

**J3-6784 Molekularni mehanizem signalizacije enoverižne DNA preko znotrajceličnega Tollu-podobnega receptorja 9 / The molecular mechanism of single stranded DNA signaling via intracellular Toll-like receptor 9**

*Vodja projekta*

---

Dr. Mojca Benčina

*Osnovni podatki glede financiranja:*

---

Projekt financira ARRS v okviru cenovne kategorije D za obdobje treh let v obsegu 2472 letnimi urami. Pričetek financiranja je 1. 7. 2014. Zaključek 30.6.2017

*Sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS*

---

Na Kemijskem inštitutu v projektni skupini J3-6784 sodelujejo:

Benčina Mojca	<a href="http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=8380">http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=8380</a>
Forstnerič Vida	<a href="http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=39144">http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=39144</a>
Gradišar Helena	<a href="http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&amp;lang=slv&amp;id=10174">http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&amp;lang=slv&amp;id=10174</a>
Horvat Simon	<a href="http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&amp;lang=slv&amp;id=6972">http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&amp;lang=slv&amp;id=6972</a>
Jerala Roman	<a href="http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&amp;lang=slv&amp;id=5855">http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&amp;lang=slv&amp;id=5855</a>
Lainšček Duško	<a href="http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=38518">http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=38518</a>
Lonzarič Jan	<a href="http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&amp;lang=slv&amp;id=35834">http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&amp;lang=slv&amp;id=35834</a>
Pohar Jelka	<a href="http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=34886">http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=34886</a>
Andreja Majerle	<a href="http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=10176">http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=10176</a>
Iva Hafner Bratkovič	<a href="http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=16734">http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=16734</a>
Tina Lebar	<a href="http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=38797">http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=38797</a>
Tina Fink	<a href="http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=40263">http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=40263</a>
Alja Oblak	<a href="http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=32629">http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&amp;id=32629</a>

*Sodelujoče organizacije*

---

EN-FIST

*VSEBINSKI OPIS PROJEKTA:*

*Faze projekta in njihova realizacija*

---

**Raziskovalna hipoteza.** Na podlagi objav, analize in primerjave aminokislinskega zaporedja in bioloških značilnosti TLR9, ter terciarne strukture ektodomene receptorjev TLR1/2/3/4 človeka in TLR2/4 miši smo pripravili *molekularni model ektodomene receptorja TLR9*. (Kristalna struktura TLR9 z agonisti in antagonisti je bila objavljena v času trajanja projekta.) **Predpostavili** smo *položaj vezavnih mest za enoverižno DNA*, ki so: (i) območje v bližini N-končnega dela od aminokislina W47 do W96 in (ii) območji na C-končnem delu ektodomene človeškega TLR9 od aminokislina H554 do R581 in od aminokislina H641 do K690. Pričakujemo, da bomo z rezultati točkovnih in delecijских mutacij TLR9, celične lokalizacije in himernih proteinov receptorja, ter aktivacije s sintetičnimi ODN-i, potrdili molekularni model aktivacije TLR9. Pričakujemo tudi, da bomo z analizo učinkov nukleotidnega zaporedja agonistov na aktivacijo TLR9 določili minimalno nukleotidno zaporedje agonista, ki je potreben za aktivacijo receptorja TLR9.

**Cilji projekta so:**

- ugotoviti mehanizem prepoznavanja enoverižne DNA z znotrajceličnim receptorjem TLR9 in določiti biokemijske osnove za razlikovanje agonistov s TLR9.
- ugotoviti izvor razlikovanja med optimalnim CpG aktivacijskim motivom pri TLR9 različnih organizmov s pripravo in analizo himernih receptorjev med človeškim in mišjim TLR9.
- izvesti široko študijo QSAR sintetičnih ODN-ov glede na njihovo sposobnost stimulacije TLR9, kar lahko pripelje do oligonukleotidov z izboljšanim terapevtskim potencialom in do strukturnih informacij v podporo molekularnemu mehanizmu aktivacije TLR9.

**Ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultati.** Endosomalni receptorji TLR igrajo pomembno vlogo pri aktivaciji prirojene imunosti in pripravi pridobljene imunosti kot tudi v avtoimunskih procesih. Vloga Tollu podobnih receptorjev (TLR) je prepoznavanje molekularnih vzorcev značilnih za patogene in aktivacija imunskega odziva. Pri tem znotrajcelični, endosomalni receptorji TLR prepoznavajo nukleinske kisline virusov in bakterij. Eno pomembnejših odkritij naše raziskovalne skupine, objavljeno v **Nature Commun.**, je, da zelo kratki fragmenti enoverižne (ss)DNA dolžine 2-5 nt, ki vsebujejo CG dinukleotid (sODN), občutno izboljšajo aktivacijo receptorja TLR9 z agonisti. Ti sODNi, katerih izvor je razgradnja DNA, ki se sprosti v krvni obtok pri travmi in rakavih obolenjih ter infekcijah, sami po sebi ne aktivirajo TLR9. Sinergistično delovanje sODNov je najbolj opazno v kombinaciji s

sesalčno gDNA in ligandi, ki slabo ali ne aktivirajo TLR9. Odkritje je pomembno iz vidika pomembnosti razgradnje izvencelične DNA v povezavi z aktivacijo TLR9 odvisnega vnetnega odziva.

