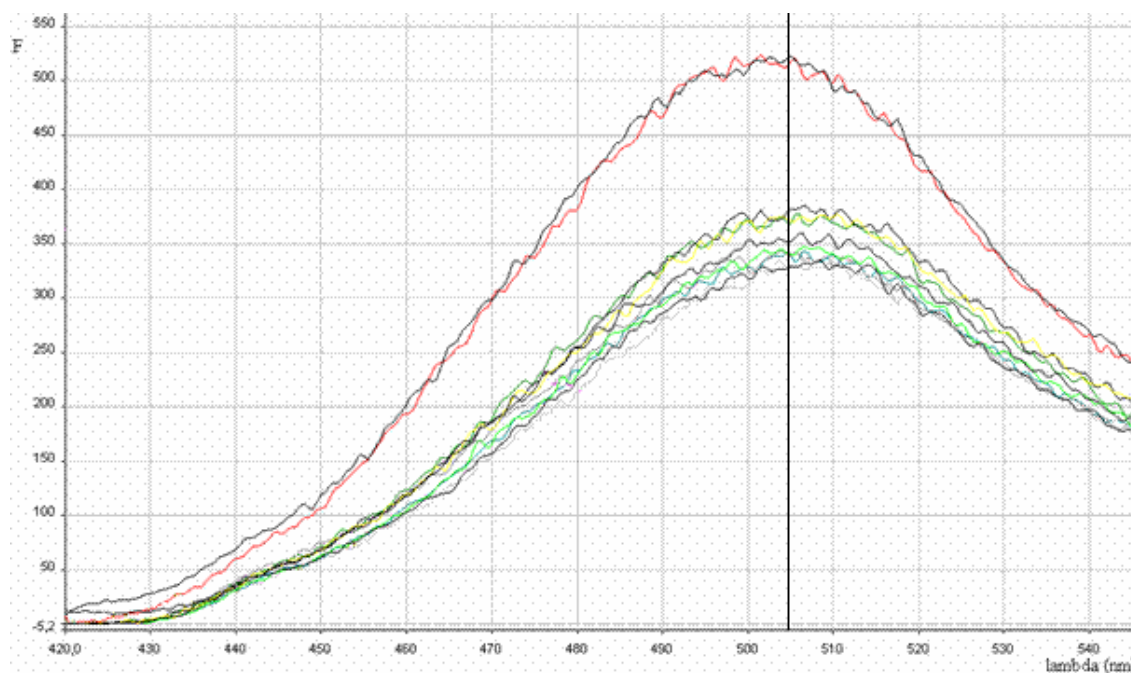
Slika 47: Emisijski spekter bis-ANS in MD-2. Spodnja krivulja prikazuje fluoresciranje 100 nM bis-ANS. Zgornje krivulje prikazujejo fluorescence mešanic 100 nM bis-ANS in 100 nM MD-2. V preglednici 13 so navedene vrednosti fluorescenc pri valovni dolžini 505 nm.

Preglednica 13: Opis krivulj iz slike 47.

F*	opis krivulj	barva krivulje
174,7	100 nM bis-ANS in 100 nM MD-2	rdeča
178,0	100 nM bis-ANS in 100 nM MD-2	zelena
182,6	100 nM bis-ANS in 100 nM MD-2	vijolična
190,4	100 nM bis-ANS in 100 nM MD-2	svetlo modra
53,0	100 nM bis-ANS	temno modra

F\* = fluorescenca vrha krivulje pri 505 nm

Pluronic P175 je amfifilna molekula (nejonski surfaktant) in je polimer polioksietilena in polioksipropilena. Uporaben je za razbijanje proteinskih agregatov, ki nastanejo ob združitvi hidrofobnih delov proteinov, saj se jim tako zmanjša interakcijska energija z okolico. Surfaktant naj bi tvoril interakcije s hidrofobnimi deli proteina in tako onemogočil oblikovanje agregatov. Pluronic P175 ima tudi lastnost počasnega sproščanja proteinov iz hidrogela, ki ga tvori pri ali nad sobno temperaturo (England, 1998). Vendar smo ugotovili, da detergent ustvari hidrofobno okolje, zaradi katerega bis-ANS bolje fluorescira. Zato Pluronic 175 ni primeren za preprečevanje upadanja fluorescence bis-ANS. Poskus merjenja jakosti fluorescence mešanice MD-2, bis-ANS in Ba-187 smo nadaljevali brez detergenta.



Slika 48: Emisijski spekter bis-ANS pri valovni dolžini vzbujanja 385 nm. Koncentracije MD-2 in bis-ANS so bile za vse krivulje enake, povečevali smo le koncentracijo Ba-187, kot je prikazano v preglednici 15.

Preglednica 14: Opis krivulj iz slike 48.

