



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

Με θέμα:

ΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ Toll 4 ΥΠΟΔΟΧΕΑ Asp299Gly και Thr399Ile ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ

*The Toll-Like Receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms in the Greek
Population*

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Παπαγεωργίου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη του κ. **Λαμπρόπουλου**, Καθηγητή Βιολογικών Επιστημών και Προληπτικής Ιατρικής, κ. **Κουρέτα**, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, και του κ. **Στάγκου**, Λέκτορα Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών.

Από την φοιτήτρια:

Ευτέρπη Νικητοπούλου

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αλέξανδρος Λαμπρόπουλος

Καθηγητής Βιολογικών Επιστημών και Προληπτικής Ιατρικής του τμήματος της Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Δημήτριος Κουρέτας

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος της Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Στάγκος

Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του τμήματος της Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η στιγμή παράδοσης της διπλωματικής εργασίας αποτελεί μια εξαιρετικά ιδιαίτερη στιγμή για κάθε φοιτητή καθώς σηματοδοτεί τη λήξη της φοιτητικής περιόδου, το κλείσιμο ενός σημαντικότερου κύκλου της ζωής του. Ως εκ τούτου, οι ακόλουθες ευχαριστίες δε θα μπορούσαν να περιορίζονται μόνο στην εργασία που παρουσιάζεται. Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Νοσοκομείο Παπαγεωργίου της Θεσσαλονίκης, στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας.

Η ολοκλήρωση της προπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη βοήθεια του υπεύθυνου καθηγητή μου κ. Λαμπρόπουλο Αλέξανδρο, Καθηγητή στο τμήμα της Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στον τομέα των Βιολογικών Επιστημών και της Προληπτικής Ιατρικής. Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου που με δέχτηκε στο εργαστήριο έτσι ώστε να διεκπεραιώσω την εργασία μου και μου πρόσφερε τις πολύτιμες γνώσεις του και την βοήθειά του. Χρωστάω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κύριο Σωκράτη Καταφυγιώτη και την Μαρία Αργυράκη για την άριστη συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια εκπόνησης αυτής της εργασίας, τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για να μου δώσουν σημαντικά στοιχεία και εξηγήσεις πάνω στο θέμα, αλλά και για την προθυμία και την βοήθεια, που απλόχερα μου πρόσφεραν.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά τους υπεύθυνους καθηγητές μου στο τμήμα της Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών για την επίβλεψη, την συνεργασία και τις συμβουλές του καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου και τον κ. Στάγκο, Λέκτορα Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, για τις πολύτιμες γνώσεις που μεταλαμπάδευσε σε όλους μας όλα αυτά τα χρόνια.

Φυσικά ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στους φίλους μου για τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους και την αμέριστη βοήθειά τους. Υπήρξαν και είμαι σίγουρη ότι θα συνεχίσουν να υπάρχουν ένα ανεκτίμητο στήριγμα για μένα. Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερω τους γονείς μου Κώστα και Ράνια και την πολυαγαπημένη μου αδερφή Σοφία, για την κατανόηση και την ηθική, ψυχολογική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν όχι μόνο κατά την διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και κατά την διάρκεια όλων των σπουδών μου. Πέραν όμως από την πολύτιμη αυτή στήριξη, μου έδωσαν όλα τα εφόδια ώστε να γίνω ένας σωστός άνθρωπος και αυτό είναι κάτι που δεν μαθαίνεται, αλλά μεταδίδεται.

Την παρούσα εργασία την αφιερώνω στην θεία μου Αλεξία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανοσολογική απόκριση σε παθογόνα μικρόβια στηρίζεται τόσο σε φυσικά όσο και σε επίκτητα συστατικά. Η έμφυτη ανοσολογική απάντηση είναι η πρώτη γραμμή άμυνας κατά των μολυσματικών ασθενειών. Η κύρια πρόκληση για τον ξενιστή είναι η ανίχνευση του παθογόνου και η δημιουργία μίας ταχείας αμυντικής απόκρισης. Η αναγνώριση των παθογόνων μικροοργανισμοί από το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα βασίζεται σε υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRRs) που ανιχνεύουν διατηρημένες δομές βακτηρίων, ιών, πρωτόζωων και μυκήτων, και αποκαλούνται: «μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα» (PAMPs). Μια μεγάλη ομάδα των PRRs είναι οι υποδοχείς τύπου Toll (TLRs). Δέκα διαφορετικά είδη ανθρώπινων TLRs έχουν ταυτοποιηθεί. Ο υποδοχέας τύπου Toll 4 (TLR4) είναι ένας σημαντικός υποδοχέας αναγνώρισης παθογόνων που αναγνωρίζει κυρίως το λιποπολυσακχαρίτη (LPS) των Gram αρνητικών βακτηρίων αλλά ακόμα και δομές από μύκητες και μυκοβακτηριακά παθογόνα, καθώς επίσης και ενδογενή προσδέματα.

Δύο μη συνώνυμοι πολυμορφισμοί του TLR4, Asp299Gly και Thr399Ile, έχουν προταθεί ότι μεταβάλλουν τη λειτουργία του υποδοχέα. Μερικές μελέτες, αλλά όχι όλες, έχουν προτείνει ότι αυτοί οι πολυμορφισμοί μπορούν να οδηγήσουν σε μειωμένη ανταπόκριση κυτοκίνης και αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις που προκαλούνται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια.

Σε αυτή τη μελέτη αναλύθηκαν οι γονότυποι 109 εθελοντών του Ελληνικού πληθυσμού για την παρουσία των πολυμορφισμών του TLR4, Asp299Gly και Thr399Ile. Οι συχνότητες για το 299Gly αλληλόμορφο ήταν 6% και για το 399Ile ήταν επίσης 6%. Λόγω του μικρού αριθμού των εθελοντών θα πρέπει να διεξαχθεί περαιτέρω έρευνα για τον προσδιορισμό των αλληλόμορφων ως σπάνια ή συχνά στον πληθυσμό. Παρ' όλα αυτά, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο πολυμορφισμός 399Ile είναι αρκετά σπάνιος για αυτό ακόμα δεν έχουν εξακριβωθεί οι επιπτώσεις του πολυμορφισμού στη λειτουργία του υποδοχέα TLR4.

ABSTRACT

The immune response to microbial pathogens relies on both innate and adaptive components. The innate immune response is the first line of defense against infectious disease. The principal challenge for the host is to detect the pathogen and mount a rapid defensive response. Recognition of pathogenic microorganisms by the innate immune system relies on Pattern Recognition Receptors (PRRs) that detect preserved structures of bacteria, viruses, protozoa, and fungi, so-called Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). A major group of PRRs are the Toll-like receptors (TLRs). Ten different human TLRs have been identified. Toll-like receptor 4 (TLR4) is an important pathogen recognition receptor that recognizes mainly lipopolysaccharide (LPS) of Gram negative bacteria, but also structures from fungal and mycobacterial pathogens, as well as endogenous ligands.

Two non synonymous polymorphisms of TLR4, Asp299Gly and Thr399Ile, have been suggested to alter the function of the receptor. Some, but not all, studies have proposed that these polymorphisms lead to reduced cytokine response and increased susceptibility to Gram-negative infections.

We analyzed genotypes for a Greek study population consisting of a total of 109 volunteers for the presence of the TLR4 polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile. The 299Gly allele frequencies were 6% and the 399Ile were also 6%. Due to the small number of volunteers should conduct further research to determine the alleles as rarely or frequently in the population. Nevertheless but previous studies have shown that polymorphism 399Ile is quite rare for this have yet to find the effects of the polymorphism in the functioning of the receptor TLR4.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Εισαγωγή.....	8
1.1	Μόλυνση και ανοσία.....	8
1.2	Μη ειδική και ειδική άμυνα.....	9
1.3	Έμφυτη ανοσία.....	11
1.3.1	Ανατομικοί φραγμοί.....	11
1.3.2	Τα φαγοκύτταρα αποτελούν φραγμό ενάντια στη μόλυνση.....	11
1.3.3	Διαλυτά μόρια συμβάλουν στην έμφυτη ανοσία.....	12
1.4	Προσαρμοστική ανοσία.....	14
1.5	Σχέσεις μεταξύ έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας.....	15
1.6	Υποδοχείς έμφυτης ανοσίας.....	17
1.7	Υποδοχείς τύπου Toll.....	17
1.7.1	Ιστορική αναδρομή-Σημαντικές μελέτες.....	17
1.7.2	Δομή.....	18
1.7.3	Προσδέτες.....	20
1.7.4	Μεταγωγή σήματος.....	22
1.8	Ο Υποδοχέας TLR4.....	26
1.8.1	Προσδέτες.....	26
1.8.2	Μεταγωγή σήματος του TLR4.....	27
1.8.3	Αρνητικοί ρυθμιστές της TLR4 σηματοδότησης.....	32
1.8.4	Πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thr399Ile του TLR4.....	34
2.	Υλικά και Μέθοδοι.....	37
2.1	Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα.....	37
2.1.1	Αρχή της μεθόδου.....	37
2.1.2	Υλικά.....	37
2.1.3	Πειραματική διαδικασία.....	38
2.1.4	Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός DNA.....	39
2.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	39
2.2.1	Αρχή της μεθόδου.....	39
2.2.2	Επιλογή εκκινητών για PCR.....	39
2.2.3	Υλικά.....	41
2.2.4	Πειραματική διαδικασία.....	42
2.3	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	43
2.3.1	Αρχή της μεθόδου.....	43
2.3.2	Υλικά.....	44
2.3.3	Πειραματική διαδικασία.....	44
2.3.3.1	Παρασκευή πηκτώματος 2% w/v αγαρόζης.....	44
2.3.3.2	Πορεία ηλεκτροφόρησης.....	45

2.4	Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism).....	45
2.4.1	Αρχή της μεθόδου.....	45
2.4.2	Ένζυμα περιορισμού.....	45
2.4.3	Πειραματική διαδικασία.....	47
2.4.4	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3,5% w/v και 3%.....	48
3.	Αποτελέσματα.....	49
3.1	Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών.....	49
3.2	Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου του TLR4 με PCR για τον πολυμορφισμό Asp299Gly.....	49
3.3	Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου του TLR4 με PCR για τον πολυμορφισμό Thr399Ile	50
3.4	Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP.....	50
3.5	Στατιστική ανάλυση.....	53
3.5.1	Ο Νόμος των Hardy-Weinberg (1908).....	53
4.	Συζήτηση.....	58
5.	Βιβλιογραφία.....	60

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μόλυνση και ανοσία

Μαζί με την ανάπτυξη του πεδίου της Ανοσολογίας ξεκίνησε και η ανάπτυξη του πεδίου της Ιατρικής Μικροβιολογίας, που κάλυπτε την ταυτοποίηση μολυσματικών παραγόντων και τους τρόπους που προκαλούν το νόσημα. Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν το νόσημα ονομάζονται παθογόνα (pathogens) και οι τρόποι με τους οποίους επιτίθενται στον ξενιστή παθογένεση (pathogenesis). Βασικές ομάδες παθογόνων για τον άνθρωπο είναι οι ιοί, τα βακτήρια, οι μύκητες και τα παράσιτα. Ανάμεσα στα φύλα των βακτηρίων, υπάρχουν τέσσερις ομάδες που συγκαταλέγονται ως ιδιαίτερα σημαντικά ανθρώπινα παθογόνα. Αυτά είναι τα Gram αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, μυκοβακτήρια και σπειροχαίτες.^{1,2,7,11,14,15,26}

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν οι τρόποι με τους οποίους επιτυγχάνεται η αποτελεσματική ανοσία στα παθογόνα. Μία αποτελεσματική άμυνα στηρίζεται στη φύση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Το ανοσοποιητικό σύστημα πρέπει να αντιμετωπίζει όλους τους τύπους παθογόνων και έχει αναπτύξει πολλαπλές στρατηγικές για να αντιμετωπίζει επιθέσεις από ένα παθογόνο το οποίο έχει περάσει τους πρώτους αμυντικούς φραγμούς. Προφανής φραγμοί περιλαμβάνουν το δέρμα και τις βλεννώδεις μεμβράνες. Η οξύτητα του περιεχομένου του στομάχου και του ιδρώτα αποτελεί έναν επιπλέον, χημικό φραγμό για τους οργανισμούς που δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε όξινες συνθήκες. Ένζυμα, όπως η λυσοζύμη που υπάρχει στα δάκρυα, επιτίθενται στα κυτταρικά τοιχώματα βασικών βακτηρίων. Η σημασία αυτών των φραγμών γίνεται εμφανής όταν παραβιάζονται.^{1,2,26}

Μερικές από αυτές τις στρατηγικές είναι έτοιμες να αποκριθούν τη στιγμή που ένα παθογόνο αποφεύγει τους φραγμούς του ξενιστή, ενώ άλλες άμυνες σχεδιάζονται για να δράσουν μετά την εγκατάσταση της μόλυνσης.^{1,2,7,26}

1.2 Μη ειδική και ειδική άμυνα

Από τη στιγμή που ένα παθογόνο διαπερνά τους φυσικούς και χημικούς φραγμούς της έμφυτης ανοσίας, είναι δυνατόν να προκαλέσει μία ασθένεια. Το ανοσοποιητικό σύστημα αποκρίνεται, σε τέτοιου είδους εισβολές με δύο κρίσιμες λειτουργίες:

- i. Αισθητήρες ανιχνεύουν τον εισβολέα
- ii. Ένας εκλεπτυσμένος μηχανισμός απόκρισης αναλαμβάνει την επίθεση προς τον εισβολέα.

Η ανοσία, δηλαδή η προστασία από μολυσματικές ασθένειες, διαθέτει τόσο λιγότερο ειδικά, όσο και ειδικά συστατικά. Το λιγότερο ειδικό συστατικό, η έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις μολύνσεις. Τα περισσότερα συστατικά της έμφυτης ανοσίας υπάρχουν πριν την έναρξη της μόλυνσης και συνιστούν μία ομάδα μηχανισμών για αντοχή στις ασθένειες. Το σύστημα της έμφυτης ανοσίας περιλαμβάνει τους φυσικούς, χημικούς και κυτταρικούς φραγμούς. Οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι ειδικοί για ένα συγκεκριμένο παθογόνο.^{1,2,26,7}

Το πρώτο γεγονός στη διαδικασία ανίχνευσης λαμβάνει χώρα κατά την αλληλεπίδραση μοριακών ανιχνευτών του εισβολέα με διαλυτά ή μεμβρανικά μόρια του ξενιστή, οι οποίοι διαθέτουν την ικανότητα διάκρισης του εαυτού (ξενιστής) από το μη εαυτό (παθογόνο) με μεγάλη ακρίβεια. Η βασική λοιπόν πρόκληση της έμφυτης ανοσίας είναι η διάκριση ενός μεγάλου αριθμού δυνητικών παθογόνων από τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του οργανισμού (μη εαυτό-εαυτό), με τη χρήση ενός περιορισμένου αριθμού μοριακών ανιχνευτών. Το πρόβλημα αυτό επιδεινώνεται από την τάση των παθογόνων να μεταλλάσσονται. Το γεγονός όμως αυτό φαίνεται να λύνεται την εξέλιξη ενός μεγάλου αριθμού υποδοχέων που αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα δομικών προτύπων, τα οποία είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένα μεταξύ των διάφορων ειδών μικροβίων, καθώς συνήθως είναι απαραίτητα για την επιβίωσή τους, αλλά γενικά απουσιάζουν από τον ξενιστή. Εξαιτίας του γεγονότος ότι αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μοριακά πρότυπα στο σύνολό τους, αυτοί οι υποδοχείς ονομάζονται υποδοχείς αναγνώρισης προτύπου (Pattern Recognition Receptors, PRRs) και επειδή αυτού του είδους τα μοριακά πρότυπα συναντώνται σε παθογόνα, ονομάζονται σχετιζόμενα με παθογόνα μοριακά πρότυπα (Pathogen-associated Molecular Patterns, PAMPs). Τα μοτίβα αυτά έχουν ουσιαστικό ρόλο στην βιολογία της εισβολής των μικροοργανισμών στον ξενιστή και ως εκ τούτου δεν υπόκεινται σε υψηλά ποσοστά μετάλλαξης. Τα PAMPs που αναγνωρίζονται από τους PRRs, περιλαμβάνουν συνδυασμούς σακχάρων, συγκεκριμένων πρωτεϊνών και μορίων που φέρουν λιπίδια, καθώς και μερικών προτύπων νουκλεϊκών οξέων.^{1,2,3,4,7,,26}

Συνεπώς, η κυτταρική αμυντική γραμμή της έμφυτης ανοσίας αποτελείται από μία σειρά κυττάρων με ευαίσθητους υποδοχείς, που ανιχνεύουν μικροβιακά προϊόντα και προκαλούν την αντεπίθεση του οργανισμού. Η απόκριση στην εισβολή ενός μικροβιακού παράγοντα μόλυνσης, που έχει διαφύγει από τους αρχικούς αμυντικούς φραγμούς του δέρματος και των βλεννογόνων, είναι γρήγορη και τυπικά εκδηλώνεται μέσα σε λίγα λεπτά μετά την επίθεση.¹

Οι πιο σημαντικοί υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας είναι οι υποδοχείς τύπου Toll (TLR), οι οποίοι ανιχνεύουν μικροβιακά προϊόντα. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 12 από αυτούς τους υποδοχείς για το ποντίκι και 11 για τον άνθρωπο, καθένας από τους οποίους αντιδρά με ένα συγκεκριμένο μικροβιακό προϊόν. Αυτοί οι ευπροσάρμοστοι υποδοχείς επιτρέπουν στα δενδριτικά κύτταρα και στα μακροφάγα να ανιχνεύουν ένα ευρύ φάσμα παθογόνων. Τα μηνύματα που παράγονται από τους TLR των μακροφάγων, διεγείρουν την φαγοκυτταρική ικανότητα και την παραγωγή χημικών παραγόντων που είναι τοξικοί για τα μικρόβια που έχουν φαγοκυτταρωθεί. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παράγουν επίσης και κυτταροκίνες. Οι κυτταροκίνες, όπως και οι ορμόνες, τροποποιούν την συμπεριφορά και τη φυσιολογία των κυττάρων-στόχων και των ιστών-στόχων.
1,2,3,4,7,26

Παρά τις πολλές γραμμές άμυνας του έμφυτου συστήματος ανοσίας, μερικά παθογόνα μπορεί να διαφεύγουν από τους υφιστάμενους αμυντικούς μηχανισμούς. Στην περίπτωση αυτή βρίσκεται σε επιφυλακή ένα δεύτερο σύστημα, αυτό της προσαρμοστικής ή ειδικής ανοσίας, η ενεργοποίηση του οποίου επάγεται από την έκθεση σε μικρόβια και έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση άμυνας ενάντια στη μόλυνση, διαμέσου μίας εξειδικευμένης, ως προς το παθογόνο-εισβολέα, απόκρισης, με τη μορφή ενός μεγάλου πληθυσμού Β και Τ λεμφοκυττάρων, που αναγνωρίζουν ειδικά τον εισβολέα. Η ανάπτυξη της προσαρμοστικής ανοσίας απαιτεί χρόνο, περίπου μίας εβδομάδας ή και περισσότερο, προκειμένου να φτάσει σε υψηλά επίπεδα αποτελεσματικότητας.^{1,7,26}