Dolžina in nukleotidno zaporedje, ter tvorba sekundarnih struktur oligodeoksiribonukleotidov (ODN) določajo učinkovitost aktivacije receptorja TLR9. Omenjeno dejstvo nas je navedlo, da sistematično raziščemo minimalne zahteve potrebne za učinkovito aktivacijo receptorja. Določili smo potrebno minimalno nukleotidno zaporedje aktivacijskih ODNov, ki še omogočijo učinkovito aktivacijo človeškega receptorja TLR9 (hTLR9) (**J. Immunol.**) in določili minimalno zaporedje ODNov, ki specifično aktivirajo mišji TLR9 (mTLR9) (**J. Immunol.**). Zgoraj opisani raziskavi smo nadgradili z identifikacijo področja na ektodomeni receptorja TLR9, ki vpliva na vrstno razločevanje aktivacijskih motivov ODNov. Pokazali smo, da zamenjava aminokislin Gln346, Arg348 in Gln562 hTLR9 v mišje analoge močno izboljša aktivacijo receptorja z bakterijsko DNA in sesalčno genomsko (g)DNA in spremeni vrstno specifične zahteve za sintetične agoniste (**J. Immunol.**). Ugotovitve so pomembne za razumevanje mehanizma aktivacije receptorja TLR9 in pri pripravi novih sintetičnih agonistov receptorja kot potencialnih zdravil. Pravkar smo zaključili raziskavo o pomenu kemične modifikacije fosfodiesterne vezi pri sintetičnih agonistih za aktivacijo receptorja TLR9. Odkrili smo, da zamenjava nepovezanega kisika v atom žvepla v fosfatni vezi motiva CpG ODNA občutno zmanjša aktivacijsko sposobnost agonista (**Scientific Reports**).

**Učinki in uporaba.** Razumevanje aktivacije receptorjev TLR in mehanizma znotrajceličnega prenosa signala sta osnovna problema imunologije in medicine. Dosežek glavnega cilja "določitev molekularnega mehanizma signalizacije enoverižne DNA preko Tollu podobnega receptorja 9" je zagotovil ključne fiziološke podatke, ki so ključni za **naprednejše** načrtovanje **zdravil za zdravljenje akutnih in kroničnih vnetij (antagonisti) ali aktivacijo adaptivne imunosti (agonistov)**. Rezultati projekta so objavljeni v petih znanstvenih publikacijah v prestižnih znanstvenih revijah **Nature Communications, Scientific Reports, Journal of Immunology**. V okviru raziskovalne naloge smo izvedli dve magistrski nalogi.

#### *Bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta*

- POHAR, Jelka, YAMAMOTO, Chikako, FUKUI, Ryutaro, CAJNKO, Miša Mojca, MIYAKE, Kensuke, JERALA, Roman, BENČINA, Mojca. Selectivity of human TLR9 for double CpG motifs and implications for the recognition of genomic DNA. *The journal of immunology*, ISSN 0022-1767, 2017, vol. 198, iss. 5, str. 2093-2104, doi: [10.4049/jimmunol.1600757](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600757). [COBISS.SI-ID [6089754](https://www.cobiss.si/id/6089754)],
- POHAR, Jelka, LAINŠČEK, Duško, IVIČAK-KOČJAN, Karolina, CAJNKO, Miša Mojca, JERALA, Roman, BENČINA, Mojca. Short single-stranded DNA degradation products augment the activation of Toll-like receptor 9. *Nature communications*, ISSN 2041-1723, May 2017, vol. 8, str. 1-13, doi: [10.1038/ncomms15363](https://doi.org/10.1038/ncomms15363). [COBISS.SI-ID [6146842](https://www.cobiss.si/id/6146842)],
- POHAR, Jelka, LAINŠČEK, Duško, KUNŠEK, Ana, CAJNKO, Miša Mojca, JERALA, Roman, BENČINA, Mojca. Phosphodiester backbone of the CpG motif within immunostimulatory oligodeoxynucleotides augments activation of Toll-like receptor 9. *Scientific reports*, ISSN 2045-2322, 2017, 7, str. 1-11, doi: [10.1038/s41598-017-15178-y](https://doi.org/10.1038/s41598-017-15178-y). [COBISS.SI-ID [39287301](https://www.cobiss.si/id/39287301)],
- POHAR, Jelka, KUŽNIK, Alenka, JERALA, Roman, BENČINA, Mojca. Minimal sequence requirements for oligodeoxyribonucleotides activating human TLR9. *The journal of immunology*, ISSN 0022-1767, Apr. 2015, vol. 194, no. 8, str. 3901-3908, doi: [10.4049/jimmunol.1402755](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402755). [COBISS.SI-ID [37867781](https://www.cobiss.si/id/37867781)],
- POHAR, Jelka, LAINŠČEK, Duško, FUKUI, Ryutaro, YAMAMOTO, Chikako, MIYAKE, Kensuke, JERALA, Roman, BENČINA, Mojca. Species-specific minimal sequence motif for oligodeoxyribonucleotides activating mouse TLR9. *The journal of immunology*, ISSN 0022-1767, 2015, vol. 195, no. 9, str. 4396-4405, doi: [10.4049/jimmunol.1500600](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500600). [COBISS.SI-ID [5796378](https://www.cobiss.si/id/5796378)],

#### *Logotip ARRS in drugih sofinancerjev*



**ARRS**

JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST  
REPUBLIKE SLOVENIJE