<b>F*</b>	<b>opis krivulj</b>	<b>barva krivulje</b>
330	200 nM MD-2, 200 nM bis-ANS, 200 nM Ba-187	svetlo siva
372	200 nM MD-2, 200 nM bis-ANS, 300 nM Ba-187	rumena
329	200 nM MD-2, 200 nM bis-ANS, 400 nM Ba-187	črna
352	200 nM MD-2, 200 nM bis-ANS, 500 nM Ba-187	črna
341	200 nM MD-2, 200 nM bis-ANS, 700 nM Ba-187	turkizna
339	200 nM MD-2, 200 nM bis-ANS, 2700 nM Ba-187	temno siva
522	200 nM MD-2, 200 nM bis-ANS, 27000 nM Ba-187	črna
516	200 nM MD-2, 200 nM bis-ANS, 54000 nM Ba-187	rdeča

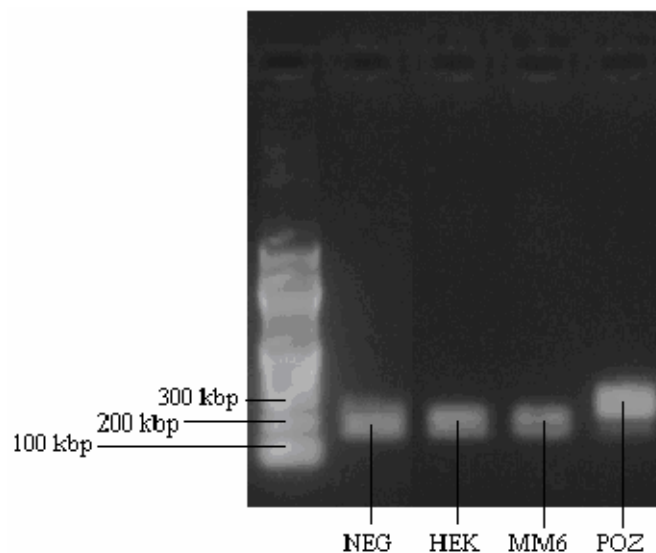
F\* = fluorescenca vrha krivulje pri 505 nm

V primeru, da bi se Ba-187 vezal v vdolbino MD-2 in izpodrival bis-ANS, bi se fluorescenca s povečevanjem koncentracije LPS nižala. Opazili smo, da se fluorescenca bis-ANS ni bistveno spreminjala (slika 48) oziroma se je ob znatnem povečanju koncentracije Ba-187 celo povečala. Možen razlog bi lahko bilo tvorjenje agregatov LPS, v katerega se bi ujel bis-ANS in v takšnem hidrofobnem okolju, bi se mu intenziteta fluorescence povečala.

## 4.8 UGOTAVLJANJE OKUŽBE CELIČNE LINIJE Z BAKTERIJAMI

### 4.8.1 Ugotavljanje okužbe z mikoplazmami

Želeli smo preveriti morebitno okužbo z mikoplazmami, saj bi prisotnost le-teh vplivala na rezultate pri poskusih. Prisotnost mikoplazem smo ugotavljali v supernatantu celičnih kultur HEK293 in MM6. S PCR namnoženo DNA smo pripravili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.8 Detekcija bakterij v celični kulturi. DNA smo nanegli na agarozni gel, izvedli elektroforezo in z UV svetlobo osvetljen gel slikali (slika 49).



Slika 49: Ugotavljanje okužbe z mikoplazmami. Na sliki gela je vidna pomnožena DNA iz supernatanta obeh celičnih kultur (HEK, MM6) ob negativni kontroli (NEG), pozitivni kontroli (POZ) in 100 kbp lestvici.

Rezultat za obe celični kulturi je bil negativen, kar je razvidno iz slike 49. Negativna kontrola vsebuje neinfektivno, plazmidno DNA in pozitivna kontrola neinfektivne fragmente DNA izolirane iz genoma *Mycoplasma orale*.

### 4.8.2 Ugotavljanje okužbe z drugimi bakterijami

Gojišče, v katerem smo gojili celice, smo centrifugirali in dodali k svežemu gojišču. Vzorce smo gojili na 37° C, 3 dni. V tem času nismo zaznali rasti bakterij (gojišče ni postalo motno). Pregled vzorcev pod mikroskopom pa tudi ni pokazal prisotnosti bakterij.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Človek je neprestano v neposrednem stiku z mikroorganizmi, ki se nahajajo na koži in sluznicah. Njihovo število na teh površinah kar desetkrat presega število vseh človeških celic. Bolezenska stanja so kljub temu relativno redka, za kar gre zasluga obrambnim mehanizmom naravne ali prirojene imunosti. Vseeno pa mikroorganizmi lahko prečkajo naravne bariere in povzročijo okužbo, ki v določenih primerih lahko napreduje v sepsu, hudo sepsu ali septični šok. Drugi najpogostejši povzročitelji teh bolezenskih stanj so gramnegativne bakterije, ki imajo v zunanji membrani lipopolisaharid (LPS), ki se sprošča iz bakterije med njeno rastjo, razmnoževanjem in v večjih količinah po smrti bakterije. LPS se veže na receptorski kompleks MD-2/TLR4 na površini makrofagov. Določeni kemotipi LPS nato sprožijo vrsto kaskadnih reakcij v notranjosti celice, ki med drugim povzročijo sintezo vnetnih citokinov (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6 itd.). Vrsta in količina citokinov odloča o nadaljnjem poteku vnetnega odgovora. Prekomerne koncentracije citokinov lahko povzročijo nenormalno regulacijo imunskega odziva.