1.3 Έμφυτη ανοσία

1.3.1 Ανατομικοί φραγμοί





Τα πιο προφανή συστατικά της έμφυτης ανοσίας, είναι τα εξωτερικά εμπόδια που προβάλλονται στην εισβολή των μικροβίων – το δέρμα και οι βλεννογόνοι, τα οποία περιλαμβάνουν τα βλεννώδη επιθήλια που επενδύουν τους αγωγούς του αναπνευστικού, του γαστρεντερικού και του ουρογεννητικού συστήματος και «μονώνουν» το εσωτερικό του οργανισμού από τα παθογόνα του εξωτερικού περιβάλλοντος. Το δέρμα αποτελείται από δύο διακριτές στιβάδες: μία λεπτή εξωτερική, την επιδερμίδα και μία παχύτερη, τη δερμίδα. Η επιδερμίδα περιλαμβάνει αρκετά στρώματα πυκνά διατεταγμένων επιθηλιακών κυττάρων. Η εξωτερική επιδερμική στιβάδα αποτελείται από νεκρά κύτταρα γεμάτα με μία υδατοστεγή πρωτεΐνη, την κερατίνη. Η δερμίδα αποτελείται από συνδετικό ιστό και περιλαμβάνει αιμοφόρα αγγεία, τριχοθυλάκια, σμηγματογόνους αδένες και ιδρωτοποιούς αδένες. Επίσης διαθέτουν την ικανότητα ανάπτυξης μηχανισμών ενεργού βιοχημικής άμυνας, διαμέσου της σύνθεσης πεπτιδίων και πρωτεϊνών με αντιμικροβιακές ιδιότητες.¹

Ο γαστρεντερικός, ο αναπνευστικός και ο ουρογεννητικός σωλήνας, καθώς και τα μάτια διαθέτουν μία επίστρωση βλεννωδών μεμβρανών, που αποτελούνται από μία εξωτερική επιθηλιακή στιβάδα και μία υποκείμενη στιβάδα συνδετικού ιστού. Το σάλιο, τα δάκρυα και οι βλεννώδεις εκκρίσεις περιέχουν επίσης αντιμικροβιακούς και αντικρκικούς παράγοντες. Στην περιοχή του κατώτερου αναπνευστικού αγωγού, ο βλεννογόνος καλύπτεται από βλεφαρίδες, που είναι τριχοειδής προεκβολές της κυτταρικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων και των οποίων η συγχρονισμένη κίνηση ωθεί τους μικροοργανισμούς που είναι παγιδευμένοι στη βλέννα (παχύρευστο υγρό που παράγεται από τα επιθηλιακά κύτταρα των βλεννωδών μεμβρανών), έξω από τους αγωγούς. Ακόμη, οι μη παθογόνοι μικροοργανισμοί που αποικίζουν τις βλεννογόνους επιφάνειες, και αποτελούν την φυσιολογική χλωρίδα του οργανισμού μας και που είναι πολύ καλά προσαρμοσμένοι στο εσωτερικό μας περιβάλλον, ανταγωνίζονται τα παθογόνα ως προς τις θέσεις προσκόλλησης και την εκμετάλλευση των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών στις βλεννογόνους επιφάνειες.^{1,26}

1.3.2 Τα φαγοκύτταρα αποτελούν φραγμό ενάντια στη μόλυνση

Ένας σημαντικός, μη ειδικός, αμυντικός μηχανισμός είναι η πρόσληψη εξοκυτταρικού υλικού με φαγοκυττάρωση. Η φαγοκυττάρωση είναι ένας τύπος ενδοκυττάρωσης, δηλαδή της πρόσληψης κάποιου υλικού του περιβάλλοντος από ένα κύτταρο. Σε αυτήν, η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει προεκβολές γύρω από το

υλικό, που μπορεί να περιλαμβάνει ολόκληρους παθογόνους μικροοργανισμούς. Η φαγοκυττάρωση επιτυγχάνεται από εξειδικευμένα κύτταρα, όπως πχ μονοκύτταρα του αίματος, ουδετερόφιλα και μακροφάγα των ιστών. Οι περισσότεροι άλλοι κυτταρικοί τύποι είναι ικανοί για άλλους τύπους ενδοκυττάρωσης, όπως πχ ενδοκυττάρωση με τη διαμεσολάβηση υποδοχέων κατά την οποία εξωκυτταρικά μόρια προσλαμβάνονται από ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς και πινοκυττάρωση με την οποία τα κύτταρα προσλαμβάνουν υγρό από το περιβάλλον και όσα μόρια περιέχονται σε αυτό.^{1,26}

Κυτταρικός τύπος	 Ουδετερόφιλα	 Μακροφάγα	 Δενδριτικά κύτταρα	 Φυσικά φονικά κύτταρα
Λειτουργία	Φαγοκυττάρωση Δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου Αντιμικροβιακά πεπτιδία	Φαγοκυττάρωση Μεσολαβητές της φλεγμονής Παρουσίαση αντιγόνου Δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου Κυτταροκίνες Πρωτεΐνες του συμπληρώματος	Παρουσίαση αντιγόνου Συνδιεγερτικά μηνύματα Δραστικές ρίζες οξυγόνου Ιντερφερόνη Κυτταροκίνες	Λύση κυττάρων μολυσμένων με ιό Ιντερφερόνη Ενεργοποίηση μακροφάγων

Εικόνα 1. Οι κυτταρικοί τύποι των λευκοκυττάρων της έμφυτης ανοσίας. Τα μονοκύτταρα που δεν φαίνονται σε αυτήν την εικόνα, διαθέτουν τις ίδιες ικανότητες με τα μακροφάγα.¹

1.3.3 Διαλυτά μόρια συμβάλλουν στην έμφυτη ανοσία

Μία ποικιλία διαλυτών παραγόντων συμβάλλει στην έμφυτη ανοσία και περιλαμβάνει διαλυτές πρωτεΐνες όπως η λυσοζύμη, οι ιντερφερόνες και συστατικά του συστήματος του συμπληρώματος. Η λυσοζύμη, ένα υδρολυτικό ένζυμο που έχει βρεθεί σε διάφορες βλεννώδεις εκκρίσεις και στα δάκρυα, μπορεί να διασπά το στρώμα πεπτιδογλυκάνης του τοιχώματος των βακτηρίων. Οι ιντερφερόνες αποτελούν μία ομάδα πρωτεϊνών που εκκρίνονται από μολυσμένα με ιούς κύτταρα. Ανάμεσα στις πολλές λειτουργίες των ιντερφερονών είναι οι ικανότητά τους να δεσμεύονται σε γειτονικά κύτταρα και να επάγουν γενικευμένη αντι-ιική δράση.¹

Το συμπλήρωμα είναι μία ομάδα πρωτεϊνών του ορού που κυκλοφορούν σε ανενεργή μορφή. Μία ποικιλία ειδικών και μη ειδικών μηχανισμών μπορεί να μετατρέψει τις ανενεργές μορφές των πρωτεϊνών του συμπληρώματος σε ενεργές μορφές, που μπορούν έτσι να καταστρέψουν τη μεμβράνη των παθογόνων

μικροοργανισμών, οδηγώντας είτε στην καταστροφή είτε στην κάθαρσή τους. Το συμπλήρωμα μπορεί να λειτουργεί ως ένα δραστικό σύστημα που πυροδοτείται από τη σύνδεση αντισωμάτων σε κυτταρικές επιφάνειες, ή μπορεί να ενεργοποιείται από αλληλεπιδράσεις των μορίων του με βασικά συστατικά του μικροβιακού κυτταρικού τοιχώματος. Το συμπλήρωμα κατέχει μία θέση η οποία πραγματικά αποτελεί σημείο σύγκλισης των συστημάτων της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας, αφού βασικά συστατικά του μπορούν να αντιμετωπίσουν άμεσα το παθογόνο.^{1,6}

Διαλυτοί ρυθμιστές περιλαμβάνουν ενεργοποιητές του συστήματος του συμπληρώματος, όπως η λεκτίνη που δεσμεύεται στη μαννόζη (mannose-binding lectin, MBL) και η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein, CRP). Εάν το παθογόνο φέρει PAMPs, που αναγνωρίζονται από αυτούς τους ρυθμιστές, τότε ενεργοποιείται το σύστημα του συμπληρώματος. Ένα τμήμα του συστήματος του συμπληρώματος αποτελείται από ένα σύνολο πρωτεϊνών, οι οποίες μετά την ενεργοποίησή τους σχηματίζουν συσσωματώματα, που προκαλούν την διάνοιξη οπών στις κυτταρικές μεμβράνες των μικροβίων-στόχων και θανάτωση των κυττάρων με λύση. Το σύστημα του συμπληρώματος περιλαμβάνει και γλυκοπρωτεΐνες του ορού, που μετά την ενεργοποίησή τους επάγουν την φαγοκυττάρωση των μικροβίων από τα φαγοκύτταρα (οψωνισμός).^{1,2,6}

Πρόσφατες μελέτες στις κολλεκτίνες υποδηλώνει ότι οι επιφανειοδραστικές αυτές πρωτεΐνες μπορούν να θανατώσουν άμεσα κοινά βακτήρια, μέσω της ρήξης της λιπιδιακής τους μεμβράνης ή εναλλακτικά, με συσσώρευση των βακτηρίων ώστε να αυξάνουν την ευαισθησία τους στη φαγοκυττάρωση.¹

Τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα του ιστού, που έχει υποστεί εισβολή, διαθέτουν στην επιφάνειά τους ειδικούς υποδοχείς τύπου Toll. Στην περιοχή της μόλυνσης λοιπόν, ενδοκυττάρωνουν και επεξεργάζονται το αντιγόνο, ωριμάζουν και έπειτα μεταναστεύουν στο λεμφοειδή ιστό όπου επιτελούν την παρουσίαση του αντιγόνου στα T κύτταρα, μία διαδικασία κομβικής σημασίας για την έναρξη μίας απόκρισης της προσαρμοστικής ανοσίας, ενάντια στην εισβολή κάποιου παθογόνου. Άρα η διαδικασία αυτή φαίνεται να γεφυρώνει τον έμφυτο με τον προσαρμοστικό κλάδο του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα δενδριτικά κύτταρα εκκρίνουν επίσης μία σειρά κυτταροκινών που προάγουν την φλεγμονή και κατευθύνουν την προσαρμοστική ανοσοαπόκριση του ξενιστή. Όλες οι λειτουργικές διαδικασίες της έμφυτης ανοσίας λαμβάνουν χώρα σε πρώιμο στάδιο, κατά την αντιμετώπιση μίας μόλυνσης, πριν από την παραγωγή σημαντικών πληθυσμών T λεμφοκυττάρων και αντισωμάτων από τα B κύτταρα, ειδικών για τα παθογόνα. Παρόλα αυτά, οι κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από τα κύτταρα που εμπλέκονται στην έμφυτη απόκριση, επηρεάζουν την φύση των επακόλουθων προσαρμοστικών αποκρίσεων ενάντια στη μόλυνση.

Σε πολλές περιπτώσεις το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα είναι ικανό να καταπολεμήσει και να εκκαθαρίσει μία μόλυνση από μόνο του. Στην περίπτωση κατά την οποία αυτό δεν είναι εφικτό, το παθογόνο αυτό βρίσκεται αντιμέτωπο με μία συγχρονισμένη επίθεση από το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα. Κατά τη διάρκεια της απόκρισης του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, τα κυτταροτοξικά T κύτταρα ανιχνεύουν και καταστρέφουν τα παθογόνα που παρεισφρέουν μεταξύ των κυττάρων του ξενιστή και τα αντισώματα εξουδετερώνουν την ικανότητα του εισβολέα να μολύνει άλλα κύτταρα, αυξάνοντας παράλληλα και την πιθανότητα φαγοκυττάρωσης του εισβολέα από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα (φαγοκυττάρωση που εξαρτάται από αντισώματα, ένα είδος οψωνισμού). Τα αντισώματα συνεργάζονται επίσης με το σύστημα του συμπληρώματος για να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της λύσης των παθογόνων μικροβίων. Μετά την κάθαρση μίας μόλυνσης μερικά από τα B και T κύτταρα που παράχθηκαν κατά την προσαρμοστική φάση της απόκρισης παραμένουν στον ξενιστή για μεγάλο χρονικό διάστημα με τη μορφή T και B κυττάρων μνήμης. Ως εκ τούτου, μελλοντικές μολύνσεις με το ίδιο παθογόνο θα αντιμετωπίσουν μία έτοιμη εφεδρεία λεμφοκυττάρων, που είναι ειδικευμένα στην αναγνώριση του παθογόνου και ικανά να αναπτύξουν ταχύτατη απόκριση.^{1,26}

1.4 Προσαρμοστική Ανοσία

Η προσαρμοστική ή ειδική ανοσία είναι ικανή να αναγνωρίζει και να εξαλείφει ειδικά, συγκεκριμένους ξένους μικροοργανισμούς και μόρια (πχ ξένα αντιγόνα). Αντίθετα προς τις έμφυτες αποκρίσεις, οι προσαρμοστικές δεν είναι οι ίδιες για όλα τα μέλη ενός είδους, αλλά είναι αντιδράσεις σε ειδικές αντιγονικές προκλήσεις, για αυτό και δεν συμμετέχει μέχρις ότου συμβεί αντιγονική επίθεση στον οργανισμό. Διαθέτει τέσσερα χαρακτηριστικά:

- Αντιγονική ειδικότητα.
- Ποικιλομορφία.
- Ανοσολογική μνήμη.
- Αναγνώριση εαυτού/μη εαυτού.

Η αντιγονική ειδικότητα επιτρέπει στο προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα να διακρίνει λεπτές διαφορές μεταξύ των αντιγόνων. Τα αντισώματα μπορούν να διακρίνουν δύο πρωτεϊνικά μόρια που διαφέρουν μόνο σε ένα αμινοξύ. Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ικανό να παράγει τεράστια ποικιλομορφία μορίων, τα οποία του επιτρέπουν να αναγνωρίζει δισεκατομμύρια μοναδικών

διαφορετικών δομών σε ξένα αντιγόνα. Η ικανότητα αυτή έρχεται σε αντίθεση με τα μόρια αναγνώρισης προτύπου του έμφυτου συστήματος, το οποίο αναγνωρίζει ευρείες τάξεις οργανισμών με βάση τις μοριακές δομές που υπάρχουν σε αυτές. Το προσαρμοστικό σύστημα μπορεί να αναγνωρίσει έναν απλό τύπο οργανισμού και διαφοροποιείται ανάμεσα σε εκείνους με μικρές γενετικές διαφορές.¹

Η προσαρμοστική ανοσία αποκρίνεται στην επίθεση με έναν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης, καθώς επίσης και με την ιδιότητα της «μνήμης». Τυπικά, υπάρχει μία προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση ενάντια σε ένα αντιγόνο μέσα σε πέντε ή έξι μέρες μετά την αρχική έκθεση σε αυτό. Έκθεση στο ίδιο αντιγόνο για δεύτερη φορά προκαλεί μία απόκριση της μνήμης: η ανοσολογική απόκριση στη δεύτερη επαφή συμβαίνει πιο γρήγορα από την πρώτη και είναι ισχυρότερη και συχνά πιο δραστική στην εξουδετέρωση και κάθαρση του παθογόνου.¹

Τέλος το ανοσοποιητικό σύστημα αποκρίνεται φυσιολογικά μόνο σε ξένα αντιγόνα, μπορεί δηλαδή να διακρίνει το εαυτό από το μη εαυτό. Αυτή η ικανότητα είναι πολύ βασική. Η αδυναμία διάκρισης του εαυτού από το μη εαυτό οδηγεί σε ακατάλληλη απόκριση σε εαυτά συστατικά και μπορεί να γίνει θανατηφόρος και να οδηγήσει στην εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων.¹

Οι βασικοί κυτταρικοί παράγοντες της προσαρμοστικής ανοσίας είναι τα λεμφοκύτταρα και τα αντισώματα που παράγουν. Οι δύο κύριοι πληθυσμοί λεμφοκυττάρων είναι τα Β λεμφοκύτταρα και τα Τ λεμφοκύτταρα. Οι υποδοχείς αντιγόνου Β και Τ λεμφοκυττάρων είναι ποικιλόμορφοι.¹

1.5 Σχέσεις μεταξύ έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας

Η συνεργασία της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας ενισχύει την ανοσολογική απόκριση. Συνεπώς είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα συστήματα της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας δεν λειτουργούν ανεξάρτητα, αλλά αλληλεπιδρούν και συνεργάζονται, παράγοντας μία συνδυαστική απόκριση, αποτελεσματικότερη από ότι κάθε κλάδος ξεχωριστά. Στον πίνακα 1 παρακάτω δίνονται συγκριτικά στοιχεία για την έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία.¹

Πίνακας 1: Σύγκριση της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας.

	Έμφυτη	Προσαρμοστική
Χρόνος απόκρισης	Λεπτά/Ωρες	Ημέρες
Ειδικότητα	Περιορισμένη και καθορισμένη (Εξειδίκευση για μόρια και μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα)	Υψηλά ποικιλόμορφη. Βελτιώνεται κατά την διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης. Αναγνωρίζονται ακόμη και μικρές διαφορές της μοριακής δομής
Απόκριση σε επαναλαμβανόμενη μόλυνση (μνήμη)	Πανομοιότυπη με τον πρωτογενή	Πολύ γρηγορότερη και ισχυρότερη από την πρωτογενή
Διάκριση εαυτού/μη εαυτού	Τέλεια. Δεν υπάρχουν στον ξενιστή παρόμοια πρότυπα, όπως αυτά που είναι ειδικά για τα μικρόβια	Πολύ καλή. Αποτυχίες έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων.
Κύριοι κυτταρικοί τύποι	Φαγοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα), φυσικά φονικά (NK) κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα	T και B κύτταρα, Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
Βασικοί υποδοχείς	TLRs	Αντίσωμα (B λεμφοκύτταρα) TCR (υποδοχέας T κυττάρου)

1.6 Υποδοχείς έμφυτης ανοσίας

Μέχρι σήμερα έχει προσδιοριστεί ένα πλήθος υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων. Οι υποδοχείς τύπου Toll όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι οι πιο σημαντικοί. Άλλοι από αυτούς είναι παρόντες στην κυκλοφορία του αίματος και στα υγρά των ιστών ως διαλυτοί παράγοντες και άλλοι είναι συνδεδεμένοι στη μεμβράνη των μακροφάγων, των ουδετερόφιλων και των δενδριτικών κυττάρων. Οι MBL και CRP είναι διαλυτοί υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων που προσδένονται σε μικροβιακές επιφάνειες προάγοντας την φαγοκυττάρωση ή καθιστώντας τον εισβολέα πιθανό στόχο λύσης από το συμπλήρωμα. Ακόμη ένας διαλυτός υποδοχέας του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, η πρωτεΐνη που δεσμεύεται σε πολυσακχαρίτες (LBP) είναι σημαντική συνιστώσα του συστήματος που αναγνωρίζει και στέλνει το μήνυμα για απόκριση ενάντια σε λιποπολυσακχαρίτες που είναι συστατικά του εξωτερικού κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων. Οι πρωτεΐνες NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) αποτελούν την πιο πρόσφατη οικογένεια υποδοχέων που έχει βρεθεί ότι παίζουν ρόλο στην έμφυτη ανοσία. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι κυτταροπλασματικές και δύο μέλη της οικογένειας, η NOD1 και NOD2, αναγνωρίζουν προϊόντα που προέρχονται από βακτηριακές πεπτιδογλυκάνες. Η NOD1 δεσμεύεται στα τριπεπτιδικά προϊόντα αποικοδόμησης πεπτιδογλυκανών και η NOD2 αναγνωρίζει μουραμυλικά διπεπτίδια που προέρχονται από την αποικοδόμηση πεπτιδογλυκανών των κυτταρικών τοιχωμάτων Gram θετικών βακτηρίων. Μεταξύ των μεμβρανικών υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων περιλαμβάνονται οι υποδοχείς ρακοσυλλέκτες (SRs) που υπάρχουν στα μακροφάγα και σε πολλούς τύπους δενδριτικών κυττάρων. Οι SRs εμπλέκονται στη δέσμευση και ενδοκυττάρωση των Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων καθώς και στη φαγοκυττάρωση αποπτωτικών κυττάρων του ξενιστή.¹

