

J3-9257: Molekularni mehanizem tvorbe endogenih agonistov TLR4 in njihova vloga v kroničnih boleznih

Vodja: dr. Mateja Manček Keber

Vsebinski opis projekta

Sterilno vnetje se pojavi v akutnih stanjih, kot sta ishemija/reperfuzija ali travma, in je tudi osnova nekaterih kroničnih vnetnih bolezni, vključno z aterosklerozo, avtoimunskimi boleznimi, patologijami povezanimi s staranjem in rakom. Signalizacijske poti (TLR-ji in inflammasomi so najbolj raziskani), ki zaznavajo okužbe, tudi prispevajo k sterilnemu vnetju preko sinteze provnetnih citokinov. Sterilno vnetje spremlja oksidativen stres, ki prispeva k poškodbam.

Zunajcelični vezikli (extracellular vesicles - EVs; mikrovezikli in eksosomi) so membranski delci manjši od 1 μm , ki jih najdemo v krvi in drugih telesnih tekočinah. Sproščajo se iz celic v različnih fizioloških pogojih, kot so aktivacija celic, rast, in iz poškodovanih celic, ki so podvržene stresu, kot sta hipoksija ali oksidativne poškodbe. Količina EV se poveča pri pacientih s kroničnimi vnetnimi boleznimi (ateroskleroz, revmatoidni artritis), z rakom ali okužbami. EV vsebujejo komponente celic, kot so fosfolipidne molekule, proteini ali RNA, npr. miRNA.

Celična nekroza, do katere pride pri sterilnem vnetju, vodi v sproščanje signalov nevarnosti, ki jim rečemo DAMP. Sterilno vnetje spremlja tudi oksidativen stres. Celice lahko odstranjujejo oksidirane molekule, ki predstavljajo DAMP, s sproščanjem EV, ki se lahko prenesejo na sosednje ali oddaljene celice in tako spodbujajo medcelični odgovor na oksidativen stres. Tudi nekateri encimi med njimi lipoksigenaze (LO) in fosfolipaze (PLA₂) se aktivirajo ob stresu in prispevajo k vnetju, verjetno tako da tvorijo DAMP.

Mehanizmi nastanka endogenih ligandov, njihovega delovanja in prispevka k kroničnim boleznim so še vedno slabo raziskani. Pri iskanju endogenih ligandov, ki naj bi bili po strukturalni analizi ligandov receptorskega kompleksa MD-2/TLR4 podobni lipidu A, smo se osredotočili na oksidativen stres, ki povzroča sterilno vnetje ne glede na izvor bolezni. Leta 2015 smo objavili članek v *Science signaling*, kjer smo pokazali, da peroksidirani fosfolipidi (PL), ki se lahko sproščajo v krvni obtok v EV, delujejo kot signali nevarnosti. Ugotovili smo, da so le delno oksidirani PL v EV ligandi receptorskega kompleksa TLR4/MD-2 in aktivirajo izražanje provnetnih citokinov, ki se po analizi mikromrež bistveno razlikujejo od citokinov po stimulaciji z LPS.

V tem projektu želimo določiti strukture peroksidiranih fosfolipidov, ki aktivirajo kompleks TLR4/MD-2 in potrditi njihovo vlogo pri kroničnih boleznih. Zato predlagamo hipotezo, da sta 15-lipoksigenaza in sPLA₂ dva fiziološko ključna encima, odgovorna za tvorbo delno oksidiranih lysoPL, ki delujejo kot agonisti TLR4/MD-2. Načrtujemo, da bomo identificirali razlike v signalizaciji signalov nevarnosti (EV) in patogenimi signali (LPS), s čimer bi izpostavili terapevtsko relevantne točke, ki bi lahko omejile sterilno vnetje brez vpliva na sistemsko prirojeno imunost.

In vitro tvorba agonistov TLR4/MD-2 s 15-LO oksidacijo PL in PLA₂ encimsko aktivnostjo bo naš dokaz o delovanju principa. Priprava 15-LO KO celic z uporabo CRISPR/Cas9 bo potrdila vlogo encima pri tvorbi aktivnih EV po aktivaciji oksidativnega stresa. V sinovialni tekočini bolnikov z RA je prisotna sPLA₂. Sinovialno tekočino bomo uporabili kot vir sPLA₂, ki lahko tvori ligande TLR4, kar potrjuje našo hipotezo in zagotavlja patofiziološko pomembnost. Še več, z uporabo mišjih modelov kroničnih bolezni, kot je artritis, želimo dokazati, da je tvorba ox lysoPLs eno izmed gonil pri patologiji bolezni.

Sodelujoče organizacije:

EN-FIST

a. osnovni podatki glede financiranja:

Projekt financira ARRS v okviru cenovne kategorije C za obdobje treh let v obsegu 2699 letnimi urami. Trajanje financiranja je 1. 7. 2018 - 30.06.2021.

b. sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS

Na Kemijskem inštitutu v projektni skupini J3-9257 sodelujejo:

Manček Keber Mateja - <http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&lang=slv&id=13349>

Benčina Mojca - <http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=8380>

Fink Tina - <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=40263>

Hafner Bratkovič Iva - <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=16734>

Ivičak Kocjan Karolina - <http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&lang=slv&id=31432>

Jerala Roman - <http://sicris.izum.si/search/rsr.aspx?opt=1&lang=slv&id=5855>

Lulić Sanjin - <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=48768>

Stevović Bojana - <http://www.sicris.si/search/rsr.aspx?lang=slv&id=43898>

Faze projekta in njihova realizacija

Projekt je razdeljen na pet delovnih sklopov, ki so:

- Identifikacija mehanizma nastanka agonistov TLR4/MD-2, ki ga sproži oksidativni stres in določitev struktur aktivnih agonistov, vključno z določitvijo tarčnih fosfolipidov in njihovega acilacijskega vzorca.
- Identifikacija mehanizmov vezave ox lysoPL na MD-2 in TLR4.
- Karakterizacija znotrajceličnih poti in citokinskega profila stimulacije TLR4 z EV in ox lysoPL v primerjavi z aktivacijo LPS. Poleg tega bo izvedena primerjava citokinskih profilov med agonisti TLR4 (LPS, lipidIVa, taxolom in EV).
- Kvantifikacija aktivnosti sekretorne PLA₂ v vzorcih sinovialne tekočine pri bolnikih z RA in potrditev njene vloge pri nastanku agonistov TLR4/MD-2.
- Uporaba sPLA₂-IIA^{TGN} miši za potrditev hipoteze in preizkušanje PLA₂ in 12-LO inhibitorjev pri zdravljenju artritisa.

Bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta

ONÓDI, Z. , PELYHE, C., NAGY, C. T., BRENNER, G. B., ALMÁSI, L., KITTEL, Á., MANČEK KEBER, M., FERDINANDY, P., BUZÁS, E. I., GIRICZ, Z. Isolation of high-purity extracellular vesicles by the combination of iodixanol density gradient ultracentrifugation and bind-elute chromatography from blood plasma. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9, 1479, doi: [10.3389/fphys.2018.01479](https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01479)

Logotip ARRS in drugih sofinancerjev



ARRS

JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST
REPUBLIKE SLOVENIJE