Ali bo določen LPS sprožil imunski odgovor je odvisno od strukture molekule. Za nekatere bakterije so pokazali, da spreminjajo aciliranost lipidov A glede na okoljske pogoje. Eden od teh je temperatura. Temperaturno regulacijo sinteze membranskih komponent bakterij poznamo tudi pri fosfolipidih. Pri višjih temperaturah večinoma sintetizirajo več nasičenih maščobnih kislin kot pri nižjih temperaturah, kar ima za posledico drugačno obliko molekule. Fosfolipidi v membrani bakterij imajo namreč 1,6 krat več nasičenih maščobnih kislin pri 37 °C kot pri 20 °C. Vendar je posledica spremembe nasičenosti maščobnih kislin v fosfolipidih v tem primeru večja ali nižja fluidnost oziroma rigidnost membrane. S tem se doseže optimalen transport topljencev in pomeni temperaturno prilagoditev. Spremembo aciliranosti lipida A pa bakterije regulirajo z namenom zmanjšanja gostiteljevega imunskega odgovora na LPS. Tako si povečajo možnost za preživetje v gostiteljskem organizmu.

Tudi *Yersinia pestis* se v svojem življenjskem ciklu sooča z različnimi temperaturami, ko se srečuje z imunskimi mehanizmi gostiteljev (npr. bolha, človek). Bolhe vzdržujejo svojo notranjo temperaturo pri 21 °C, pri kateri *Y. pestis* proizvaja visoko acilirane lipide A. Po prehodu v človeški organizem s telesno temperaturo 37 °C pa bakterija preklopi na sintezo tetraaciliranega lipida A (Miller in sod., 2005). Takšen lipid A nima stimulatornega učinka na človeški imunski sistem, zato *Y. pestis* povzroča veliko hujše oblike bolezni kot *Y. enterocolitica*, ki se preneša po fekalno-oralni poti. Molekula lipida A *Y. enterocolitica* sintetizirana pri 37 °C ima višjo stopnjo acilacije lipida A kot *Y. pestis* pri isti temperaturi in zato boljše aktivira kompleks MD-2/TLR4.

Vendar pa je vzrok za spremembo aciliranosti lipida A mogoče iskati tudi v drugih faktorjih poleg temperature. Sinteza LPS *Salmonella* in *Yersinia* je regulirana s senzorkinaznim PhoP-PhoQ sistemom, kar pomeni, da razlike v gojišču (pH, koncentracija Mg<sup>2+</sup>, prisotnost kationskih peptidov, prisotnost kisika itd.) narekujejo acilacijo, deacilacijo, hidroksilacijo lipida A. Dokazali so, da je na primer prisotnost C16 maščobne kisline sekundarno vezane na drugo verigo v lipidu A tudi regulirana s PhoP-

PhoQ sistemom pri *Salmonella*, ki ima heptaacilni lipid A (Caroff in Karibian, 2003; Miller, 2005). Posledica drugačne sestave gojišč lahko pomeni preklap sinteze iz npr. tetraacilnega lipida A v heksaacilni lipid A, ki boljše stimulira imunski odgovor. Tudi Rebeil in sod. (2004) poročajo o neskladnostih pri strukturah LPS jersinij gojenih pri istih temperaturah.

V diplomskem delu smo poskušali ugotoviti vpliv strukturno različnih LPS na imunski odgovor in proizvodnjo citokinov. Različni LPS namreč različno aktivirajo celice, kar je posledica specifičnih interakcij med receptorji, še posebej med MD-2 in posameznim kemotipom LPS.

V prvem delu diplomske naloge smo preverjali odziv celic (kot jakost relativne luciferazne aktivnosti) na stimulacijo z različnimi LPS. Rezultati so bili za nekatere LPS nenavadni. Na primer lipid 506, ki je heksaaciliran in ima stožčasto obliko naj bi bil optimalen za indukcijo imunskega odziva (Netea, 2002), vendar je v našem primeru slabše aktiviral celice kot LPS. Vzrok za nižjo aktivnost je lahko odsotnost oligosaharidov, ki verjetno tudi sodelujejo pri interakciji LPS in proteina MD-2 in kompleksa LPS-MD-2 s TLR4.

Pričakovali bi slabšo stimulacijo pretežno penta-, tetra- in triacilnih LPS (preglednica 15). Zanimivo je, da so se mešanice tri-, tetra-, penta-, heksa- in heptaacilnih LPS izoliranih iz jersinij in heptaacilni LPS iz salmonele izkazali za biološko najbolj aktivne in da med njimi v aktivnosti ni bilo bistvenih razlik.

Preglednica 15: Aciliranost LPS.

acilirano	Ec-003	Ec-004	506	Ec-006	Sa-LPS	Yp001 (26 °C)	Ye3-002 (26 °C)	Ye3-003 (37 °C)
hepta					predvsem		9 %	
heksa			100 %			9 %	54 %	33,2 %
araN heksa							11 %	
penta	predvsem	91,7 %		29,1 %		10 %		7,4 %
araN penta								3,8 %
tetra		8,3 %		54,2 %		40 %	18 %	34,3 %
araN tetra						7 %		
tri				16,7 %		30 %		

araN = arabinozamin

Na podlagi sestave Ye3-002 in Ye3-003 smo predvidevali, da bo imel LPS bakterije *Yersinia enterocolitica* (Ye3-003), ki je bil sintetiziran pri 37 °C, manjšo aktivnost kot pretežno heksaacilni LPS iz *Yersinia enterocolitica*, ki je bil sintetiziran pri 26 °C. Oba izolata LPS pa še vedno vsebujeta velik delež heksaacilnega lipida A (preglednica 15). Glede na to, da so drugi laboratoriji pokazali drugačno sestavo LPS pri 37 °C, verjetno naš vzorec, ki smo ga dobili, ni bil optimalno pripravljen (Rebeil in sod., 2004).