1.7 Υποδοχείς τύπου Toll

1.7.1 Ιστορική αναδρομή - σημαντικές μελέτες

Η πρωτεΐνη Toll τράβηξε για πρώτη φορά την προσοχή την δεκαετία του 1980, όταν ερευνητές στη Γερμανία ανακάλυψαν ότι οι αναπτυσσόμενες μύγες δεν μπορούσαν να δημιουργήσουν κανονικό ραχιαίο-κοιλιακό άξονα απουσία Toll. Η Toll είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που λειτουργεί ως υποδοχέας μηνυμάτων. Κάποια μόρια που σχετίζονται με αυτήν έχουν κάποιο ρόλο στην έμφυτη ανοσία, χαρακτηρίστηκαν ως υποδοχείς τύπου Toll (Toll like receptors, TLRs). Τρεις πρόσφατες ανακαλύψεις προκάλεσαν χείμαρρο γνώσεων, σχετικά με τον κεντρικό ρόλο των TLRs στην έμφυτη ανοσία.^{1,14,15,28}

Η πρώτη παρατήρηση προέκυψε από την μύγα των φρούτων. Το 1996, οι Jules Hofman και Bruno Lemaitre ανακάλυψαν ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου Toll, που ήταν προηγουμένως γνωστό ότι επηρεάζει την διαδικασία της ανάπτυξης της μύγας, καθιστούσαν τις μύγες εξαιρετικά ευάλωτες σε θανατηφόρες μολύνσεις με *Aspergillus fumigates*, έναν μύκητα για τον οποίο οι μύγες αγρίου τύπου είχαν ανοσία. Αυτό το πείραμα-ορόσημο, κατέδειξε πειστικά την σημασία των ανοσολογικών αποκρίσεων, που πυροδοτούνται από παθογόνα, σε έναν ασπόνδυλο οργανισμό.¹

Έναν χρόνο αργότερα, το 1997, οι Ruslan Medzhitov και ο Charles Janeway ανακάλυψαν ότι μία συγκεκριμένη ανθρώπινη πρωτεΐνη, που προσδιορίστηκε από την ομολογία της κυτταροπλασματικής υπομονάδας της με την αντίστοιχη της Toll, ενεργοποίησε την έκφραση των γονιδίων, που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση, όταν το γονίδιο της μεταφέρθηκε τεχνητά στα κύτταρα μίας πειραματικής σειράς. Αυτή η ανθρώπινη πρωτεΐνη ονομάστηκε TLR4. Η ανακάλυψη αυτή, αποτέλεσε την πρώτη μαρτυρία ότι ένα μονοπάτι ανοσολογικής απόκρισης είχε διατηρηθεί κοινό μεταξύ της μύγας των φρούτων και του ανθρώπου.¹

Παρά το γεγονός ότι η *Drosophila* δεν έχει προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα, είναι πολύ ανθεκτική σε μικροβιακές λοιμώξεις. Αυτό, έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει επειδή το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα παρέχει προστασία που οφείλεται εν μέρει στη σύνθεση ισχυρών αντιμικροβιακών πεπτιδίων. Αυτά τα πεπτίδια που παράγονται σε απόκριση σε μονοπάτια σηματοδότησης ενεργοποιούνται από τουλάχιστον δύο μέλη της οικογένειας TLR και βρέθηκαν στη *Drosophila*, τα dToll και 18-wheeler. Η ενεργοποίηση του dToll επάγει ένα αντιμυκητιακό πεπτίδιο, την δροσομυκίνη (*drosomycin*), ενώ η ενεργοποίηση του 18-Wheeler επάγει ένα αντιβακτηριακό πεπτίδιο, την αττασίνη (*attacin*). Ένα βασικό βήμα στην ενεργοποίηση αυτών των αποκρίσεων στη *Drosophila* φαίνεται να είναι η ενεργοποίηση ενός πρωτεολυτικού καταρράκτη που παράγει πεπτιδικούς προσδέτες για την οικογένεια των υποδοχέων Toll. Είναι αξιοσημείωτο ότι, αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι οι TLRs είναι ικανοί να διακρίνουν μεταξύ των μυκήτων και των βακτηρίων και είναι ικανοί να επάγουν μία κατάλληλη και διακριτή αντιμικροβιακή απάντηση.^{2,28,7}

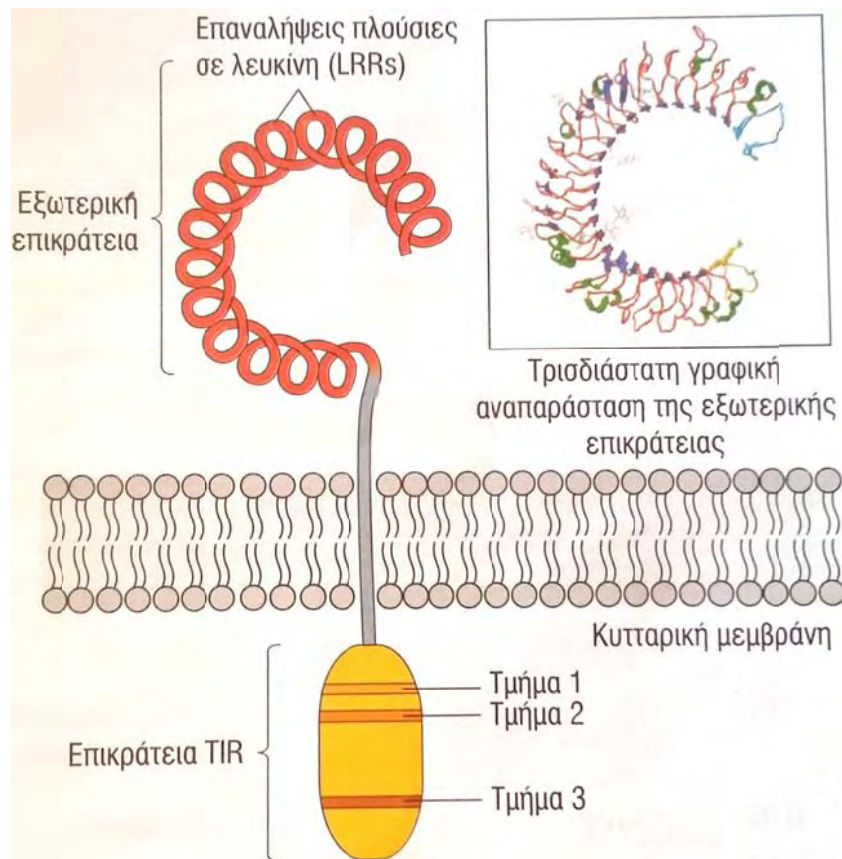
1.7.2 Δομή

Οι υποδοχείς τύπου Toll είναι όπως αναφέρθηκε διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μοιράζονται ένα κοινό δομικό στοιχείο στην εξωκυτταρική περιοχή τους, δηλαδή επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 24 έως 29 αμινοξέων που περιέχουν την αλληλουχία xLxxLxLxx (όπου x οποιοδήποτε αμινοξύ και L η λευκίνη). Αυτά τα

δομικά πρότυπα ονομάζονται επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (leucine-rich repeats, LLRs). Όλοι οι TLRs περιέχουν αρκετές LLRs και μία υπομονάδα αυτών δημιουργεί το εξωκυτταρικό τμήμα που αποτελεί την περιοχή του TLR, που δεσμεύει τον προσδέτη. Η ενδοκυτταρική περιοχή των TLR, ονομάζεται υπομονάδα TIR, από το Toll/IL-1 receptor, κάνοντας αναφορά κατά αυτόν τον τρόπο στην ομοιότητα μεταξύ των κυτταροπλασματικών επικρατειών των TLRs και της αντίστοιχης περιοχής του υποδοχέα IL-1, που είναι ένα σημαντικό ρυθμιστικό μόριο. Οι επικράτειες TIR διαθέτουν τρεις περιοχές, οι οποίες είναι πολύ συντηρητικές μεταξύ όλων των μελών της οικογένειας TIR, καλούνται τμήματα 1,2 και 3 και χρησιμεύουν ως περιοχές δέσμευσης ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, που συμμετέχουν στην οδό μεταγωγής σήματος που ρυθμίζεται από τους TLRs.^{1,20,7,2}

Αρκετοί υποδοχείς τύπου Toll, όπως οι TLRs 1,2,4 και 6, λειτουργούν με τη μορφή διμερών (σε μερικές περιπτώσεις στα σχηματιζόμενα σύμπλοκα προστίθενται επιπλέον πρωτεΐνες). Ο TLR4 δημιουργεί ζεύγη με τον εαυτό του (σχηματίζει δηλαδή ομοδιμερή). Για τους TLRs 3,7,8 και 9, υπάρχει η πιθανότητα να δρουν ως μονομερή, όμως ίσως το ταίρι τους απλά δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμα, ενώ κάποια πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ο TLR5 ίσως βρίσκεται με τη μορφή ομοδιμερούς.¹

Η δημιουργία ζευγών TLR επηρεάζει την λειτουργία τους. Ο συνδυασμός του TLR2 με τον TLR6 δεσμεύει μια μεγάλη ποικιλία μορίων που συναντώνται στα μικρόβια, συμπεριλαμβανομένων πεπτιδογλυκανών, της ζυμοζάνης και βακτηριακών λιποπεπτιδίων. Όταν όμως ο TLR2 συνδέεται με τον TLR1, αναγνωρίζει βακτηριακές λιποπρωτεΐνες και μερικές χαρακτηριστικές επιφανειακές πρωτεΐνες παρασίτων. Ο υποδοχέας TLR4 είναι κομβικός για την αναγνώριση των περισσότερων βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών. Ο TLR5 αναγνωρίζει την φλαγγελίνη, η οποία είναι το κύριο δομικό συστατικό των βακτηριακών μαστιγίων. Ο TLR3 αναγνωρίζει το δίκλωνο RNA (dsRNA), το οποίο εμφανίζεται στα κύτταρα μετά από μόλυνση με RNA ιούς, ενώ το ιικό μονόκλωνο RNA (ssRNA) αποτελεί τον προσδέτη των TLR8 και TLR7. Τέλος, ο TLR9 αναγνωρίζει και παράλληλα ρυθμίζει την απόκριση στην αλληλουχία DNA CpG (μη μεθυλιωμένη κυτοσίνη που συνδέεται με γουανίνη). Μη μεθυλιωμένες αλληλουχίες τέτοιας μορφής, συναντώνται σε αφθονία στο μικροβιακό DNA και πολύ σπανιότερα στο DNA των σπονδυλωτών.



Εικόνα 2. Δομή ενός υποδοχέα τύπου Toll (TRL). Οι υποδοχείς τύπου Toll διαθέτουν μία εξωτερική επικράτεια που περιέχει επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (LLRs), μία διαμεμβρανική περιοχή και μία εσωτερική επικράτεια που ονομάζεται TIR. Η περιοχή δέσμευσης του προσδέτη βρίσκεται μεταξύ των LLRs. Η επικράτεια TIR αλληλεπιδρά με τις επικράτειες TIR άλλων μελών του μονοπατιού σηματοδότησης που πυροδοτείται από τον TLR. Οι επικράτειες TIR χαρακτηρίζονται από υψηλά συντηρητικές αλληλουχίες αμινοξέων, που ονομάζονται τμήμα 1, τμήμα 2 και τμήμα 3 και είναι απαραίτητες για τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις.

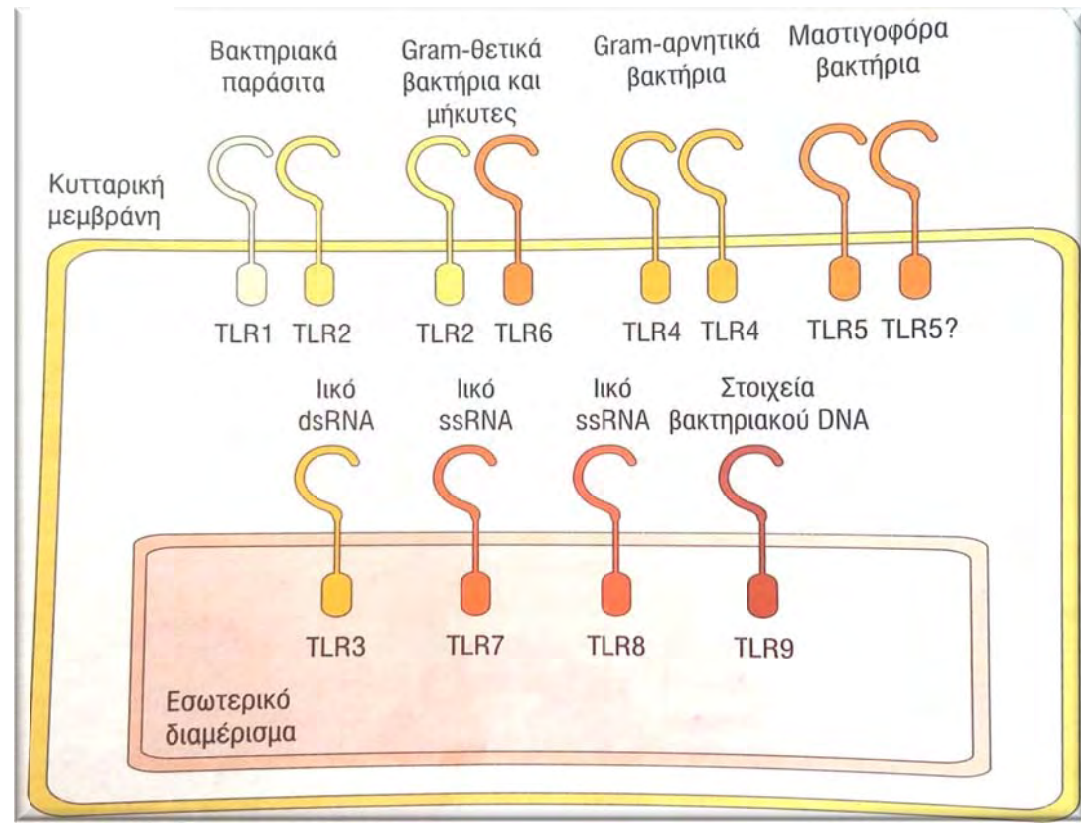
1.7.3 Προσδέτες

Για τους εννέα από τους 11 TLRs, που συναντώνται στον άνθρωπο, έχουν προσδιοριστεί οι λειτουργίες τους. Κάθε TLR, σε αυστηρά πλαίσια, ανιχνεύει ένα διακριτό ρεπερτόριο πολύ συντηρητικών παθογόνων μοριακών προτύπων. Η πλήρης ομάδα των TLRs του ανθρώπου ή του ποντικίου μπορούν να ανιχνεύσουν μία ευρεία ποικιλία ιών, βακτηρίων, μυκήτων, ακόμα και μερικά πρωτόζωα. Η ομάδα των TLRs του ανθρώπου, των οποίων έχουν προσδιοριστεί οι λειτουργίες και οι προσδέτες, φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι προσδέτες των TLRs είναι απαραίτητα συστατικά των παθογόνων: ένας ιός δεν μπορεί να λειτουργήσει χωρίς το νουκλεϊκό οξύ του, τα Gram αρνητικά βακτήρια δε μπορούν να υπάρξουν χωρίς κυτταρικά τοιχώματα που περιέχουν LPS και οι μύκητες πρέπει να ενσωματώνουν τον πολυσακχαρίτη ζυμοζάνη στα κυτταρικά τους τοιχώματα. Τα παθογόνα απλά δεν διαθέτουν την εναλλακτική δυνατότητα να μεταλλαγούν σε

μορφές, που θα παρουσιάζουν έλλειψη βασικών δομικών συστατικών τους, τα οποία αναγνωρίζονται από τους TLRs. Οι TLRs που αναγνωρίζουν εξωκυτταρικούς προσδέτες, βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων, ενώ αυτοί που αναγνωρίζουν ενδοκυτταρικούς προσδέτες, όπως το ιικό RNA ή θραύσματα βακτηριακού DNA, εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα.¹

Πίνακας 2: Οι TLR και οι προσδέτες τους

TLRs	Προσδέτες	Μικροβιακοί στόχοι
TLR1	Τριακυκλωμένα πεπτιδία	Μυκοβακτήρια
TLR1	Πεπτιδογλυκάνες Πρωτεΐνες που συνδέονται με GPI, Λιποπρωτεΐνες Ζυμοζάνη	Gram ⁺ βακτήρια Τρυπανόσωμα Μυκοβακτήρια Ζύμες και άλλοι Μύκητες
TLR3	Δίκλωνο RNA (dsRNA)	Ιοί
TLR4	LPS Πρωτεΐνη F	Gram ⁻ βακτήρια Ιός του αναπνευστικού συγκιτίου (RSV)
TLR5	Φλαγγελίνη	βακτήρια
TLR6	Διακυκλωμένα λιποπεπτιδία Ζυμοζάνη	Μυκοβακτήρια Ζύμες και άλλοι Μύκητες
TLR7	Μονόκλωνο RNA (ssRNA)	Ιοί
TLR8	Μονόκλωνο RNA (ssRNA)	Ιοί
TLR9	CpG μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια Δινουκλεοτίδια Μόλυνση από ερπετοϊό	Βακτηριακό DNA
TLR10,11	Άγνωστο	Άγνωστο



Εικόνα 3. Υποδοχείς τύπου Toll και οι προσδέτες τους. Οι TLRs που αλληλεπιδρούν με εξωκυτταρικούς προσδέτες βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, ενώ οι TLRs που δεσμεύουν προσδέτες που προέρχονται από το εσωτερικό των κυττάρων εντοπίζονται σε εσωτερικές μεμβράνες. Μερικοί TLRs δημιουργούν διμερή με άλλους TLRs, ο TLR4 διμερίζεται με τον εαυτό του (και ο TLR5 ίσως κάνει το ίδιο). Άλλοι TLRs λειτουργούν ως μονομερή, ή δεν έχουν ανακαλυφθεί ακόμα τα διμερή ταίρια τους.

1.7.4 Μεταγωγή σήματος

Οι υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας λαμβάνουν τα αρχικά μηνύματα, που ενεργοποιούν τις πολύπλοκες αποκρίσεις του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Το επόμενο στάδιο, που αφορά στη μεταβίβαση του μηνύματος στο εσωτερικό του κυττάρου, ή αλλιώς τη μεταγωγή του μηνύματος, αποτελεί μια διαδικασία γενικού χαρακτήρα στα βιολογικά συστήματα και μια περιοχή εκτεταμένης έρευνας σε πολλά πεδία πέραν της ανοσολογίας. Η απόκριση σε μηνύματα απαιτεί την ύπαρξη τριών στοιχείων: το μήνυμα αυτό καθ' αυτό, έναν υποδοχέα και ένα μονοπάτι μεταγωγής μηνύματος, που συνδέει τον ανιχνευτή με τους μηχανισμούς δράσης.¹

Μήνυμα → υποδοχέας → μεταγωγή σήματος → μηχανισμός δράσης

Στην περίπτωση της έμφυτης ανοσίας, το μήνυμα είναι ένα μικροβιακό προϊόν, ο υποδοχέας είναι ένας μικρός PRR, που βρίσκεται πάνω σε ένα λευκοκύτταρο και το μήνυμα μεταβιβάζεται διαμέσου αλληλεπιδράσεων συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών μορίων. Ο μηχανισμός δράσης -που λαμβάνει χώρα ως απόκριση στο μήνυμα- έχει σαν αποτέλεσμα την κάθαρση του οργανισμού-εισβολέα. Η σηματοδότηση και οι συνέπειές της είναι ένα βασικό θέμα έρευνας στην ανοσολογία.¹

Αν και οι TLRs και οι ρόλοι που διαδραματίζουν στην έμφυτη ανοσία ανακαλύφθηκαν πολύ πρόσφατα, τα κύρια μονοπάτια μεταγωγής μηνύματος που χρησιμοποιούν αυτοί οι υποδοχείς έχουν ήδη διερευνηθεί. Σε αυτό το σημείο εξετάζεται ένα μονοπάτι σηματοδότησης, που χρησιμοποιείται από αρκετούς TLRs, το οποίο μπορεί να χρησιμεύει σαν παράδειγμα, για τα μονοπάτια σηματοδότησης, που χρησιμοποιούν άλλοι υποδοχείς της έμφυτης ανοσίας, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται η παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, η παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων κλπ.

