

## **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  $\mu\text{m}$ , 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 (PLA<sub>2</sub>) 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 sPLA<sub>2</sub> 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 PLA<sub>2</sub> 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 sPLA<sub>2</sub>. Sinovialno tekočino bomo uporabili kot vir sPLA<sub>2</sub>, 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 projektini 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 PLA<sub>2</sub> v vzorcih sinovialne tekočine pri bolnikih z RA in potrditev njene vloge pri nastanku agonistov TLR4/MD-2.
- Uporaba sPLA<sub>2</sub>-IIA<sup>TGN</sup> miši za potrditev hipoteze in preizkušanje PLA<sub>2</sub> 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)

HA, Van Thai, LAINŠČEK, Duško, GESSLBAUER, Bernd, JARC JOVIČIĆ, Eva, HYÖTYLÄINEN, Tuulia, ILC, Nejc, LAKOTA, Katja, TOMŠIČ, Matija, VAN DE LOO, Fons A. J., BOCHKOV, Valery, PETAN, Toni, JERALA, Roman, MANČEK KEBER, Mateja. Synergy between 15-lipoxygenase and secreted PLA<sub>2</sub> promotes inflammation by formation of TLR4 agonists from extracellular vesicles. *PNAS*. 13 Oct. 2020, vol. 117, iss. 41, str. 25679-25689, ISSN 1091-6490, DOI: [10.1073/pnas.2005111117](https://doi.org/10.1073/pnas.2005111117). [COBISS.SI-ID [30457091](https://www.cobiss.si/id/30457091)]

PEČAN, Peter, HAMBALKÓ, Szabolcs, HA, Van Thai, NAGY, Csilla Terézia, PELYHE, Csilla, LAINŠČEK, Duško, KENYERES, Bence, BRENNER, Gábor, GÖRBE, Anikó, KITTEL, Ágnes, BARTEKOVA, Monika, FERDINANDY, Péter, MANČEK KEBER, Mateja, GIRICZ, Zoltán. Calcium ionophore-induced extracellular vesicles mediate cytoprotection against simulated ischemia/reperfusion injury in cardiomyocyte-derived cell lines by inducing heme oxygenase 1. *International journal of molecular sciences*. 2 Oct. 2020, vol. 21, iss. 20, str. 7687-1-7687-17. ISSN 1422-0067, DOI: [10.3390/ijms21207687](https://doi.org/10.3390/ijms21207687). [COBISS.SI-ID [33505539](https://www.cobiss.si/id/33505539)]

MANČEK KEBER, Mateja, RIBIČ, Rosana, CHAIN, Fernando, SINNAEVE, Davy, MARTINS, José C., JERALA, Roman, TOMIČ, Srđanka, FEHÉR, Krisztina. Adamantane containing peptidoglycan fragments enhance RANTES and IL-6 production in lipopolysaccharide-induced macrophages. *Molecules*. 2 Aug. 2020, vol. 25, no. 16, str. 3707-1-3707-10, ISSN 1420-3049, DOI: [10.3390/molecules25163707](https://doi.org/10.3390/molecules25163707). [COBISS.SI-ID [26490883](https://www.cobiss.si/id/26490883)]

MANČEK KEBER, Mateja, HAFNER BRATKOVIČ, Iva, LAINŠČEK, Duško, BENČINA, Mojca, GOVEDNIK, Tea, OREHEK, Sara, PLAPER, Tjaša, JAZBEC, Vid, BERGANT, Valter, GRASS, Vincent, PICHLMAIR, Andreas, JERALA, Roman. Disruption of disulfides within RBD of SARS-CoV-2 spike protein prevents fusion and represents a target for viral entry inhibition by registered drugs. *The FASEB journal*. Jun. 2021, vol. 35, iss. 6, e21651, str. 1-14, ISSN 0892-6638. DOI: [10.1096/fj.202100560R](https://doi.org/10.1096/fj.202100560R). [COBISS.SI-ID [64554755](https://www.cobiss.si/id/64554755)]

PETAN, Toni, MANČEK KEBER, Mateja. Half is enough : oxidized lysophospholipids as novel bioactive molecules. *Free Radical Biology & Medicine*. 2022, vol. 188, str. 351-362, ISSN 0891-5849, DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.228](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.228). [COBISS.SI-ID [114894851](https://www.cobiss.si/id/114894851)]

#### Logotip ARRS in drugih sofinancerjev



**ARRS**

JAVNA AGENCIJA ZA RAZISKOVALNO DEJAVNOST  
REPUBLIKE SLOVENIJE