Predvsem za Yp-001, ki ima le 9 % heksaacilnega lipida A, smo pričakovali nižji odziv. Vendar smo ugotovili, da vsi trije LPS jersinij aktivirajo celice v približno enaki meri. Mogoče je pri koncentraciji 100 ng LPS/ml v vseh treh primerih še vedno prisotne

dovolj heksaacilne oblike, da v takšni meri aktivira celice in bi morali poskus ponoviti z manjšimi koncentracijami LPS, da bi bile razlike med njimi opazne.

Na aktivnost pa vpliva tudi razmerje različno aciliranih LPS v agregatih. Določen delež tetraacilnega LPS v heksaacilnih agregatih poveča aktivnost heksaacilnega. Naravni lipid A je zelo heterogen v sestavi in različne oblike agregatov LPS imajo različno biološko aktivnost. Opazili so, da ima čisti sintetični heksaacilni lipid A manjšo biološko aktivnost kot lipid A, izoliran iz bakterije. Verjetno so v agregatih izoliranega lipida A prisotni tudi drugi LPS, ki omogočajo lažje sproščanje lipida A iz agregatov in to je lahko vzrok za večjo biološko aktivnost. Sintetičnemu heksaacilnemu lipid A so povečali aktivnost, tako da so pripravili mešane agregate, ki so vsebovali do 20 % tetraacilnega LPS (Mueller in sod, 2004). Tudi to je lahko vzrok za nižjo aktivnost lipida 506 v primerjavi z drugimi LPS.

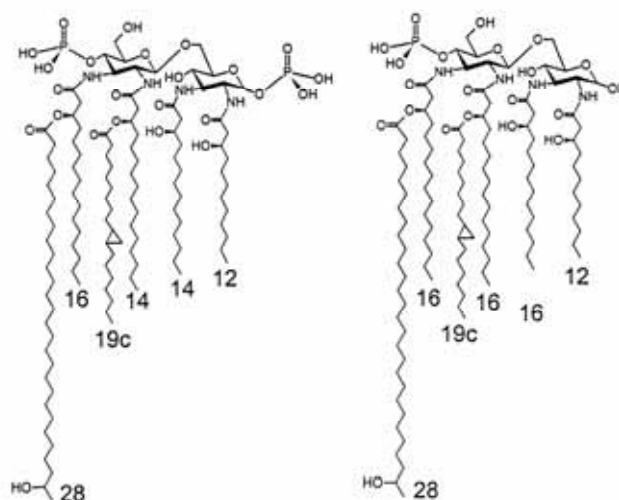
Vseeno je heksaacilni lipid A potreben za večjo stimulacijo celic. Ec-003, Ec-004 in Ec-006, ki nimajo heksaacilnega lipida A so v manjši meri aktivirali celice.

LPS bakterij *Brucella abortus*, *B. melitensis* in *Ochrobactrum anthropi*, ki so strukturno zelo podobni, imajo heksaacilne LPS in naj bi zato aktivirali TLR4 pot. Vendar je bil odziv celic v vseh treh primerih podoben kot v celicah, katerim ni bil dodan LPS (slika 18).

Zato nas je zanimalo, ali je neaktivnost posledica inhibitornega učinka ali pa se LPS sploh ne veže na MD-2. Inhibitoren učinek Ba-187 LPS na aktivacijo celic ob prisotnosti salmonelinega LPS smo preverili tako, da smo oba LPS zmešali v različnih razmerjih in te mešanice dodali celicam (slika 44). Rezultati so pokazali, da Ba-187 nima vpliva na aktivacijo s Sa-LPS. Nato smo želeli ugotoviti, ali se brucelin LPS sploh veže v hidrofobni žep MD-2. To smo naredili, tako da smo merili sposobnost Ba-187, da izpodrine bis-ANS, vezan na MD-2. Intenziteta fluorescence bis-ANS naraste le, če je vezan v hidrofobni žep proteina. Če bi se Ba-187 vezal na MD-2, bi izpodrnil bis-ANS in fluorescenca bi padla. Ker se fluorescenca vzorcev kljub povečevanju koncentracije Ba-187 ni bistveno spreminjala, lahko zaključimo, da brucelin LPS ne izpodriva bis-ANS iz vezavnega mesta na MD-2 oziroma se ne veže v hidrofoben žep MD-2.

Ugotovili smo, da šele koncentracija 500 µg/ml Ba-187 (slika 15) stimulira celice v približno enaki meri kot Sa-LPS s koncentracijo 10 ng/ml, kar pomeni kar 50.000-kratno razmerje. Zanimivo je, da takšna koncentracija ni vplivala na preživetje celic, kar pokaže odziv renilla-luciferaze (ni prikazano), in zato Ba-187 ni toksičen za celice.