Έναρξη με αλληλεπίδραση του μηνύματος με τον υποδοχέα: Μικροβιακά προϊόντα δεσμεύονται στο εξωκυτταρικό τμήμα του TLR. Στην κυτταροπλασματική πλευρά, σε μια διακριτή περιοχή της πρωτεΐνης, εμπεριέχονται οι υψηλά συντηρητικές δομικές μονάδες TIR, που συναντώνται στα μόρια σηματοδότησης των ζώων και των φυτών. Οι περιοχές TIR παρέχουν θέσεις δέσμησης άλλων συστατικών του μονοπατιού.

Επαγόμενη από το μήνυμα, συγκρότηση των συστατικών του μονοπατιού/εμπλοκή ενός μορίου-προσαρμογέα: Οι πρωτεΐνες-προσαρμογείς, που περιέχουν TIR, αλληλεπιδρούν με τις περιοχές TIR των TLRs. Η πιο κοινή πρωτεΐνη-προσαρμογέας των TLRs είναι η MyD88, η οποία επάγει τη σύνδεση δυο πρωτεϊνικών κινασών, της IRAK1 και της IRAK4.

Φωσφορυλίωση που μεσολαβείται από πρωτεϊνικές κινάσες: Η πρωτεϊνική κινάση IRAK4, του συμπλέγματος IRAK1:IRAK4, φωσφορυλιώνει το ταίρι της, δηλαδή την IRAK1. Ο νεοπροστιθέμενος φώσφορος αποτελεί θέση δέσμησης του TRAF6 στην IRAK1, ο οποίος δεσμεύεται και αποδεσμεύεται σε συνεργασία με την IRAK1, για να σχηματίσει ένα ενδιάμεσο σύμπλεγμα IRAK1:TRAF6. Μια άλλη πρωτεϊνική κινάση, η TAK1, ενώνεται με το σύμπλεγμα μαζί με αρκετές άλλες πρωτεΐνες, προκαλώντας την ενεργοποίηση της δραστηριότητας κινάσης που διαθέτει.

Έναρξη ενός ενζυμικού καταρράκτη γεγονότων: Η TAK1 είναι κομβικής σημασίας στην λειτουργία του μονοπατιού, γιατί η δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης που διαθέτει, της επιτρέπει να προκαλεί την ενεργοποίηση, μέσω

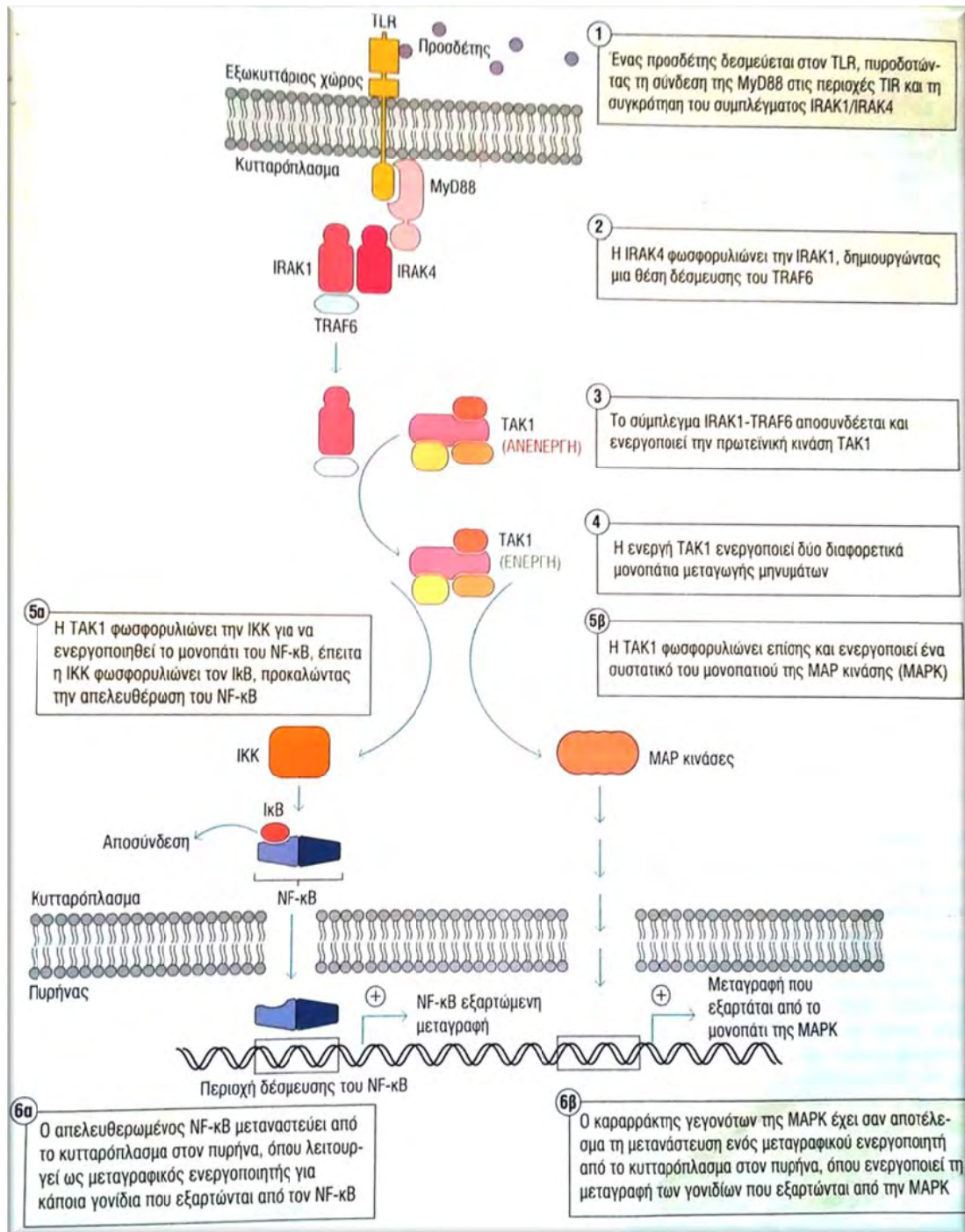
φωσφορυλίωσης, δυο άλλων σημαντικών μορίων μεταγωγής σήματος. Το ένα από αυτά, είναι η πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα (mitogen-activated protein kinase, MAP kinase) και το άλλο ο NF-κB (Necrosis Factor β). Τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχει η MAP κινάση, είναι σηματοδοτικές αλληλουχίες ενζυμικών διαδικασιών, που συναντώνται σε πολλούς τύπους κυττάρων και είναι συντηρητικές, εντός ενός μεγάλου εύρους ευκαρυωτών, από τις ζύμες μέχρι τον άνθρωπο. Το τελικό προϊόν αυτής της αλληλουχίας διαδικασιών, εισέρχεται στον πυρήνα και προάγει την φωσφορυλίωση ενός ή περισσότερων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι με την σειρά τους επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο ή την κυτταρική διαφοροποίηση.

Η TAK1 φωσφορυλιώνει επίσης την πρωτεϊνική κινάση IKK, η οποία είναι κομβικής σημασίας για την ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κB. Ο NF-κB είναι ένας ισχυρός μεταγραφικός παράγοντας, η δραστηριότητα του οποίου παρεμποδίζεται από μια μη φωσφορυλιωμένη μορφή μιας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης της IκB. Μόρια NF-κB συνδεδεμένα με μη φωσφορυλιωμένη IKK συναντώνται στο κυτταροπλασμα. Η κινάση IKK φωσφορυλιώνει τον IκB, προκαλώντας την αποδέσμευση του NF-κB, ο οποίος στην συνέχεια μπορεί να μεταναστεύσει στον πυρήνα.

Η παρουσία του NF-κB στον πυρήνα επάγει τη μεταγραφή πολλών γονιδίων, που είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική λειτουργία της έμφυτης ανοσίας. Στα σπονδυλωτά, τα μονοπάτια που ρυθμίζονται από τον NF-κB παράγουν κυτταροκίνες, μόρια προσκόλλησης και άλλα δραστικά μόρια της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης. Επίσης, ο NF-κB παίζει ρόλο σε μερικά κομβικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος στα T και B κύτταρα και ως εκ τούτου είναι σημαντικός και για την προσαρμοστική ανοσία.

Η ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης, που ξεκινούν από τους TLRs, έχει πολλά αποτελέσματα. Προάγει την έκφραση γονιδίων, που συμμετέχουν στην φλεγμονή, επάγει αλλαγές στα αντιγονοπαραστασιακά κύτταρα, οι οποίες τα καθιστούν αποτελεσματικότερα στην παρουσίαση αντιγόνων και προκαλεί την σύνθεση και έκκριση διακυτταρικών μορίων σηματοδότησης, τα οποία επηρεάζουν τη συμπεριφορά των λευκοκυττάρων και άλλων κυττάρων. Η ενεργοποίηση των TLRs μπορεί να αυξήσει τη φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων και να αλλάξει την φυσιολογία τους, με τέτοιο τρόπο ώστε να προκαλέσει αύξηση της ικανότητάς τους να θανατώνουν και να εξαλείφουν παθογόνα. Σε συστήματα ασπόνδυλων, η σηματοδότηση μέσω TLRs ενεργοποιεί μια ποικιλία αποτελεσματικών συστημάτων ανοσίας. Οι περισσότεροι, αλλά όχι όλοι, TLRs χρησιμοποιούν το μονοπάτι μεταγωγής μηνύματος της εικόνας 4. Ο TLR3 χρησιμοποιεί ένα μονοπάτι που δεν εξαρτάται από την MyD88, και ο TLR4

χρησιμοποιεί και τα δυο μονοπάτια που προαναφέρθηκαν, καθώς και το ανεξάρτητο της MyD88 μονοπάτι, που χρησιμοποιείται από τον TLR3.



Εικόνα 4. Ένα τυπικό μονοπάτι μεταγωγής μηνύματος που πυροδοτείται από τον TLR. Συνοτομογραφίες: MyD88= πρωτεΐνη 88 της πρωτογενούς απόκρισης μυελοειδούς διαφοροποίησης, IRAK=κινάση που σχετίζεται με τον υποδοχέα IL-1R, IL-1R=υποδοχέας ιντερλευκίνης 1, TRAF6=παράγοντας 6 που σχετίζεται με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων, TAK1=κινάση 1 που ενεργοποιείται από τον τροποποιητικό παράγοντα όγκων β (TGF-β), MAPK=πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα, IκB= αναστολέας του NF-κB, IKK=κινάση του IκB.

1.8 Ο υποδοχέας TLR4

Ο υποδοχέας TLR4 ήταν ο υποδοχέας που μελετήθηκε περισσότερο και συνδέθηκε με την επαγωγή της έμφυτης ανοσίας. Η ενεργοποίηση του TLR4 έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτοκινών, χημειοκινών, αντιμικροβιακών πεπτιδίων, και διεγερτικών μορίων που ενεργοποιούν το προσαρμοστικό σύστημα.³

Η δομή του υποδοχέα TLR4 είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω για όλους τους TLRs. Η εξωκυτταρική περιοχή του TLR4 αποτελείται από 22 LRRs. Αρκετές περιοχές του TLR4 μοιράζονται παρόμοια δευτεροταγή δομή όπως είναι N τελικές περιοχές, κεντρικές και C τελικές περιοχές.⁷

1.8.1 Προσδέτες

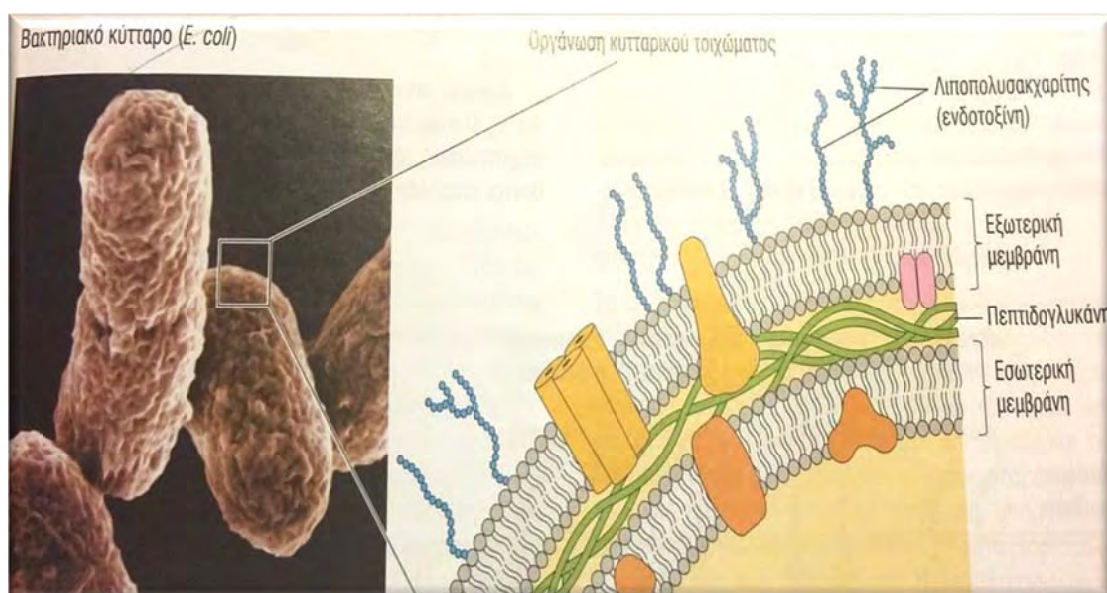
Ο κύριος προσδέτης του TLR4 είναι η ενδοτοξίνη (LPS) όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Η ενδοτοξίνη ανήκει στην οικογένεια γλυκολιπιδίων της εξωκυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων. Λειτουργεί ως φυσικός φραγμός που προστατεύει τα βακτήρια από τις κυτταροτοξικές αντιμικροβιακές πρωτεΐνες του ξενιστή.^{21,22,2,7,4,20}

Το 1998, η απόδειξη ότι οι TLRs αποτελούν τμήμα της φυσιολογικής ανοσοφυσιολογίας των σπονδυλωτών, προήλθε από μελέτες μεταλλαγμένων ποντικών που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Bruce Beutler, ταυτόχρονα με την ανακάλυψη της σύνδεσης ανάμεσα στον TLR4 και στην LPS επαγόμενη μεταγωγή σήματος. Τα ομόζυγα ποντίκια, για τη γενετική περιοχή *Ips*, παρουσιάζονται ανθεκτικά στον λιποσακχαρίτη LPS. Το βασικό δομικό χαρακτηριστικό της LPS που ρυθμίζει την αλληλεπίδραση με το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα είναι γνωστό ως λιπίδιο A. Ανεξάρτητα από τον τύπο του Gram αρνητικού βακτηρίου, το λιπίδιο A συντίθεται από μία «ραχοκοκαλιά» γλυκοζαμίνης που συνδέεται με λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας με εστερικούς και αμιδικούς δεσμούς.^{2,7}

Στον άνθρωπο, η συσσώρευση της ενδοτοξίνης, λόγω σοβαρής βακτηριακής μόλυνσης μπορεί να προκαλέσει σηπτικό σοκ, μία κατάσταση που είναι απειλητική για τη ζωή και χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργία διάφορων οργάνων, όπως του εγκεφάλου, της καρδιάς, των νεφρών και του ήπατος. Κάθε χρόνο περίπου 20.000 άνθρωποι πεθαίνουν από σηπτικό σοκ από μολύνσεις που προκαλούνται από Gram αρνητικά βακτήρια και για αυτό ήταν αξιοσημείωτο το γεγονός ότι μερικά μεταλλαγμένα στελέχη ποντικών ήταν ανθεκτικά σε θανατηφόρες δόσεις LPS. Η ανάλυση της αλληλουχίας του DNA έδειξε ότι το γονίδιο *Ips* του ποντικίου κωδικοποιούσε μια μεταλλαγμένη μορφή του TLR4 η οποία διέφερε από τη

φυσιολογική μορφή κατά ένα αμινοξύ. Η εργασία αυτή έδειξε αναμφίβολα ότι ο TLR4 είναι απαραίτητος για την αναγνώριση του LPS και ότι οι TLRs όντως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ανοσοφυσιολογία. Μέσα σε λίγα χρόνια, οι εργασίες πολλών ερευνητών είχαν προσδιορίσει αρκετούς TLRs.²

Παρόλο που η σχέση μεταξύ του TLR4 και των λιποπολυσακχαριτών της κυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων είναι αυτή που έχει μελετηθεί περισσότερο, ο TLR4 αλληλεπιδρά τόσο με άλλους εξωγενείς, όσο και με ενδογενείς συνδέτες. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (πρωτεΐνη F), πρωτεΐνες θερμικού σοκ 60 και 70, υαλουρονικό οξύ, ινωδονεκτίνη και το ινωδογόνο.^{3,20}



Εικόνα 5: Λιποπολυσακχαρίτης (LPS) στο κυτταρικό τοίχωμα της E.coli. Ο LPS είναι ένας ισχυρός διεγέρτης της έμφυτης ανοσίας.¹

1.8.2 Μεταγωγή σήματος του TLR4

Ο TLR4 ακολουθεί τον ίδιο τρόπο μεταγωγής σήματος με τους υπόλοιπους υποδοχείς τύπου Toll. Έχουν παρατηρηθεί όμως κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Η μέγιστη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή στην ενδοτοξίνη είναι αποτέλεσμα, σε πρώτο στάδιο, της αλληλεπίδρασης της ενδοτοξίνης με μία πρωτεΐνη του ξενιστή που συνδέεται με λιποσακχαρίτες, γνωστή ως Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP) και με την αλβουμίνη (πρωτεΐνη του αίματος). Οι δύο τελευταίες προωθούν την απομάκρυνση της ενδοτοξίνης από το

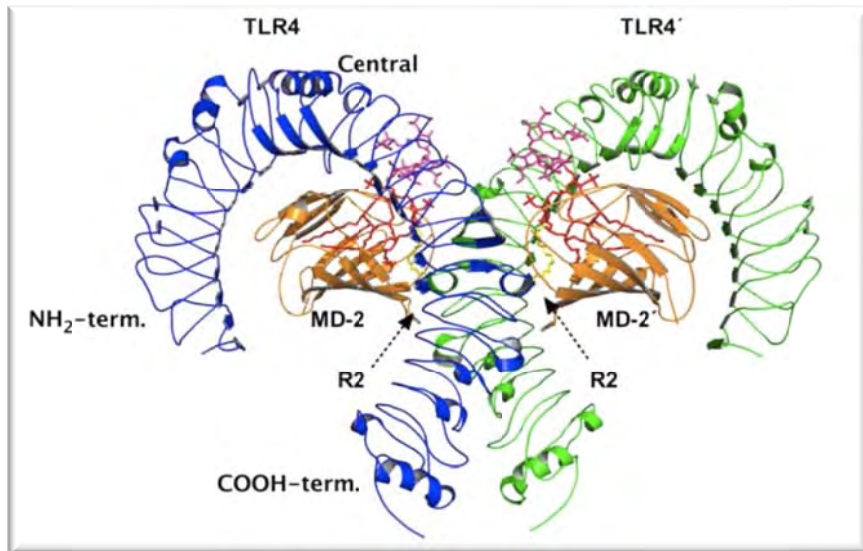
κυτταρικό τοίχωμα και την μεταφορά μονομερών της στον υποδοχέα CD14.
1,4,7,14,15,25