Bakterijam *Brucella abortus*, *B. melitensis* in *Ochrobactrum anthropi* je skupno, da imajo v LPS eno verigo z 28 ogljikovimi atomi (slika 50). Verjetno zaradi izredne dolžine acilne verige LPS ne sede v žep proteina MD-2. Zato tak LPS ne sproži imunskega odgovora niti po od MyD88-neodvisni poti, kar lahko razberemo iz sinteze citokinov, ki so inducirani po tej poti. Vendar organizem še vedno prepozna žive brucele, kar pomeni, da je biološko aktivna neka druga bakterijska komponenta. Giambartolomei in sod. (2004) navajajo, da so lipoproteini in ne LPS glavni mediatorji imunosti pri *B. abortus*. V procesu prepoznavanja pa sodeluje TLR2 receptor.



Slika 50: Struktura lipidov A bakterije *Brucella* in *Ochrobactrum*, ki se od drugih lipidov A razlikujeta predvsem po eni dolgi verigi z 28-imi C atomi (Moriyon, 2005).

Zanimiv je podatek, da je od 1055 genov odzivnih na LPS le 21,5 % odvisnih od MyD88-odvisne poti, z od MyD88-neodvisno potjo pa se jih aktivira kar 74,7 % (Björkbacka in sod., 2004). Pri našem merjenju aktivacije od MyD88-neodvisne poti z merjenjem relativne luciferazne aktivnosti s posameznimi LPS se je na žalost izkazalo, da reporterski sistem pISRE ni ustrezen in bi morali poskus ponoviti z drugim sistemom.

V nadaljevanju smo merili koncentracije citokinov, ki so bili sintetizirani v monocitih oziroma makrofagih po stimulaciji z različnimi LPS. Zanimala nas je predvsem razlika v količini citokinov, ki se sintetizirajo po aktivaciji od MyD88-odvisne oziroma – neodvisne poti. NF- $\kappa$ B je transkripcijski aktivator vnetnih citokinov: TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ , ki veljajo za »od MyD88-odvisne« citokine, »od MyD88-neodvisni« pa so IP-10, MCP-1, IFN- $\gamma$  in RANTES. (Sankar in sod., 2006; Serbina in sod., 2003; Zughailer in sod., 2005).

LPS salmonele in jersinij so se ponovno izkazali za biološko najbolj aktivne, saj so inducirali največjo sintezo vnetnih citokinov (slike 34, 35 in 36). Zanimivo je, da je tokrat komponenta 506 stimulirala visoko izražanje vnetnih citokinov v primerjavi z drugimi LPS, kar smo tudi pričakovali. Sinteza vnetnih citokinov IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  in IL-6 je dober pokazatelj biološke aktivnosti LPS in je v primeru komponente 506, LPS jersinij in salmonele povečana. IL-1 in TNF $\alpha$  sta zgodnja citokina, ker se pričneta izločati iz celic nekaj minut po okužbi. Nekaj ur po okužbi pa koncentraciji obeh padeta na bazalno raven. TNF $\alpha$ , ki ga včasih označujejo za primarnega mediatorja septičnega šoka, pozitivno deluje na proizvodnjo IL-1, ki zato doseže koncentracijski maksimum kmalu za maksimumom TNF $\alpha$ . Le-ta pa ojača sintezo IL-6, ki je ravno tako mediator akutne faze (Gorvel in Moreno, 2002). Omenjena povezanost med naštetimi citokini se lepo vidi na slikah 34, 35 in 36, na katerih je prikazan rezultat vpliva različnih LPS na sintezo IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF $\alpha$  v celični liniji MM6, gojeni v gojišču z 10 % telečjim serumom. Makrofagi, ki so nastali z diferenciacijo iz monocitov, so izločali majhne količine IL-1, medtem ko so bile koncentracije TNF $\alpha$  nezaznavne.

TNF $\alpha$  je pomemben tudi zato, ker direktno aktivira efektorske celice in tako omeji razmnoževanje intracelularnih bakterij, kot so omenjeni jersiniji in salmonela (Gorvel in Moreno, 2002).

V borbi proti znotrajceličnim parazitom sodeluje tudi IL-12, katerega koncentracije so bile pri poskusu z makrofagi visoke za LPS salmonele in jersinije, ki so intracelularne bakterije, vendar je bil velik odziv tudi pri LPS *E. coli* in komponente 506. Le LPS intracelularnih brucel in okrobaktruma niso aktivirali sinteze IL-12 verjetno že iz omenjenih razlogov.

Če povzamemo, je test s citokini podobno kot prejšnji poskusi pokazal, da LPS brucele in okrobaktruma niso komponente, ki aktivirajo imunski sistem, saj so večinoma inducirali sintezo citokinov v nizkih koncentracijah.

Možen vzrok poleg zgoraj navedenih bi lahko bil tudi zadrževanje teh LPS v membrani celic. Pokazali so namreč, da se brucelin LPS, ki ga zajame makrofag, reciklira na površino membrane in poveže v makrodomene (Lapaque in sod., 2006; Forestier in sod., 1999).

Bistvene razlike med 12- in 24-urno inkubacijo v aktivaciji monocitov z LPS in poskusom z 10 % telečjim serumom in 1 % človeškim serumom nismo opazili.