Η LBP είναι μία πρωτεΐνη του πλάσματος που παράγεται από τα ηπατοκύτταρα και εντοπίζεται σε χαμηλά επίπεδα στην κυκλοφορία. Η συγκέντρωση της αυξάνεται σημαντικά κατά την διάρκεια της οξείας φάσης της φλεγμονής. Στο N τελικό της άκρο γίνεται η πρόσδεση της ενδοτοξίνης και το C τελικό της άκρο είναι απαραίτητο για την διαδικασία μεταφοράς της ενδοτοξίνης.
1,4,7,14,15,25

Η CD14 με μοριακό βάρος 50kDa είναι ένας υποδοχέας που εκφράζεται στις κυτταρικές μεμβράνες των μυελοειδών κυττάρων και των λιποκυττάρων, μπορεί όμως να βρεθεί και ως διαλυτή πρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα μετά από LPS επαγόμενη σηματοδότηση, ή από τα κύτταρα του ήπατος μετά από διέγερση από IL-6. Η διαλυτή μορφή της παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε κύτταρα που στερούνται CD14 συνδεδεμένη στη μεμβράνη όπως τα επιθηλιακά. Αποτελείται από 11 επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (LRRs) και από μία ρηχή κοιλότητα στο N- τελικό της άκρο που αποτελείται από υδρόφοβα κατάλοιπα και είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση του λιπιδίου A της ενδοτοξίνης.
1,4,7,14,15,25

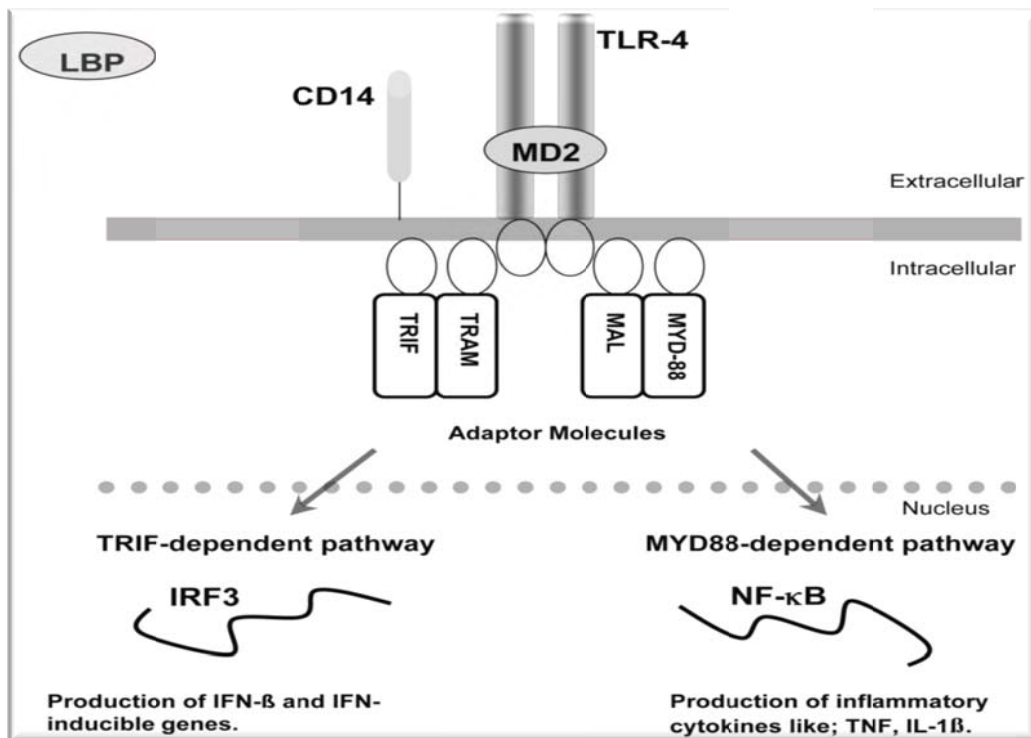
Ουσιαστικά η LBP είναι μία οψωνίνη και ο CD14 ένας υποδοχέας οψωνίνης για συμπλέγματα του LPS (ή τμήματα που περιέχουν LPS στα βακτήρια) και LBP.^{2,7}

Τα μονομερή της ενδοτοξίνης λοιπόν μεταφέρονται από τον CD14 στην MD-2 που είναι συνδεδεμένη με τον TLR4, προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση του TLR4. Η MD-2 είναι μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη που λειτουργεί με δέσμευση στην εξωκυτταρική περιοχή του TLR4 και διευκολύνει την LPS απόκριση, ίσως σταθεροποιώντας τα διμερή του υποδοχέα, κάτι το οποίο όμως ακόμα δεν έχει αποδειχθεί. Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που ανήκει στην υπεροικογένεια των ML λιπιδιο-δεσμευτικών πρωτεϊνών και έχει μοριακό βάρος 25 kDa. Έχει σχήμα βαρελιού με έναν βαθύ υδρόφοβο θύλακα που συνδέει το λιπίδιο A με τη ραχοκοκαλιά γλυκοζαμίνης. Η σταθεροποίηση των διμερών του υποδοχέα πραγματοποιείται με τη επαφή των αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων στην κορυφή του υδρόφοβου θύλακα και κατά μήκος της ραχοκοκαλιάς γλυκοζαμίνης με θετικά φορτισμένα κατάλοιπα στην αντίθετη πλευρά του TLR4. Τα κύτταρα του ξενιστή έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να εκφράσουν μόνο τον TLR4 ή σε συνδυασμό με την MD-2. Έχει αποδειχθεί ότι η συνέκφραση του MD-2 μπορεί να αυξήσει την επιφανειακή έκφραση του TLR4, αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό δεν είναι ξεκάθαροι.^{7,2}



Εικόνα 6: Δομή του συμπλόκου σηματοδότησης LPS·MD-2·TLR4. Δύο MD-2 (Πορτοκαλί) μόρια έρχονται αρχικά σε επαφή με κατάλοιπα στο N- τελικό άκρο του TLR4. Η ραχοκοκαλιά της ενδοτοξίνης του βακτηρίου E.Coli (ροζ) μαζί με μία αλυσίδα λιπαρού οξέος (κίτρινο), πιστεύεται ότι έρχονται σε επαφή με θετικά φορτισμένα κατάλοιπα του C- τελικού άκρου του υποδοχέα, γεγονός που διαμεσολαβεί για τον διμερισμό.

Ο ενεργός TLR4 είναι ικανός να ενεργοποιεί δύο διακριτά μονοπάτια ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, το εξαρτώμενο από MyD88 και το εξαρτώμενο από TRIF.^{7,25,29}



Εικόνα 7: Σχηματική επισκόπηση του μονοπατιού σηματοδότησης TLR4 μετά από ενεργοποίηση από την LPS.

Στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος του TLR4 συμμετέχουν και πρωτεΐνες προσαρμογής. Επί του παρόντος έχουν αναγνωρισθεί 5 πρωτεΐνες προσαρμογής που περιέχουν μία TIR περιοχή, η οποία συνδέεται με την TIR περιοχή του TLR4. Αυτές είναι οι: Mal, MyD88, TRIF, TRAM και η SARM. Ο SARM είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της TLR4 σηματοδότησης. Αν και ήδη αρκετά είναι πλέον γνωστά για τη σηματοδότηση μέσω TLR4, οι μηχανισμοί ρύθμισης της σηματοδότησης είναι ακόμα ασαφής.^{7,25,29,14,15}

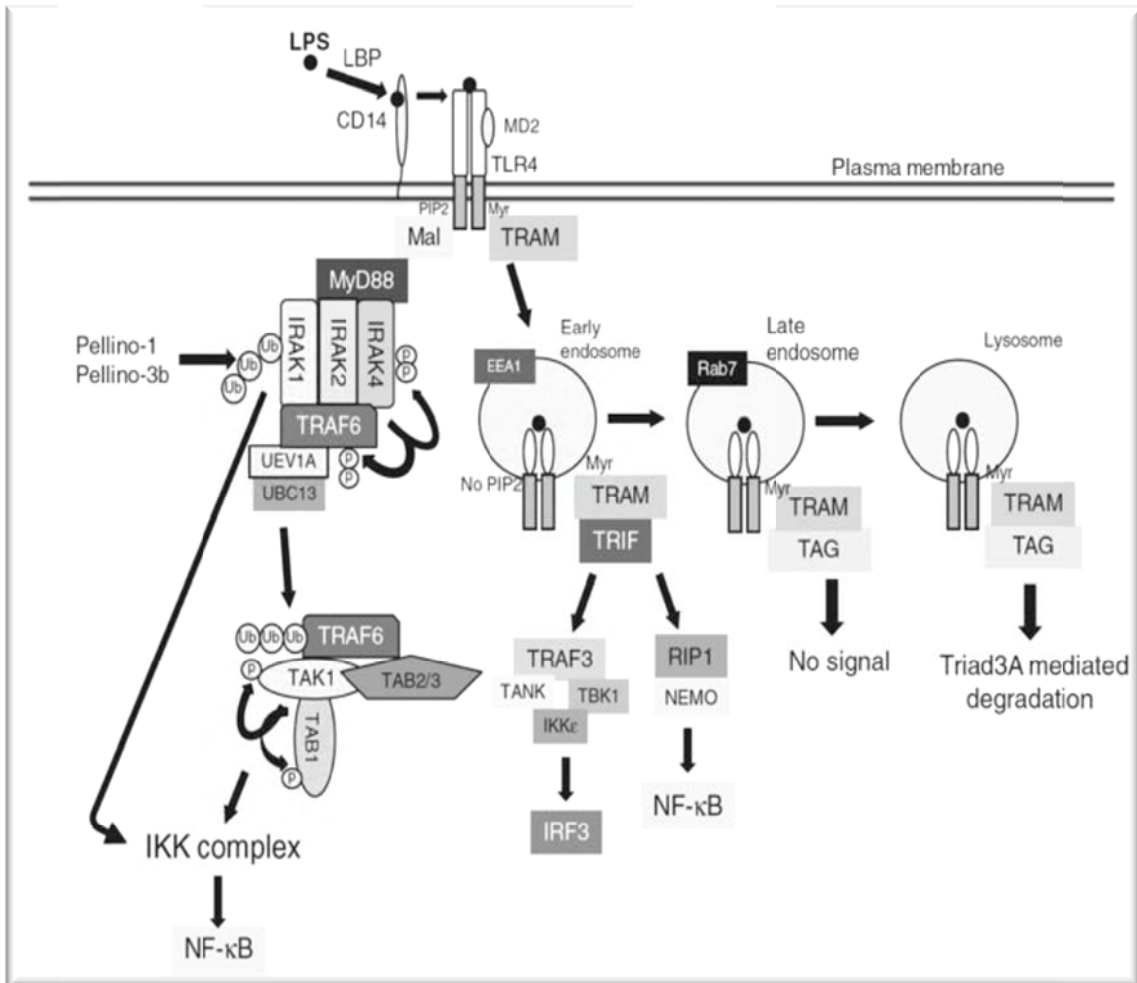
Το μονοπάτι σηματοδότησης εξαρτώμενο από MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) είναι υπεύθυνο για την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως IL-6, IL-8 και TNF (Tumor Necrosis Factor). Συμμετέχει η πρωτεΐνη προσαρμογής Mal, που περιέχει στο N τελικό άκρο μία περιοχή δέσμευσης με τα PIP₂ (φωσφατιδυλο(4,5)διφωσφορική ινοσιτόλη) της μεμβράνης. Το C τελικό της άκρο έχει μία ομόλογη TIR περιοχή, η οποία αλληλεπιδρά με την TIR περιοχή του ενεργοποιημένου TLR4. Αυτό το σύμπλοκο στρατολογεί την πρωτεΐνη προσαρμογής MyD88 από το κυτταρόπλασμα, στην οποία στη συνέχεια προσδένονται οι IRAK1,2 και 4. Αυτό οδηγεί στην φωσφορυλίωση και στην διάσπαση της IRAK2 και 4 από το σύμπλοκο Mal·MyD88·IRAK, και έτσι αυτά τα μόρια πηγαίνουν προς το κυτταρόπλασμα για να αλληλεπιδράσουν με την E3 λιγάση της ουβικιτίνης TRAF6. Στη συνέχεια ουβικιτινώνεται και ενεργοποιείται η TAK1 η οποία εν τέλει ενεργοποιεί την TAB1. Αυτή η πρωτεΐνη μαζί με τις TAB2 και TAB3, συνεχίζουν να κινητοποιούν κινάσες που συμμετέχουν στο μονοπάτι p38 και JNK. Επιπρόσθετα το σύμπλοκο TRAF6/TAK1/TAB1 ενεργοποιεί την IKK, η οποία ενεργοποιεί τη σηματοδότηση μέσω NFκB. Σε μερικές περιπτώσεις η NFκB σηματοδότηση μπορεί να ενεργοποιηθεί άμεσα από την IRAK, στα αρχικά στάδια σηματοδότησης μέσω MyD88.^{7,25,29,14,15}

Μια εναλλακτική οδός στην σηματοδότηση από την ενδοτοξίνη είχε αρχικά προταθεί όταν ζώα με ανεπάρκεια στην MyD88 ήταν ακόμα σε θέση να παράγουν κυτοκίνες σε απόκριση προς LPS. Η ενδοκυτταρική πρωτεΐνη προσαρμογής TRIF, από την οποία το μονοπάτι παίρνει το όνομά του, έχει και αυτή μία περιοχή TIR. Η εξαρτώμενη από TRIF σηματοδότηση είναι ο κύριος υπεύθυνος για την έναρξη του μονοπατιού ανταπόκρισης της ιντερφερόνης τύπου I και την παραγωγή πρόσθετων ανοσοτροποποιητικών κυτταροκινών όπως RANTES και IP-10.^{7,25,29,14,15}

Η TRIF εξαρτώμενη σηματοδότηση πιστεύεται ότι ξεκινάει στο πρώιμο ενδόσωμα όπου η TRAM, μία πρωτεΐνη προσαρμογής με μυριστουλιωμένο το N-τελικό της άκρο, έχει προσληφθεί από τη μεμβράνη του ενδοσώματος στην περιοχή TIR του ενεργοποιημένου TLR4. Η TRAM τότε χρησιμεύει ως μια θέση πρόσδεσης για την TRIF, που έχει προσληφθεί από την κυτοσόλιο. Η TRIF ενώνεται με την TRAM και στη συνέχεια ενεργοποιούν δύο διαφορετικές ενδοκυτταρικές οδούς. Ο

υποδοχέας της πρωτεΐνης αλληλεπίδρασης 1 (RIP1), μία κινάση σερίνης/θρεονίνης, έχει προσληφθεί στην C-τερματική περιοχή του TRIF. Τότε αυτό το σύμπλοκο ενεργοποιεί την NEMO, η οποία στη συνέχεια πηγαίνει για να ξεκινήσει TRAF-ανεξάρτητο μονοπάτι ενεργοποίησης του συμπλέγματος IKK και κινητοποίηση του NF-κΒ. Επιπρόσθετα, η N τελική περιοχή της TRIF αλληλεπιδρά με TRAF3, η οποία δεσμεύει TANK, TBK1 και την IKK, γεγονός που οδηγεί στην φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα IRF3. Μόλις φωσφορυλιωθεί ο IRF3 ομοδιμερίζεται και κινείται μέσα στον πυρήνα, όπου προάγει την μεταγραφή γονιδίων που συνδέονται με την INFβ σηματοδότηση. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι TRIF σηματοδότηση μπορεί να είναι διφασική, με κάποιο περιορισμένο ποσοστό TRIF-σηματοδότησης που μπορεί να λάβει χώρα στο μεμβράνη πριν από την πλήρη ενδοκυττάρωση του ενεργοποιημένου υποδοχέα.^{7,25,29,14,15}

Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι οι δύο οδοί σηματοδότησης TLR4, ενεργοποιούνται διαδοχικά κατά την ενεργοποίηση TLR4 από την ενδοτοξίνη. Η Εξαρτώμενη από MyD88 οδός κανονικά ενεργοποιείται πρώτα και λαμβάνει το σήμα και το μεταδίδει από την επιφάνεια του κυττάρου. Πιστεύεται ότι σχεδόν την ίδια στιγμή, μια σειρά άλλων μονοπατιών σηματοδότησης εκδηλώνονται που χρησιμεύουν τελικά στο να αναστέλλουν την εξαρτώμενη από MyD88 απόκριση και προωθούν την ενδοκυττάρωση του ενεργοποιημένου συμπλόκου Ενδοτοξίνη·MD-2·TLR4 από την επιφάνεια του κυττάρου. Σημαντικά, η πτώση των επιπέδων PIP2 στην κυτταρική επιφάνεια, γεγονός που συμβαίνει μετά την ενεργοποίηση του TLR4 και συμπίπτει με την ενδοκύττωση του συμπλόκου Ενδοτοξίνη·MD-2·TLR4, οδηγεί σε διάσπαση της πρωτεΐνης MAL από την περιοχή TIR του TLR4, η οποία τερματίζει την εξαρτώμενη από MyD88 σηματοδότηση. Ο ενεργοποιημένος TLR4 υποδοχέας στη συνέχεια μεταναστεύει στα ενδοσώματα πιθανώς για να έρθει σε επαφή με την TRAM, η οποία θα είναι ελεύθερη να δεσμευτεί στην TIR περιοχή του συμπλόκου Ενδοτοξίνη·MD-2·TLR4. Το γεγονός αυτό θα προσελκύσει την TRIF από το κυτοσόλιο και θα ενεργοποιήσει την TRIF-εξαρτώμενη οδό. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή της ενδοκύττωσης του TLR4 εμποδίζει την ένωση με την TRAM και έτσι αναστέλλει την παραγωγή ιντερφερονών τύπου 1. Εναλλακτικά η TRIF- εξαρτώμενη σηματοδότηση μπορεί να λάβει χώρα στη μεμβράνη μέσω του TRAF6, ενώ η σηματοδότηση μέσω TRAF3 πραγματοποιείται μόνο στο ενδόσωμα.



Εικόνα 8: Αναλυτική σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών σηματοδότησης του TLR4.

1.8.3 Αρνητικοί ρυθμιστές της TLR4 σηματοδότησης

Εξίσου σημαντική με την έναρξη της TLR4 σηματοδότησης είναι η ικανότητα να ελέγχει το μέγεθος της ενεργοποίησης. Από την ανακάλυψη του TLRs, πολλές πρωτεΐνες έχουν προσδιοριστεί που παίζουν ρόλο στην αναστολή της TLR σηματοδότησης. Παραδείγματα αναστολέων είναι: SARM, MyD88-s, RP105, και SOCS-1.^{7,18}

Η SARM ήταν η πέμπτη πρωτεΐνη που εντοπίστηκε ότι έχει μία περιοχή TIR. Η SARM λειτουργεί μέσω άμεσης σύνδεσης με την περιοχή TIR του υποδοχέα, γεγονός που εμποδίζει την συναρμολόγηση του συμπλέγματος σηματοδότησης TRAF3 και επομένως εμποδίζει την TRIF-εξαρτώμενη σηματοδότηση στο ενδόσωμα αλλά και την TRAF6 σηματοδότηση στην επιφάνεια του κυττάρου. Αρχικά θεωρούνταν ως ειδικός ρυθμιστής της TRIF-εξαρτώμενης σηματοδότησης καθώς η υπερέκφραση της πρωτεΐνης μπλόκαρε την TRIF-εξαρτώμενη σηματοδότηση ενώ η καταστολή της με RNAi οδηγεί στην αύξηση της TRIF-εξαρτώμενης σηματοδότησης.

Όμως έχει πλέον αποδειχθεί ότι αναστέλλει την AP-1 ενεργοποίηση, εξαρτώμενη από MyD88 σηματοδότηση, υποδηλώνοντας ότι παίζει ρόλο και στην MyD88-εξαρτώμενη σηματοδότηση.^{7,18}

Η MyD88s είναι μία πρωτεΐνη που είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος της MyD88, η οποία στερείται την περιοχή έλικας μεταξύ της περιοχής TIR και του τομέα θανάτου που έχει αποδειχθεί ότι είναι ζωτικής σημασίας για την δέσμευση της IRAK-4. Έτσι, η σύνδεση του MyD88s στην περιοχή TIR του TLR4 μπλοκάρει την MyD-88-εξαρτώμενη σηματοδότηση.^{7,18}

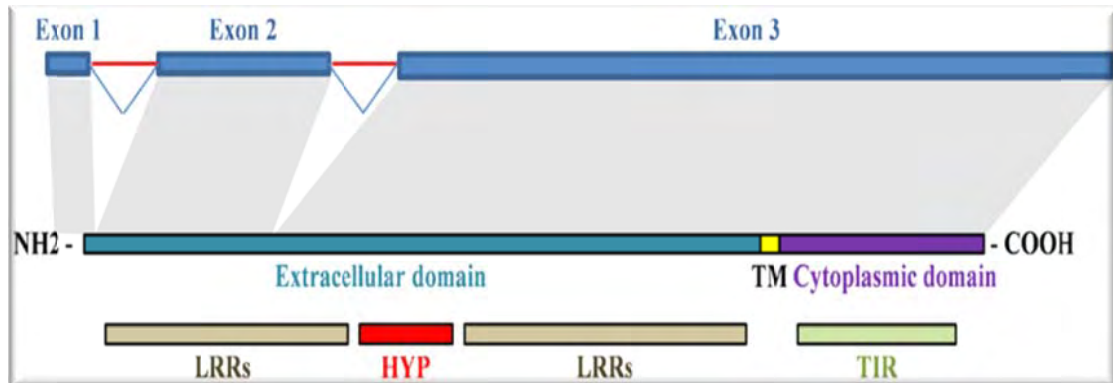
Ένας από τους καλύτερα μελετημένους αρνητικούς ρυθμιστές της TLR4 σηματοδότησης είναι το ομόλογο του TLR4, η RP105. Όπως και ο TLR4, ο RP105 περιέχει μία εξωκυτταρική LRRs περιοχή, ωστόσο, δεν διαθέτει την ενδοκυτταρική περιοχή TIR που απαιτείται για το σήμα TLR4.^{7,18}

Ο RP105 έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με ένα ομόλογο της MD-2, την MD-1, και δημιουργεί σύμπλοκο μαζί της. Αυτή η αλληλεπίδραση πιστεύεται ότι αναστέλλει τη συγκρότηση του συμπλόκου MD-2·TLR4, και μπορεί επίσης να επηρεάσει την διμερισμό των ενεργοποιημένων MD-2·TLR4 συμπλόκων.^{7,18}

Η SOCS-1 έχει επίσης αναγνωριστεί ως ένας αρνητικός ρυθμιστής της TLR4 σηματοδότησης. Έχει αποδειχθεί ότι η SOCS-1 αλληλεπιδρά με τη φωσφορυλιωμένη Mal, ένα γεγονός που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της TLR4 σηματοδότησης και ρυθμίζεται από τη δράση της ενδοκυτταρικής κινάσης Btk. Μόλις η κινάση Btk φωσφορυλιώνει την Mal, η SOCS-1 προσδένεται και μπορεί να προκαλέσει πολυουβικιτινίωση της πρωτεΐνης, η οποία οδηγεί σε αποικοδόμηση της Mal από το πρωτεόσωμα. Αυτό μειώνει ενδοκυτταρικά τα διαθέσιμα μόρια Mal, και αναστέλλει τη σηματοδότηση μέσω TLR4.^{7,18}

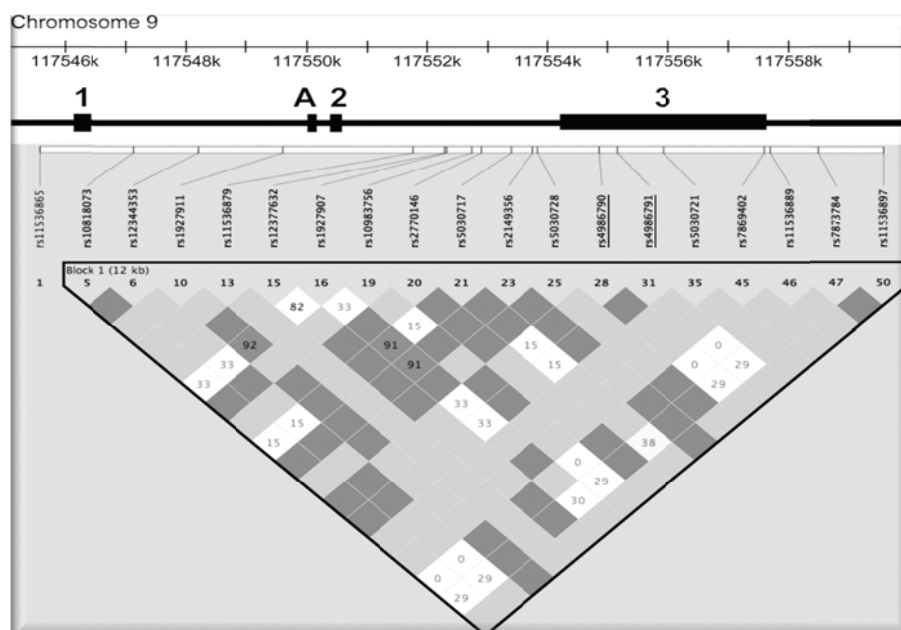
1.8.4 Πολυμορφισμοί *Asp299Gly* και *Thr399Ile* του *TLR4*

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον TLR4 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9, συγκεκριμένα στον q βραχίονα (9q33,1), και αποτελείται από 3 εξόνια.



Εικόνα 9: Το ανθρώπινο γονίδιο TLR4 και οι πρωτεΐνες που μεταφράζονται από κάθε περιοχή για την συγκρότηση του υποδοχέα. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο σήμα και τα πρώτα αμινοξέα της εξωκυτταρικής περιοχής. Το εξόνιο 2 κωδικοποιεί πρώτο LRRs στο εξωκυτταρικό πεδίο. Το εξόνιο 3 κωδικοποιεί το υπόλοιπο εξωκυτταρικό τμήμα (υπερμεταβλητή περιοχή και LRRs), την διαμεμβρανική περιοχή και την κυτταροπλασματική περιοχή. TM = διαμεμβρανική περιοχή. HYP = υπερμεταβλητής περιοχής.⁹

Οι πολυμορφισμοί του TLR4, *Asp299Gly* (A + 896G, με SNP ID: rs 4986790), και *Thr399Ile* (C + 1196T, με SNP ID: rs 4986791), εντοπίζονται στο 3^ο εξόνιο όπως φαίνεται στην εικόνα παρακάτω. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό *Asp299Gly*, έχουμε μία αντικατάσταση A σε G (GAT ⇒ GGT) και σχετικά με τον πολυμορφισμό *Thr399Ile* έχουμε μία αντικατάσταση C σε T (ACC ⇒ ATC). Η συχνότητα των πολυμορφισμών είναι αρκετά χαμηλή σε ανθρώπινους πληθυσμούς.



Εικόνα 10: Η γενετική ποικιλομορφία στη γονιδιωματική περιοχή του TLR4 στο χρωμόσωμα.⁸

Μερικές μελέτες, όχι όλες, έχουν δείξει ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί οδηγούν σε μειωμένη απόκριση κυτοκινών και αυξημένη ευπάθεια σε λοιμώξεις που προκαλούνται από Gram αρνητικά βακτήρια. Πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες για την προσπάθεια συσχέτισης των απλοτύπων Asp299Gly και Thr399Ile με κάποιο φαινότυπο. Παρατηρήθηκε ότι ο γονότυπος που οδηγεί σε μειωμένη έκκριση κυτοκινών σε απόκριση στην LPS και σε αυξημένη ευπάθεια σε λοιμώξεις των Gram αρνητικών βακτηρίων είναι ο Asp299Gly. Δυστυχώς επειδή ο γονότυπος Thr399Ile είναι αρκετά σπάνιος στον πληθυσμό, ο φαινότυπός του είναι ακόμα άγνωστος. Παρόλα αυτά δεν έχει παρατηρηθεί μέχρι στιγμής καμία επίδραση των πολυμορφισμών στη συχνότητα έκφρασης του TLR4 ή στον υποκυτταρικό εντοπισμό του, όπως επίσης και στο διμερισμό του TLR4.^{24,14,15,30,32,23}

Σύμφωνα με έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στην Αφρική, το *Plasmodium Falciparum*, παράγει γλυκοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (GPI) που μπορεί να ενεργοποιήσει τον TLR4 και συνεπώς το σύστημα της έμφυτης ανοσίας. Οι πολυμορφισμοί του TLR4 φαίνεται ότι συνεκφράζονται με υψηλή διεισδυτικότητα σε πληθυσμούς στην Αφρική. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση της ποσότητας παραγωγής προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, και κατά συνέπεια οι πολυμορφισμοί αυτοί εμποδίζουν τον TLR4 να αντιδρά με την ίδια ένταση σε πλασμοδιακές λοιμώξεις. Το ποσοστό μόλυνσης και νοσηρότητας ήταν υψηλό, αλλά η θνησιμότητα φάνηκε να μειώνεται. Συμπέραναν λοιπόν ότι με τη μείωση της παραγωγής κυτοκινών μέσω της μετάλλαξης TLR4, το ποσοστό μόλυνσης μπορεί να αυξηθεί, αλλά ο αριθμός των θανάτων που οφείλονται σε μόλυνση φαίνεται να μειώνονται. Αυτή η μελέτη αποτέλεσε τη βάση για τη μελέτη των SNPs του TLR4 και τη συσχέτισή τους με την παθογένεση διάφορων ασθενειών.⁴

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μία άλλη έρευνα σχετικά με την αθηρογένεση και τους πολυμορφισμούς του TLR4. Παρατηρήθηκε ότι οι πολυμορφισμοί αν και εξασθενούν την σηματοδότηση του υποδοχέα και ελλατώνουν την απόκριση σε Gram αρνητικά βακτήρια, συνδέονται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης αθηροσκλήρωσης. Αυτό το εύρημα είναι συνεπές με το γεγονός ότι η έμφυτη ανοσία πιθανώς διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση.³

Οι πολυμορφισμοί Asp299Gly και Thr399Ile μελετήθηκαν και σε ασθενείς που προσβλήθηκαν από μηνιγγιτιδόκοκκο. Παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων στους ασθενείς αυτούς, γεγονός που μαρτυρά την σημασία της TLR4 σηματοδότησης σε μόλυνση από μηνιγγιτιδόκοκκο.⁵

Σε άλλη έρευνα σχετικά με την ανθρώπινη ενδοτοξαμία, παρατηρήθηκαν διαφορές στην απόκριση του TLR4 σε συστηματική έγχυση με LPS γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι πολυμορφισμοί διαδραματίζουν ρόλο στα αρχικά

στάδια της φλεγμονής ενώ προτείνεται να διερευνηθεί ο ρόλος τους σε μετέπειτα στάδια της φλεγμονής.⁶

Σχετικά με τον άλλον εξωκυτταρικό προσδέτη του TLR4, τον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), μετά από μελέτες παρατηρήθηκε ότι παιδιά με οξεία λοίμωξη του αναπνευστικού έφεραν το αλληλόμορφο 299Gly σε αυξημένη συχνότητα από ότι παιδιά με ήπια μορφή της νόσου. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά και δεν αποδείχθηκε πλήρης συσχέτιση του SNP με την οξεία αναπνευστική λοίμωξη. Πιο πρόσφατες έρευνες όμως αποκάλυψαν ότι η ετεροζυγωτία των πολυμορφισμών σχετίζεται με την εμφάνιση συμπτωματικής νόσου RSV.⁹

Είναι ευρέως γνωστό πλέον ότι ουρογεννητικές λοιμώξεις από Gram αρνητικά βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν πρόωρο τοκετό. Σύμφωνα με έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε Φιλανδούς λοιπόν, ανακαλύφθηκε ότι οι πολυμορφισμοί μπορεί να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό λόγω του ότι μειώνουν την απόκριση του TLR4 σε LPS.¹⁰

Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι ο πολυμορφισμός Thr399Ile, μετά από μελέτες, συσχετίστηκε με αυξημένη ευαισθησία σε καρκίνο του στομάχου, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού Asp299Gly. Δηλαδή η απορρύθμιση της TLR4 σηματοδότησης οδηγεί σε μη ισορροπημένη αναλογία μεταξύ προ- και αντί- φλεγμονωδών αποκρίσεων γεγονός που αποτελεί κίνδυνο για την ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση καρκινώματος.¹¹

Συμπερασματικά λοιπόν οι πολυμορφισμοί του TLR4, Asp299Gly και Thr399Ile έχουν εμπλακεί στην παθογένεση με διαφορετικό τρόπο στην κάθε περίπτωση, της σηψαιμίας, της ελονοσίας, της καντιτίασης, της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας, του συστηματικού ερυθρωματώδη λύκου, του διαβήτη, της καρδιομυοπάθειας, του άσθματος, της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας, της αθηροσκλήρυνσης.^{3,4,5,6,9,8,10}

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα

Το αίμα των εθελοντών για την συγκεκριμένη έρευνα, μετά την αιμοληψία στο Νοσοκομείο Παπαγεωργίου της Θεσσαλονίκης, τοποθετήθηκε σε σωληνάρια με αντιπηκτικό (EDTA). Η διατήρησή των δειγμάτων έγινε στους -80 °C ως την χρήση τους.

2.1.1 Αρχή της μεθόδου

Το γονιδιωματικό DNA απομονώνεται από τους πυρήνες των λευκοκυττάρων του ολικού αίματος. Αρχικά, γίνεται λύση των κυτταροπλασματικών μεμβρανών και λαμβάνονται οι πυρήνες των λευκών αιμοσφαιρίων. Ακολουθεί λύση της πυρηνικής μεμβράνης με απορρυπαντικά, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του γονιδιωματικού DNA στο διάλυμα και επώαση του διαλύματος με διάλυμα πρωτεΐνάσης, για τον καθαρισμό του DNA από τις ιστόνες και αδρανοποίησης των νουκλεασών που μπορούν να καταστρέψουν τα μόρια του DNA κατά την απομόνωση. Στην συνέχεια, απομακρύνονται με τη χρήση οργανικών διαλυτών τα υπολείμματα κυττάρων, τα θραύσματα των μεμβρανών και οι πρωτεΐνες.

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με το kit Invisorb® Spin Blood Mini Kit της εταιρίας Stratec Biomedical. Η διαδικασία ακολουθείς 4 βήματα:

1. Λύση του δείγματος
2. Καθήλωση του γενωμικού DNA στην μεμβράνη του RTA Spin Filter
3. Ξέπλυμα της μεμβράνης και απομάκρυνση της αιθανόλης
4. Έκλυση του γενωμικού DNA

2.1.2 Υλικά

- Lysis Buffer HL
- Proteinase K
- Binding Buffer HL
- RTA Spin Filter

- Wash Buffer
- Elution Buffer
- 96-100% αιθανόλη
- 99.7% ισοπροπανόλη
- ddH₂O

2.1.3 Πειραματική διαδικασία

Στο κιτ για 50 απομονώσεις

1. Θερμαίνουμε στους 56 °C το Elution Buffer
2. Προσθέτουμε 1.1ml ddH₂O στην Proteinase K.
3. Προσθέτουμε 12ml 99.7% ισοπροπανόλης στο Binding Buffer HL.
4. Προσθέτουμε 30ml 96-100% αιθανόλης στο Pre-Wash Buffer.
5. Προσθέτουμε 24ml 96-100% αιθανόλης στο Wash Buffer.
6. Σε 0,2 ml αίματος προστίθεται 0,2 ml Lysis Buffer HL και ανακατεύουμε με vortex.
7. Επώαση για 3min του δείγματος με συνεχή ανάδευση.
8. Προσθήκη 20μl Proteinase K και ανάδευση με vortex.
9. Επώαση για 5min στους 56°C με συνεχή ανάδευση.
10. Προσθήκη 0,2ml Binding Buffer HL και ανάδευση σε vortex.
11. Προσθήκη του μίγματος στο RTA Spin Filter και επώαση για 1min.
12. Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm για 2 min.
13. Απόρριψη του RTA Receiver tube από το φίλτρο.
14. Μεταφορά του φίλτρου σε άλλο RTA Receiver tube.
15. Προσθήκη 0,5ml Pre-Wash Buffer
16. Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm για 1 min.
17. Απόρριψη του RTA Receiver tube από το φίλτρο.
18. Μεταφορά του φίλτρου σε άλλο RTA Receiver tube των 2ml
19. Προσθήκη 0,7ml Wash Buffer
20. Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm για 1 min
21. Απόρριψη του RTA Receiver tube από το φίλτρο
22. Μεταφορά του φίλτρου σε άλλο RTA Receiver tube των 2ml
23. Προσθήκη 0,7ml Wash Buffer για δεύτερη φορά
24. Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm για 1 min
25. Απόρριψη του RTA Receiver tube από το φίλτρο
26. Μεταφορά του φίλτρου σε άλλο RTA Receiver tube
27. Φυγοκέντρηση στην μέγιστη ταχύτητα για 4 min για να απομακρυνθεί όλη η αιθανόλη.
28. Μεταφορά του φίλτρου σε άλλο RTA Receiver tube των 1,5ml
29. Προσθήκη 0,1-0,2ml Elution Buffer
30. Επώαση για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
31. Φυγοκέντρηση στις 11.000 rpm για 1 min
32. Απόρριψη του φίλτρου και αποθήκευση του DNA στους -20 °C



2.1.4 Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός DNA

Τα νουκλεϊκά οξέα ανιχνεύονται και προσδιορίζονται ποσοτικά με πολλούς τρόπους:

- i. Η απλούστερη μέθοδος βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και το RNA απορροφούν εκλεκτικά σε μήκος κύματος 260nm. Τιμή οπτικής πυκνότητας 1 αντιστοιχεί σε συγκέντρωση περίπου 50μg/ml δίκλωνου καθαρού DNA και 40μg/ml για μονόκλωνο καθαρό DNA ή RNA. Ένα παρασκεύασμα DNA θεωρείται απαλλαγμένο πρωτεϊνών όταν ο λόγος της απορρόφησης στα 260/280 nm είναι περίπου 1,8. Σε περίπτωση που το διάλυμα περιέχει και πρωτεΐνες ο παραπάνω λόγος έχει μικρότερη τιμή και η ακριβής εκτίμηση της ποσότητας του DNA δεν είναι εφικτή. Πάντως η μέθοδος είναι αρκετά ευαίσθητη και μπορεί να ανακαλυφθούν ποσότητες DNA μέχρι και 0,2 μg DNA/ ml διαλύματος.
- ii. Σε περιπτώσεις που απαιτείται η ποσοτική μέτρηση διαλύματος DNA πολύ χαμηλής συγκέντρωσης, η εκτίμηση γίνεται σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης μια διαδικασία που αναλύετε παρακάτω.