V diplomskem delu smo ugotavljali le aktivnost lipidov A oziroma LPS različnih bakterij, vendar je za imunski odgovor pomembnih več komponent patogena. Vedno bolj pa se daje pomen tudi komunikaciji med bakterijami in gostiteljskimi celicami saj naj bi bakterije v gostiteljskem organizmu sintetizirale molekule, ki so podobne kemokinom in jih nekateri imenujejo bakteriokini. Ti lahko v določeni meri uravnavajo imunski odgovor. Henderson in sod. (1996) so pokazali, da določene transgene miške z mutacijami v genih za IL-2 in IL-10 poginejo zaradi imunskega odgovora na lastno normalno bakterijsko floro. Komenzalne in patogene bakterije proizvajajo vrsto različnih molekul, ki so sposobne inducirati vnetne ali protivnetne citokine, poleg tega pa tudi komponente mikroorganizmov igrajo pomembno vlogo v interakciji z gostiteljskim organizmom. Zato stimulacija z LPS pokaže le del imunskega odgovora na bakterijo in je pomembna predvsem za razumevanje pomena strukturno različnih LPS v aktivaciji imunskega sistema.



## 5.2 SKLEPI

- Metoda preverjanja biološke aktivnosti LPS z luciferaznim reporterskim sistemom je učinkovita.
- Plazmidni sistem pISRE za ugotavljanje aktivacije od MyD88-neodvisne poti ni ustrezen.
- LPS brucel (Ba-187, Bm-046) in okrobaktruma (Oa-001) se ne vežejo na protein MD-2.
- LPS brucel (Ba-187, Bm-046) in okrobaktruma (Oa-001) ne aktivirajo signalizacije preko receptorjev TLR/MD-2.
- Luciferazni reporterski sistem je pokazal, da so LPS jersinij (Yp-001, Ye3-002, Ye3-003) in salmonele (Sa-LPS) biološko najbolj aktivni izmed testiranih LPS, vendar bi morali poskus ponoviti pri nižjih koncentracijah LPS, da bi bile med njimi bolje vidne razlike v aktivaciji celic.
- LPS izolirani iz jersinije (Yp-001, Ye3-002, Ye3-003) in salmonele (Sa-LPS) v monocitih najbolj inducirajo sintezo IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF $\alpha$ .

## 6 POVZETEK

Večcelični organizmi so skozi evolucijo razvili imunski sistem, ki se je sposoben obraniti mnogih patogenov. Pred tem pa jih mora prepoznati. Za to so zadolžene nekatere celice imunskega sistema, ki prepoznajo posamezne sestavne dele patogena, kot je na primer LPS, ki se nahaja v zunanji membrani gramnegativnih bakterij in se sprošča med razmnoževanjem in rastjo bakterije ter v večjih količinah po smrti bakterije. V primeru, da LPS zaide v človeški organizem se sreča s proteini LBP, CD-14, MD-2 in TLR4, ki igrajo pomembno vlogo pri prepoznavanju LPS. Pri tem sta nepogrešljiva proteina MD-2 in TLR4, ki tvorita receptorski kompleks na površini celice in ta kompleks lahko v odgovor na mnoge kemotipe LPS sproži signalne poti v notranjosti celice, katere posledica je sinteza ter izločanje različnih citokinov v različnih količinah. Če je takšen imunski odziv neustrezno reguliran, lahko vodi v bolezensko stanje imenovano sepsa. Poznavanje mehanizmov interakcij med LPS in receptorji ter poznavanje signalnih poti je torej eno ključnih za razumevanje in zdravljenje ter preprečevanje sepse.

Različni LPS se razlikujejo v biološki aktivnosti in zato sprožijo imunski odziv v različni meri. V našem delu smo ugotavljali in primerjali vpliv LPS izoliranih iz bakterij *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Salmonella abortus Equi*, treh sevov *E. coli*, *Yersinia pestis* in dveh sevov *Y. enterocolitica* ter sintetičnega lipida A na sintezo citokinov v človeških celičnih kulturah HEK293 in MM6. Luciferazni reporterski sistem je pokazal, da LPS brucel in okrobaktruma ne aktivirata od MyD88-odvisne signalne poti preko receptorjev MD-2/TLR-2. S poskusom s hidrofobnim fluorescentnim barvilom bis-ANS, ki se veže v hidrofobni žep MD-2 smo pokazali, da se brucelin LPS ne veže s proteinom MD-2. Verjetno je vzrok za to dolga acilna veriga, ki je drugi testirani LPS nimajo. Vseeno pa bakterija *Brucella* lahko povzroči sepsa. Očitno obstaja še neka druga signalna pot ali komponenta bakterije, ki lahko aktivira sintezo citokinov v tolikšni meri.

Za LPS jersinij in salmonele pa je luciferazni reporterski sistem pokazal, da so to biološko najbolj aktivni izmed testiranih LPS, vendar bi morali poskus ponoviti pri nižjih koncentracijah LPS, da bi bile med njimi boljše vidne razlike v aktivaciji celic. Ti LPS so v monocitih tudi najboljše inducirali sintezo vnetnih citokinov IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF $\alpha$ , ki igrajo pglavitno vlogo pri imunskem odzivu.