Στην συγκεκριμένη εργασία ακολουθήθηκε η πρώτη μέθοδος με την χρήση φασματοφωτομέτρου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA που απομονώθηκε.

2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

2.2.1 Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Kary Mullis (Mullis, et al., 1986). Η PCR βασίζεται στον εκθετικό πολλαπλασιασμό των μορίων DNA από μια θερμοσταθερή πολυμεράση, όπως αυτή του *Thermus aquaticus* (Taq). Κατά την PCR χρησιμοποιείται ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών, καθένας από τους οποίους υβριδοποιείται σε έναν κλώνο ενός δίκλωνου μορίου DNA. Το ζεύγος των εκκινητών οριοθετεί την περιοχή που θα πολλαπλασιαστεί εκθετικά. Οι υβριδοποιημένοι εκκινητές απαιτούνται για την έναρξη της DNA πολυμεράσης κι έτσι για κάθε αλυσίδα του υποστρώματος δημιουργείται ένας συμπληρωματικός κλώνος DNA, μέσω της διαδοχικής προσθήκης ελεύθερων δεοξυνουκλεοτιδίων.

Η διαδικασία της PCR συνήθως περιλαμβάνει τρία βήματα που επαναλαμβάνονται για n κύκλους:

- i. Αποδιάταξη της μήτρας DNA στους 94 ή 95 °C.
- ii. Υβριδοποίηση των εκκινητών με το συμπληρωματικό τους DNA-στόχο, σε θερμοκρασία που εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία τους.
- iii. Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών με σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3' στους 72 °C.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για n κύκλους (συνήθως 30-40 κύκλοι αποδιάταξης-υβριδισμού-επιμήκυνσης), με αποτέλεσμα τα μόρια που παρήχθησαν στον προηγούμενο κύκλο να χρησιμεύουν ως μήτρα για κάθε επόμενο κύκλο. Η αύξηση του αριθμού των αντιγράφων-κλώνων είναι εκθετική και θεωρητικά ισούται με 2^n .

2.2.2 Επιλογή εκκινητών για PCR

Τα κύρια χαρακτηριστικά που πρέπει να έχουν οι εκκινητές είναι:

- ✓ **Μοναδικότητα:** Για κάθε ζεύγος εκκινητών πρέπει να υπάρχει αποκλειστικά ένας στόχος στη μήτρα του DNA.
- ✓ **Μήκος:** το μήκος των εκκινητών επιδρά τόσο στη μοναδικότητα τους όσο και στη θερμοκρασία υβριδοποίησης τους. Όσο αυξάνεται το μήκος του εκκινητή τόσο αυξάνεται η πιθανότητα να υβριδοποιεί μόνο με το στόχο, ενώ επίσης αυξάνονται οι θερμοκρασίες υβριδοποίησης. Συνήθως οι εκκινητές έχουν μήκος 17 με 35 βάσεις.
- ✓ **Σταθερότητα:** εξαρτάται από την αναλογία C/G στο 3' άκρο και στο 5' άκρο. Προτιμώνται 5' άκρα με μία ή δύο βάσεις G/C, και 3' άκρα με μία ή και καμία βάση G/C.
- ✓ **Σύσταση βάσεων:** επηρεάζει την υβριδοποίηση και τη σταθερότητα. Προτιμώνται οι αλληλουχίες τυχαίας σύστασης, ενώ αποφεύγονται οι περιοχές πλούσιες σε A+T είτε σε G+C (μέση περιεκτικότητα σε G+C ~50-60%).
- ✓ **Θερμοκρασία Τήξης (T_m):** είναι η θερμοκρασία κατά την οποία το 50% των μορίων του DNA σχηματίζουν δίκλινα μόρια. Εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση της αλληλουχίας του DNA. Υψηλότερη περιεκτικότητα σε G+C έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό περισσότερων δεσμών υδρογόνου άρα υψηλότερο T_m. Εμπειρική μέθοδος υπολογισμού του T_m για ≤ 20 βάσεις:
$$T_m = (A+T) \times 2^\circ C + (G+C) \times 4^\circ C$$
- ✓ **Θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_a):** είναι η θερμοκρασία κατά την οποία οι εκκινητές προσδένονται στη μήτρα του DNA.

- ✓ **Εσωτερικές δομές:** η απόδοση της PCR μειώνεται δραματικά στις περιπτώσεις που οι εκκινητές υβριδοποιούνται μεταξύ τους και σχηματίζουν δομές φουρκέτας ή ομοδιμερίζονται.
- ✓ **Συμπληρωματικότητα:** Ο εμπρός και ο ανάστροφος εκκινητής πρέπει να είναι κατάλληλα σχεδιασμένοι ώστε να λειτουργούν στις ίδιες συνθήκες.

2.2.3 Υλικά

- Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs, 10mM)
- Biotools Taq DNA Polymerase (5U/μl)
- Biotools Standard Reaction Buffer (10x)
- Biotools MgCl₂ (50mM)
- Γονιδιωματικό DNA (200-300ng)
- Εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (50pmol/ml)
- ddH₂O

Πίνακας 3: Εκκινητές

Πολυμορφισμός	Εκκινητές	Μέγεθος προϊόντος PCR
TLR4 Thr399Ile	Forward: 5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAGAA-3' Reverse: 5'-ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT -3'	407bp
TLR4 Asp299Gly	Forward: 5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG -3' Reverse: 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC -3'	249bp

2.2.4 Πειραματική διαδικασία

Για την κάθε αντίδραση αναμειγνύονται σε eppendorf των 0,5ml τα υλικά στις παρακάτω ποσότητες:

- ✓ Συγκέντρωση/Ποσότητα DNA ~200ng (1μl)
- ✓ 10x Biotools Standard Reaction Buffer 5μl
- ✓ MgCl₂ (50mM) 1,5μl
- ✓ Forward Primer 0,2μl
- ✓ Reverse Primer 0,2μl
- ✓ dNTPs 0,4μl
- ✓ 5 U/μl Biotools Taq DNA Polymerase 1U 0,3μl
- ✓ ddH₂O 37,7μl
- ✓ Σύνολο 45,5μl

Σημαντικό βήμα είναι η προσθήκη της πολυμεράσης αμέσως πριν την έναρξη της αντίδρασης, ώστε να μην αρχίσει μη ειδικός πολυμερισμός με αποτέλεσμα παρουσία παραπροϊόντων.

Μετά από ανάδευση τα δείγματα τοποθετούνται στον κυκλοποιητή και ακολουθεί το παρακάτω πρόγραμμα:

- ❖ Συνθήκες PCR (για τον πολυμορφισμό TLR4 Asp299Gly)
 - ✓ Στάδιο Θερμοκρασία Χρόνος
 - ✓ Προ-αποδιάταξη 95°C 5 min
 - ✓ 35 κύκλοι
 - ✓ Αποδιάταξη του DNA 95°C 30 sec
 - ✓ Υβριδοποίηση εκκινητών-μήτρας DNA 51 °C 30 sec
 - ✓ Επιμήκυνση των εκκινητών 72°C 45sec
 - ✓ Τελική επέκταση 72°C 10 min

- ❖ Συνθήκες PCR (για τον πολυμορφισμό TLR4 Thr399Ile)
 - ✓ Στάδιο Θερμοκρασία Χρόνος
 - ✓ Προ-αποδιάταξη 95°C 5 min
 - ✓ 35 κύκλοι
 - ✓ Αποδιάταξη του DNA 95°C 30 sec
 - ✓ Υβριδοποίηση εκκινητών-μήτρας DNA 55 °C 30 sec
 - ✓ Επιμήκυνση των εκκινητών 72°C 45sec
 - ✓ Τελική επέκταση 72°C 10 min.

Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης το προϊόν της PCR ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 2% w/v πήκτωμα αγαρόζης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, σε μια

από τις θέσεις προστέθηκε δείκτης μοριακών βαρών (ladder), ώστε να γίνει εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων της PCR.

Το προϊόν της PCR αποθηκεύεται στους -20°C .

2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

2.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό, το χαρακτηρισμό και την απομόνωση τμημάτων DNA. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι μόρια DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, λόγω του αρνητικού τους φορτίου, θα μετακινηθούν προς το θετικό πόλο. Τα δίκλινα γραμμικά μόρια DNA κινούνται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης και διανύουν απόσταση η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογης του μοριακού τους βάρους.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφόρηση και τον διαχωρισμό των μορίων είναι:

- ✓ **Η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα:** Ένα γραμμικό μόριο DNA συγκεκριμένου μεγέθους μετακινείται με διαφορετικό ρυθμό σε πήκτωμα αγαρόζης διαφορετικής συγκέντρωσης. Με τον τρόπο αυτό χρησιμοποιώντας πήκτωμα διαφορετικών συγκεντρώσεων, μπορούμε να διαχωρίσουμε μόρια DNA με ένα ευρύ φάσμα μεγεθών.
- ✓ **Η στερεοδιαμόρφωση του DNA:** Μόρια DNA ίδιου μοριακού βάρους αλλά με διαφορετική στερεοδιαμόρφωση (υπερελικωμένα, ανοιχτά κυκλικά ή ευθύγραμμα), κινούνται με διαφορετική ταχύτητα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση αγαρόζης στο πήκτωμα και σε μικρότερο βαθμό από την εφαρμοζόμενη τάση του ρεύματος, το βαθμό ιονισμού του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και την πυκνότητα των ελίκων του μορίου DNA.
- ✓ **Η εφαρμοζόμενη τάση:** Υπό χαμηλή διαφορά δυναμικού, ο ρυθμός μετανάστευσης γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος της εφαρμοζόμενης τάσης. Το εύρος διαχωρισμού σε πήκτωμα αγαρόζης μειώνεται όσο αυξάνεται η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού.
- ✓ **Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης:** Το ρυθμιστικό διάλυμα βοηθά στην διατήρηση σταθερού pH και παρέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας.

- ✓ Προκειμένου οι ζώνες του DNA να γίνουν ορατές στο πήκτωμα χρησιμοποιείται **βρωμιούχο αιθίδιο**, το οποίο, λόγω της επίπεδης διαμόρφωσής του, έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων, και να δεσμεύεται με αυτόν τον τρόπο στο DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να διεγείρεται με υπεριώδη ακτινοβολία και να φθορίζει, με αποτέλεσμα οι ζώνες του DNA να γίνονται ορατές.

2.3.2 Υλικά

- Διάλυμα 1xTBE (Από stock 10x)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) σε αναλογία 1 μl/ 10 ml πηκτώματος
- Αγαρόζη
- Διάλυμα χρωστικής bromophenol blue

2.3.3 Πειραματική διαδικασία

2.3.3.1 Παρασκευή πηκτώματος 2% w/v αγαρόζης

1. Διάλυση 2 gr αγαρόζης σε 100 ml διάλυμα TBE.
2. Ανάδευση με θερμότητα ως την πλήρη διάλυση της αγαρόζης.
3. Ψύξη του διαλύματος ως περίπου 40-50 °C.
4. Προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 3,5 μl.
5. Στερεοποίηση του πηκτώματος σε διάφανη (στην UV ακτινοβολία) πλαστική θήκη συγκεκριμένων διαστάσεων, τη μήτρα, σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικών “χτενών” που τοποθετούνται στη συσκευή πριν από την πήξη του πηκτώματος.

2.3.3.2 Πορεία ηλεκτροφόρησης

1. Προσθήκη στα δείγματα DNA διάλυμα της χρωστικής bromophenol blue σε αναλογία 8 μl χρωστικής/ 12 μl δείγματος DNA.
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων DNA σε ειδικές θέσεις του πηκτώματος με τη βοήθεια μικροπιπέτας.
3. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου υπό σταθερή ένταση ρεύματος 86 Volt σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TBE.
4. Παρατήρηση αποτελέσματος σε μηχανήμα UV.

2.4 Πολυμορφισμός μήκους τμημάτων περιορισμού (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism)

2.4.1 Αρχή της μεθόδου

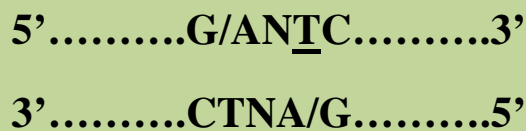
Η μέθοδος RFLP βασίζεται στη χρήση ειδικών ενζύμων, των ενδονουκλεασών περιορισμού. Το ένζυμο αυτά έχουν απομονωθεί από βακτήρια και έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν και να κόβουν σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Έτσι κάθε ένζυμο περιορισμού εμφανίζει χαρακτηριστικό πρότυπο πέψης σε ένα τμήμα DNA. Μετάλλαξη σε μια θέση θα οδηγήσει σε απώλεια ή δημιουργία μια θέσης κοπής. Στη μέθοδο RFLP γίνεται σύγκριση, μεταξύ ατόμων, των περιοριστικών προτύπων που λαμβάνονται από διάφορα ένζυμα περιορισμού. Με την PCR, ενισχύονται επιλεκτικά συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA και έτσι δίνεται η δυνατότητα ανάλυσης RFLP στα ενισχυμένα τμήματα των υπό μελέτη γονιδίων. Στην παρούσα έρευνα, η μέθοδος RFLP χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών Thr399Ile και Asp299Gly (SNP) στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον TLR4.

2.4.2 Ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού για την ανίχνευση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού βρέθηκαν με το πρόγραμμα NEBcutter 2.0. Το πρόγραμμα με βάση την αλληλουχία που περιέχει το σημείο πολυμορφισμού επιλεγεί το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο που να έχει θέση αναγνώρισης το σημείο του πολυμορφισμού.

Έτσι επιλέχθηκαν:

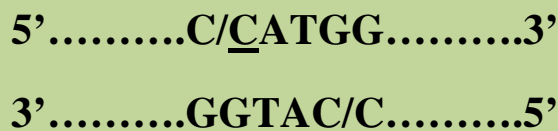
- Το ένζυμο *Hinf1* για τον πολυμορφισμό Thr399Ile το οποίο αναγνωρίζει την θέση GANTC (Εικόνα 11)



Εικόνα 11:Αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου *Hinf1*

Όταν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει C τότε το ένζυμο δεν αναγνωρίζει την αλληλουχία και δεν κόβει στο C. Σε αυτήν την περίπτωση το προϊόν PCR μεγέθους 407bp παραμένει ολόκληρο. Όταν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει G τότε το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία και κόβει στο G. Τότε το προϊόν PCR μεγέθους 407bp τεμαχίζεται σε δύο τμήματα 378bp και 29bp.

- Και το ένζυμο *Nco1* για τον πολυμορφισμό Asp299Gly το οποίο αναγνωρίζει την θέση CCATGG (Εικόνα 12)



Εικόνα 12:Αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου *Nco1*

Όταν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει G τότε το ένζυμο δεν αναγνωρίζει την αλληλουχία και δεν κόβει στο G. Σε αυτήν την περίπτωση το προϊόν PCR μεγέθους 249bp παραμένει ολόκληρο. Όταν στην θέση του πολυμορφισμού υπάρχει A τότε το ένζυμο αναγνωρίζει την αλληλουχία και κόβει στο A. Τότε το προϊόν PCR μεγέθους 249bp τεμαχίζεται σε δύο τμήματα 223bp και 26bp.

2.4.3 Πειραματική Διαδικασία

1. Για την πέψη χρησιμοποιούνται 100-200ng από το προϊόν PCR
2. Παρασκευάζεται μίγμα για όλες τις αντιδράσεις πέψης που περιέχει ddH₂O, ρυθμιστικό διάλυμα, ένζυμο *Hinf*1ή *Nco*1 ανάλογα με την πέψη και μοιράζεται στα δείγματα DNA
3. Γίνεται ανάδευση και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C/18 ώρες και για τα 2 ένζυμα.

Πίνακας 4: Πέψη με *Hinf*I

Αντιδραστήρια	Πέψη με <i>Hinf</i> I
Προϊόν PCR	15μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 1X CutSmart Buffer (50 mM Potassium Acetate, 20mM Tris-Acetate, 10 mM Mg-Acetate, 100 μg/ml BSA)	2μl
Ένζυμο <i>Hinf</i> I (10units/μl)	0,5μl
ddH ₂ O	2,5μl

Πίνακας 5: Πέψη με *Nco*I

Αντιδραστήρια	Πέψη με <i>Nco</i> I
Προϊόν PCR	15μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 1X CutSmart Buffer (50 mM Potassium Acetate, 20mM Tris-Acetate, 10 mM Mg-Acetate, 100 μg/ml BSA)	2μl
Ένζυμο <i>Hinf</i> I (10units/μl)	0,5μl
ddH ₂ O	2,5μl

2.4.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3,5% w/v και 3%

Η αρχή, τα υλικά και η πειραματική διαδικασία της μεθόδου έχουν αναφερθεί και πιο πριν. Η μόνη αλλαγή στην πειραματική διαδικασία είναι ότι χρησιμοποιούμε πήκτωμα συγκέντρωσης 3% σε αγαρόζη για τον πολυμορφισμό Asp299Gly και πήκτωμα συγκέντρωσης 3,5% σε αγαρόζη για τον πολυμορφισμό Thr399Ile.

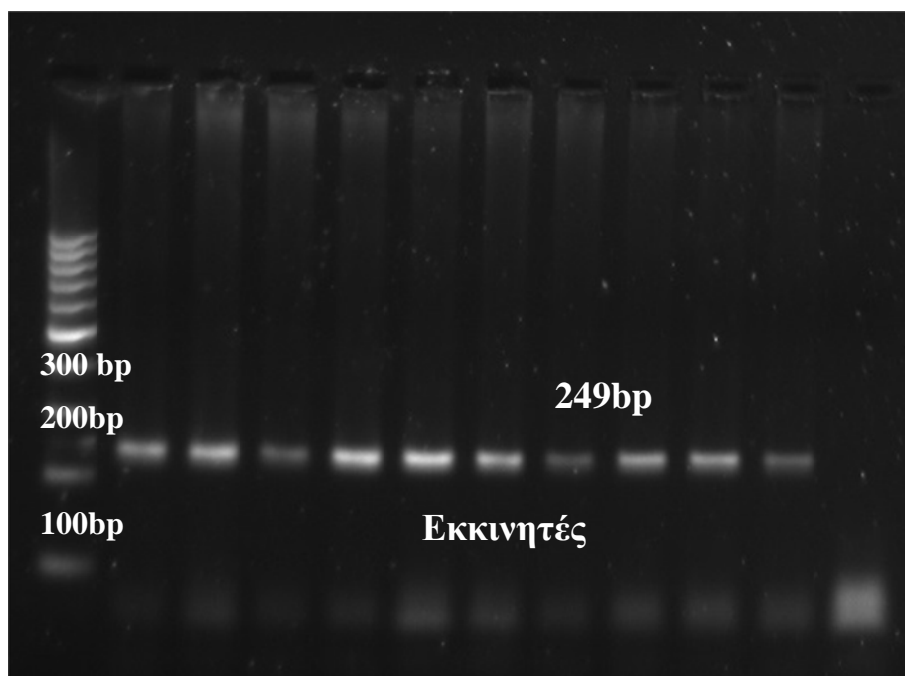
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος των ασθενών

Από όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος. Ο έλεγχος έγινε με μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο. Το γενωμικό DNA που εξήχθη ήταν ικανοποιητικής συγκέντρωσης και ποιότητας. Τα αποτελέσματα από την φωτομέτρηση φαίνονται στον πίνακα 6.