## 7 VIRI

- Aderem A., Ulevitch R.J. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406: 782-787
- Andlovic A. 2002. Jersinije. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikrobiologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 205-209
- Andlovic A. 2002. Salmonele, šigele. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikrobiologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 205-209
- Aurell C.A., Wistrom A. O. 1998. Critical aggregation concentrations of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253: 119-123
- Backhed F., Normark S., Schweda E. K. H., Oscarson S., Richter-Dahlfors A. 2003. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signaling: a biological role for LPS modifications. *Microbes and Infection*, 5: 1057-1063
- Berg G., Eberl L., Hartmann A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7, 11: 1673-1685
- Bizjak V. 2006. Uporaba pretočne citometrije za spremljanje karakteristik celic CHO v bioprosesih. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 76 str.
- Björkbacka H., Fitzgerald K.A., Huet F., Li X., Gregory J.A., Lee M.A., Ordija C.M., Dowley N.E., Golenbock D.T., Freeman M.W. 2004. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes MyD88-independent signaling cascades. *Physiological Genomics*, 19: 319-330
- Caroff M., Karibian D. 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 338: 2431-2447
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420: 885-891
- Cook E.B., Stahl J.L., Lowe L., Chen R., Morgan E., Wilson J., Varro R., Chan A., Graziano F.M., Barney N.P. 2001. Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics. *Journal of Immunological Methods*, 254: 109-118
- Darveau R.P. 1998. Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 36-42
- England J.L. 1998. Stabilisation and release effects of Pluronic F127 in protein drug delivery. *Journal of Undergraduate Sciences*, 5, 2: 17-25

- Fujihara M., Muroi M., Tanamoto K., Suzuki T., Azuma H., Ikeda H. 2003. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharides: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics*, 100: 171-194
- Forestier C., Moreno E., Meresse S., Phalipon A., Olive D., Sansonetti P., Gorvel J-P. 1999. Interaction of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. *Infection and Immunity*, 67, 8: 4048-4054
- Forestier C., Moreno E., Pizarro-Cerda J., Gorvel J-P. 1999. Lysosomal accumulation and recycling of lipopolysaccharide to the cell surface of murine macrophages, an in vitro and in vivo study. *American Association of Immunologists*, 162: 6784-6791
- Franciotta D., Martino G., Zardini E., Furlan R., Bergamaschi R., Andreoni L., Cosi V. 2001. Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *Journal of Neuroimmunology*, 115: 192-198
- Gangloff M., Gay N.J. 2004. MD-2: the Toll »gatekeeper« in endotoxin signalling. *Trends in Biochemical Sciences*, 29, 6: 294-300
- Giambartolomei G.H., Zwerdling A., Cassataro J., Bruno L., Fossati C.A., Philipp M.T. 2004. Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *Journal of Immunology*, 173: 4635-4642
- Gorbet M.B., Sefton M.V. 2005. Endotoxin: The uninvited guest. *Biomaterials*, 26: 6811-6817
- Gorvel J.P., Moreno E. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, 90: 281-297
- Gruber A., Manček M., Wagner H., Kirschning C.J., Jerala R. 2004. Structural model of MD-2 and functional role of its basic amino acid clusters involved in cellular lipopolysaccharide recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 29: 28475-82
- Gubina M. 2002. Bakteriemiija in sepsa. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikrobiologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 343-348
- Guha M., Mackman N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*, 13: 85-94
- Hajjar M., Ernst R.K., Tsai J.H., Wilson C.B., Miller S.I. 2002. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nature Immunology*, 3, 4: 354-359
- Hayden M.S., Ghosh S. 2004. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes & Development*, 18: 2195-2224
- Henderson B., Poole S., Wilson M. 1996. Microbial/host interactions in health and disease: Who controls the cytokine network? *Immunopharmacology*, 35: 1-21

- Heumann D., Roger, T. 2002. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Acta*, 323: 59-72
- Holst O., Ulmer A.J., Brade H., Flad H.D., Rietschel, E.T.H. 1996. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 16: 83-104
- Hornef M.W., Wick M.J., Rhen M., Normark S. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 3, 11: 1033-1040
- Moriyon I. 2005. Lipopolysaccharides. Research report. Spain, Department of microbiology and parasitology, University of Pamplona; 6 str.
- Jiang Z., Georgel P., Du X., Shamel L., Sovath S., Mudd S., Huber M., Kalis C., Keck S., Galanos C., Freudenberg M., Beutler B. 2005. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nature Immunology*, 6, 6: 565-570
- Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H., Lindner B., Matsuura M. 2002. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. *Infection and Immunity*, 70, 8: 4092-4098
- Kim J., Lee C.J., Jin M.S., Lee C., Paik S., Lee H., Lee J. 2005. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *Journal for Biological Chemistry*, 280, 12: 11347-11351.
- Knirel Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V., Fursova N.K., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Balakhonov S.V., Holst O., Gremyakova T.A., Pier G.B., Anisimov A.P. 2005. Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. *Biochemistry*, 44: 1731-1743
- Lapaque N., Forquet F., de Chastellier C., Mishal Z., Jolly G., Moreno E., Moriyon I., Heuser J.E., He H.T., Gorvel J.P. 2006. Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts. *Cell Microbiology*, 8, 2: 197-206
- Maghazachi E. 1996. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *European Journal of Immunology*, 26: 315-319.
- Majerle A., Kidrič J., Jerala R. 1999. Expression and refolding of functional fragments of the human lipopolysaccharide receptor CD14 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 17: 96-104
- Manček M., Jerala R. 2006. Structural similarity between the hydrophobic fluorescent probe and lipid A as a ligand of MD-2. *FASEB Journal*, 20: 1836-1842
- Manček M., Pristovšek P., Jerala R. 2002. Identification of LPS-binding peptide fragment of MD-2, a toll-receptor accessory protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292, 4: 880-885

- McInnis K.A., Britain A., Lausch R.N., Oakes J.E. 2005. Synthesis of  $\alpha$ -chemokines IP-10, I-TAC and MIG are differentially regulated in human corneal keratocytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46: 1668-1674
- Medzhitov R., Janeway C. 2000. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology*, 8, 10: 452-456
- Miller S.I., Ernst R.K., Bader M.W. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature*, 3: 36-46
- Miyake K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends in Microbiology*, 12, 4: 186-192
- Miyake K. 2003. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *International Immunopharmacology*, 3: 119-128
- Mizushima S., Nagata S. 1990. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Research*, 18, 17: 5322
- Moynagh P.N. 2005. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF- $\kappa$ B pathway. *Trends in Immunology*, 26, 9: 469-476
- Mueller M., Lindner B., Kusumoto S., Fukase K., Schromm A.B., Seydel U. 2004. Aggregates are the biologically active units of endotoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 25: 26307-26313
- Netea M.G., Van Deuren M., Kullberg B.J., Cavaillon J.M., Van der Meer J.W.M. 2002. Does the shape of lipid A determine the interactions of LPS with Toll-like receptors? *Trends in Immunology*, 22, 3: 135-139
- Neville L. F., Mathiak G., Bagasra O. 1997. The immunology of Interferon-gamma Inducible Protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 8, 3: 207-219
- Pålsson-McDermott E.M., O'Neill L.A.J. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor 4. *Immunology*, 113: 153-162
- Prior J.L., Hitchen P.G., Williamson E.D., Reason A.J., Morris H.R., Dell A., Wren B.W., Titball R.W. 2001. Characterization of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. *Microbial Pathogenesis*, 30: 49-57
- Promega. 2005. Dual-luciferase reporter 1000 assay system: technical manual. Madison, ZDA, Promega. (maj 2005)  
<http://www.promega.com/tbs/tm046/tm046.pdf> (julij 2005): 24 str.
- Rebeil R., Ernst R.K., Gowen B.B., Miller S.I., Hinnebusch B.J. 2004. Variation in lipid A structure in the pathogenic yersiniae. *Molecular Biology*, 52, 5: 1363-1373
- Saitoh S., Akashi S., Yamada T., Tanimura N., Kobayashi M., Konno K., Matsumoto F., Fukase K., Kusumoto S., Nagai Y., Kusumoto Y., Kosugi A., Miyake K. 2004.

- Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *International Immunology*, 16, 7: 961-969
- Sakaguchi S., Negishi H., Asagiri M., Nakajima C., Mizutani T., Takaoka A., Honda K., Taniguchi T. 2003. Essential roles of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon- $\beta$  gene expression and endotoxic shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306: 860-866
- Sankar S., Chan H., Romanow W.J., Li J., Bates R.J. 2006. IKK-i signals through IRF3 and NF- $\kappa$ B to mediate the production of inflammatory cytokines. *Cellular Signaling*, 18: 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: 891-901
- Singleton P., Sainsbury, D. 1999. *Dictionary of microbiology and molecular biology*. 2<sup>nd</sup> ed. Chichester, John Wiley & Sons: 1019 str.
- Takeda K., Akira S. 2004. Microbial recognition by toll-like receptors. *Journal of Dermatological Science*, 34: 73-82
- Tam S.W., Wiese R., Lee S., Gilmore J., Kumble K.D. 2002. Simultaneous analysis of eight human Th1/Th2 cytokines using microarrays. *Journal of Immunological Methods*, 261: 157-165
- Tanamoto K., Azumi S. 2000. Salmonella-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of lipopolysaccharide action on human line cells. *American Association of Immunologists*, 164: 3149-3156
- Triantafyllou M., Triantafyllou K. 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in Immunology*, 23, 6: 301-304.
- Tsan M-F., Gao B. 2004. Endogenous ligands of toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 76: 514-519
- Ulloa L., Tracey K. J. 2005. The »cytokine profile«: a code for sepsis. *Trends in Molecular Medicine*, 11, 2: 56-63
- Velasco J., Bengoechea J.A., Brandenburg K., Lindner B., Seydel U., Gonzales D., Zähringer U., Moreno E., Moriyon I. 2000. *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infection and Immunity*, 68, 6: 3210-3218
- Vignali D.A.A. 2000. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *Journal of Immunological Methods*, 243: 243-255
- Vozelj M. 2000. *Temelji imunologije*. Ljubljana, DZS: 551 str.

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

Yoshimura et al. 1989. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Letters*, 244: 487-493.

Zughaier S.M., Zimmer S.M., Datta A., Carlson R.W., Stephens D.S. 2005. Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. *Infection and Immunity*, 73, 5: 2940-2950



## ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorju prof. dr. Romanu Jerali za dano priložnost delati na zelo zanimivi temi in pri usmerjanju tekom nastajanja diplomske naloge.

Hvala dr. Mateji Manček – Keber za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela in za vse podrobne in koristne nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Mentorici prof. dr. Mojci Narat se zahvaljujem za temeljit pregled diplomske naloge.

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem prof. dr. Alojzu Ihanu, dr. med.

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

Posebna zahvala gre mojim staršem in vsem mojim prijateljem za vso podporo v času študija.