3.2 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου του TLR4 με PCR για τον πολυμορφισμό Asp299Gly

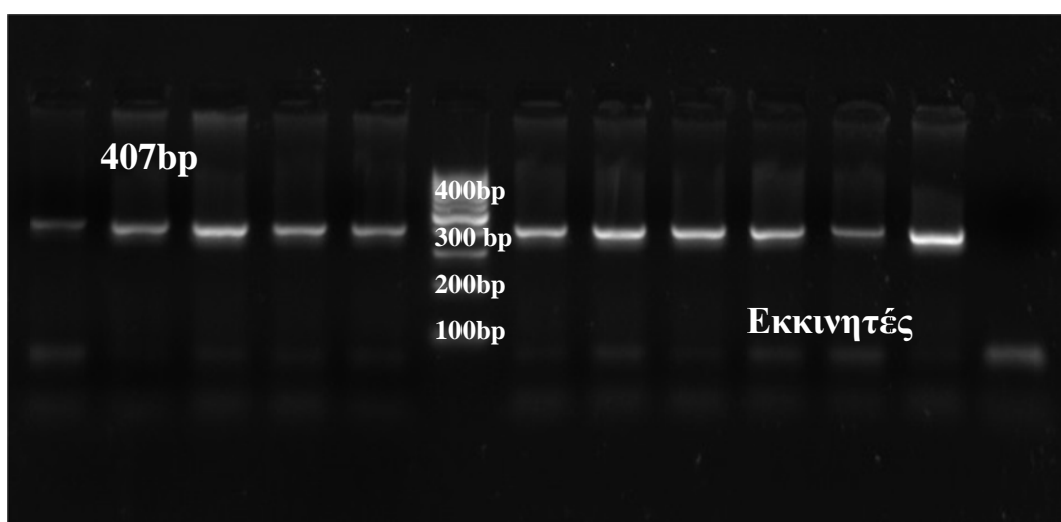
Το τμήμα του γονιδίου του TLR4 το οποίο περιέχει τον πολυμορφισμό Asp299Gly ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR (249bp). Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% και το μέγεθος των προϊόντων ελέγχθηκε συγκρίνοντάς τα με ένα δείκτη γνωστών μεγεθών (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στο πρώτο πηγάδι φαίνεται ο δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών

3.3 Ενίσχυση τμήματος του γονιδίου του TLR4 με PCR για τον πολυμορφισμό Thr399Ile

Το τμήμα του γονιδίου του TLR4 το οποίο περιέχει τον πολυμορφισμό Thr399Ile ενισχύθηκε με την μέθοδο της PCR (407bp). Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% και το μέγεθος των προϊόντων ελέγχθηκε συγκρίνοντάς τα με ένα δείκτη γνωστών μεγεθών (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Ενδεικτική ηλεκτροφόρηση προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στο πρώτο πηγάδι φαίνεται ο δείκτης γνωστών μοριακών μεγεθών.

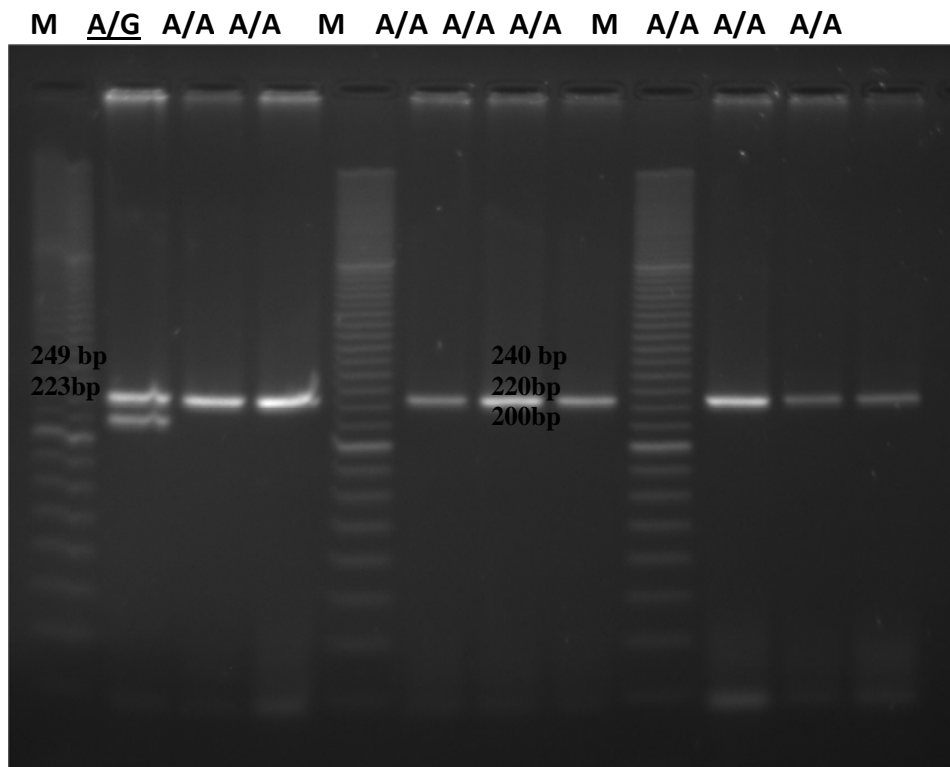
3.4 Γονοτύπηση πολυμορφισμών με ανάλυση RFLP

Ο προσδιορισμός των γονότυπων των ασθενών έγινε με την μέθοδο RFLP. Ενδεικτικά, τα αποτελέσματα της ανάλυσης RFLP φαίνονται στην Εικόνα 15. Στα προϊόντα PCR έγινε πέψη με τα ένζυμα *HinfI* και *NcoI* για τους πολυμορφισμούς 399 και 299 αντίστοιχα.

Για την πέψη 299, όταν υπάρχει το αλληλόμορφο A προκύπτει ένα τμήματα 249bp γιατί το ένζυμο δεν μπορεί να κόψει, ενώ όταν υπάρχει το αλληλόμορφο G το προϊόν PCR κόβεται και προκύπτει ένα τμήμα 223bp και ένα τμήμα των 26bp. Στα ετερόζυγα άτομα εμφανίζεται ένα άκοπο τμήμα 249bp και τα δύο τμήματα που προκύπτουν από την πέψη 223bp και 26bp. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδήγησε στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την

ύπαρξη της θέσης περιορισμού (GG) ετερόζυγων ατόμων (AG) και ατόμων ομόζυγων ως προς την απουσία της θέσης περιορισμού (AA).

Για την πέψη 399, όταν υπάρχει το αλληλόμορφο C προκύπτει ένα τμήματα 407bp γιατί το ένζυμο δεν μπορεί να κόψει, ενώ όταν υπάρχει το αλληλόμορφο T το προϊόν PCR κόβεται και προκύπτει ένα τμήμα 378bp και ένα τμήμα των 29bp. Στα ετερόζυγα άτομα εμφανίζεται ένα άκοπο τμήμα 407bp και τα δύο τμήματα που προκύπτουν από την πέψη 378bp και 29bp. Η παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης οδήγησε στην ταυτοποίηση ατόμων ομόζυγων ως προς την ύπαρξη της θέσης περιορισμού (TT) ετερόζυγων ατόμων (CT) και ατόμων ομόζυγων ως προς την απουσία της θέσης περιορισμού (CC). Ενδεικτικά στην Εικόνα 10 φαίνονται τα αποτελέσματα της RFLP.



Εικόνα 15: Ενδεικτικά αποτελέσματα ανάλυσης PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό 299 του γονιδίου του *TLR4*.

Όλα τα αποτελέσματα της γονοτυπικής ανάλυσης για τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 6: Γονότυποι των 109 εθελοντών για την μελέτη των πολυμορφισμών 299 και 399 του γονιδίου του TLR4.

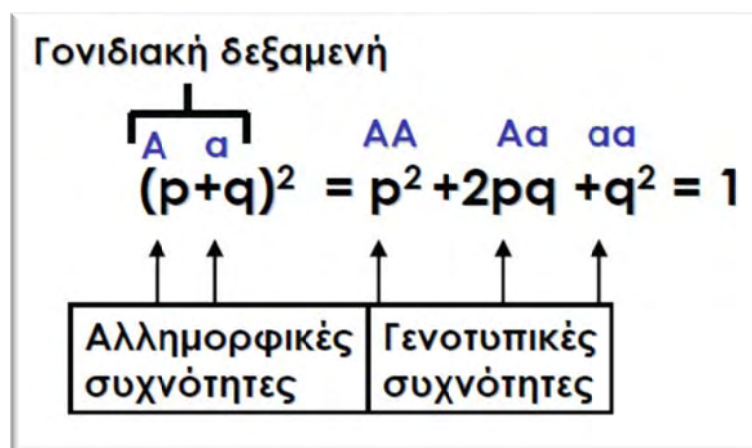
AP	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	DN A	299	399	AP	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	DNA	299	399
T01	A	10		w	w	T60	Θ	23		w	w
T02	Θ	2		w	w	T61	A	24		w	w
T03	Θ	10		w	w	T62	Θ	22		w	w
T04	A	4		w	w	T63	A	23		w	w
T05	A	6		w	w	T64	A	24		w	w
T06	Θ	4		w	w	T65	Θ	23		w	het
T07	A	2		w	w	T79	A	1,5		w	w
T08	A	9		w	w	T80	Θ	2		w	w
T09	Θ	14		w	w	T81	A	5		het	het
T10	A	4		w	w	T82	A	7		w	w
T11	Θ	14		w	w	T83	Θ	13		w	w
T12	Θ	8		w	w	T84	Θ	8		w	w
T13	A	2,5		w	w	T99	A		0,11	w	w
T14	A	8		w	w	T106	Θ		0,041	het	w
T15	Θ	2,5		w	w	T116	Θ	12 ΕΤΩΝ	0,052	w	w
T16	A	7		het	het	T117	A	12 ΕΤΩΝ	0,045	het	w
T17	Θ	11		w	w	T118	Θ		0,046	hom M	het
T18	A	6		w	w	T119	Θ	12 ΕΤΩΝ	0,072	w	w
T19	A	5		w	w	T120	A	7 ΕΤΩΝ	0,085	w	w
T20	A	4		w	w	T121	A	6 ΕΤΩΝ	0,049	w	w
T21	Θ	1		w	w	T122	Θ	13 ΕΤΩΝ	0,032	w	w
T22	A	11,5		w	w	T123	Θ	14 ΕΤΩΝ	0,094	w	w
T23	Θ	4 ΜΗΝ		w	w	T124	A	6 ΕΤΩΝ	0,122	w	w
T24	A	18ΜΗΝ		w	w	T125	Θ	11 ΕΤΩΝ	0,06	w	w
T25	A	3		w	w	T126	Θ	13 ΕΤΩΝ	0,077	het	het
T26	A	14		w	w	T127	Θ	7 ΕΤΩΝ	0,034	w	w
T27	Θ	5		w	w	T128	Θ	14 ΕΤΩΝ	0,059	w	w
T28	Θ	2		w	w	T129	A	10 ΕΤΩΝ	0,049	w	w
T29	Θ	1		w	w	T130	Θ	10 ΕΤΩΝ	0,059	w	w
T30	Θ	6		w	w	T131	Θ	14 ΜΗΝ	0,071	het	het
T32	Θ	2,5		w	w	T132	Θ	6 ΕΤΩΝ	0,077	w	w
T35	A	2		w	w	T133	A	13 ΕΤΩΝ	0,051	w	w
T36	A	10 ΗΜΕΡ		w	w	T134	A	4 ΕΤΩΝ	0,044	w	w
T37	Θ	10		w	het	T135	A	12 ΕΤΩΝ	0,031	w	w
T38	A	1,5		w	w	T136	A	12 ΕΤΩΝ	0,078	w	w
T39	Θ	2		w	w	T137	A	4 ΕΤΩΝ	0,044	w	w
T41	Θ	3		w	w	T138	A	20 ΜΗΝ	0,032	w	w
T42	Θ	12		w	het	T139	Θ	13 ΕΤΩΝ	0,079	w	w
T43	A	24		w	w	T140	A	12 ΕΤΩΝ	0,106	w	w

T44	A	24	w	w	T141	A	3 ΕΤΩΝ	0,093	w	w
T45	A	24	w	w	T142	Θ	6 ΕΤΩΝ	0,104	w	w
T46	Θ	24	w	w	T143	Θ	10 ΕΤΩΝ	0,104	w	w
T47	Θ	24	w	w	T144	A	7 ΕΤΩΝ	0,103	w	w
T48	A	24	het	het	T145	Θ	13 ΕΤΩΝ	0,096	w	w
T49	A	24	w	w	T146	A	6 ΕΤΩΝ	0,058	w	w
T50	A	24	w	w	T147	Θ	6 ΕΤΩΝ	0,107	w	w
T51	Θ	22	w	w	T148	A	13 ΕΤΩΝ	0,149	w	w
T52	Θ	23	w	het	T149	Θ	13 ΕΤΩΝ	0,084	het	het
T53	Θ	22	w	w	T150	Θ	8 ΕΤΩΝ	0,114	w	w
T54	A	23	w	w	T151	A	4 ΕΤΩΝ	0,068	w	w
T55	A	23	w	w	T152	Θ	14 ΕΤΩΝ	0,071	w	w
T56	Θ	22	hom M	hom M	T153	A		0,036	w	w
T57	Θ	23	w	w	T154	A	19 ΜΗΝ	0,163	het	het
T58	A	23	w	w	T155	A	13 ΕΤΩΝ	0,081	w	w
T59	Θ	23	w	w						

3.5 Στατιστική ανάλυση

3.5.1 Ο Νόμος των Hardy-Weinberg (1908)

Σε μεγάλους παμικτικούς πληθυσμούς, εφόσον δεν συμβαίνουν γεγονότα που μεταβάλλουν τη συχνότητα των γονιδίων (όπως μετάλλαξη, μετανάστευση, επιλογή), οι γενοτυπικές και γονιδιακές συχνότητες παραμένουν σταθερές από τη μία γενιά στην επόμενη και ο πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία ή ισοζύγιο.



- ❖ Τα αποτελέσματα των γενωτυπικών συχνοτήτων μπορούν να προκύψουν από την ανάπτυξη του διωνύμου:

$$(pA + qa)^2 = p^2AA + 2pqAa + q^2aa$$

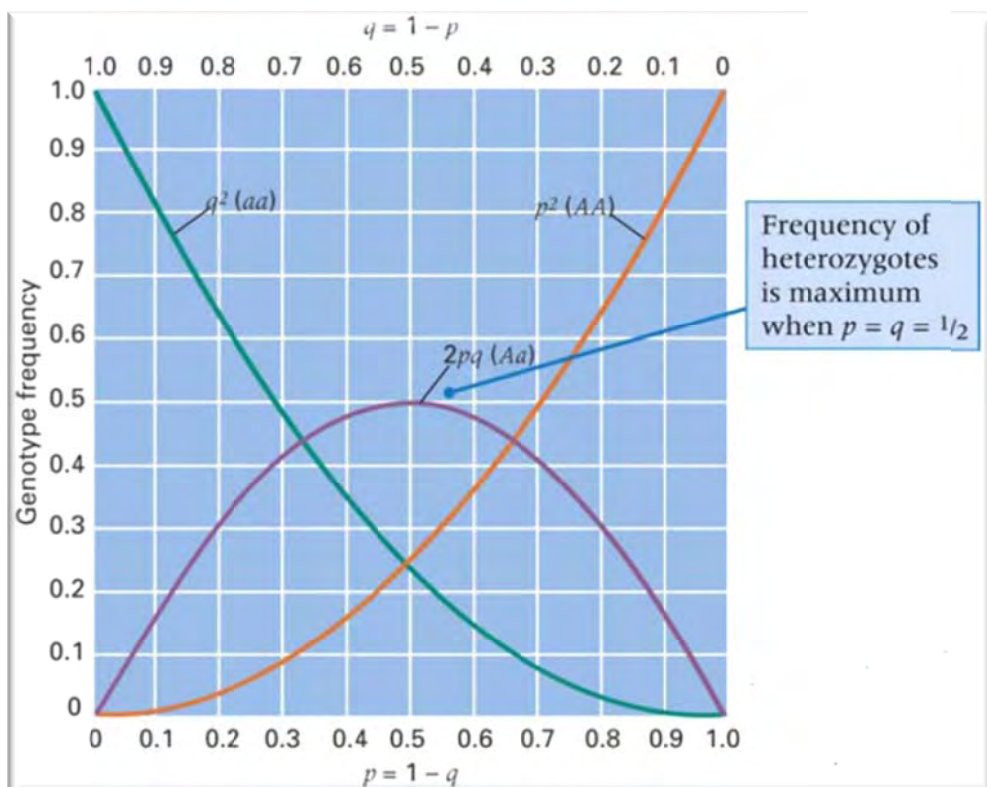
- ❖ Το άθροισμα των πιθανοτήτων να ληφθεί το γονίδιο A ή το γονίδιο a είναι ίσο με τη μονάδα:

$$p + q = 1$$

- ❖ Παρομοίως το άθροισμα των συχνοτήτων όλων των πιθανών ενδεχομένων θα είναι ίσο με τη μονάδα:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

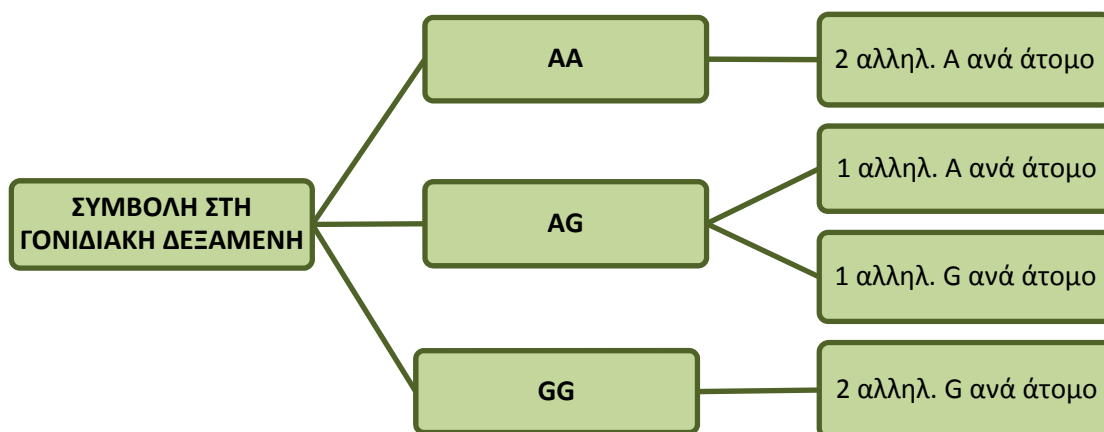
- ❖ Άλλη σημαντική εφαρμογή είναι πως για τα σπάνια αλληλόμορφα υπάρχουν πολλοί περισσότεροι ετεροζυγώτες από ότι ομοζυγώτες για το σπάνιο αλληλόμορφο.



Για να ελέγξουμε εάν ο πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία αρχικά υποθέτουμε ότι γίνεται τυχαία αναπαραγωγή και ότι δεν επιδρούν δυνάμεις που μεταβάλλουν τις γονιδιακές συχνότητες.

Συνεπώς για τον πολυμορφισμό Asp299Gly έγιναν οι παρακάτω υπολογισμοί:

Asp299Gly	Γενότυποι		
Δείγμα πληθυσμού	AA	AG	GG
109	98	9	2



$$A: 196+9 = 205$$

$$G: 9 + 4 = 13$$

$$\text{Σύνολο αλληλομόρφων: } 205 + 13 = 218 \text{ (αλλιώς: } 109 \times 2 = 218)$$

$$\text{Συχνότητα A: } 205/218 = 0,940 \sim 94\%$$

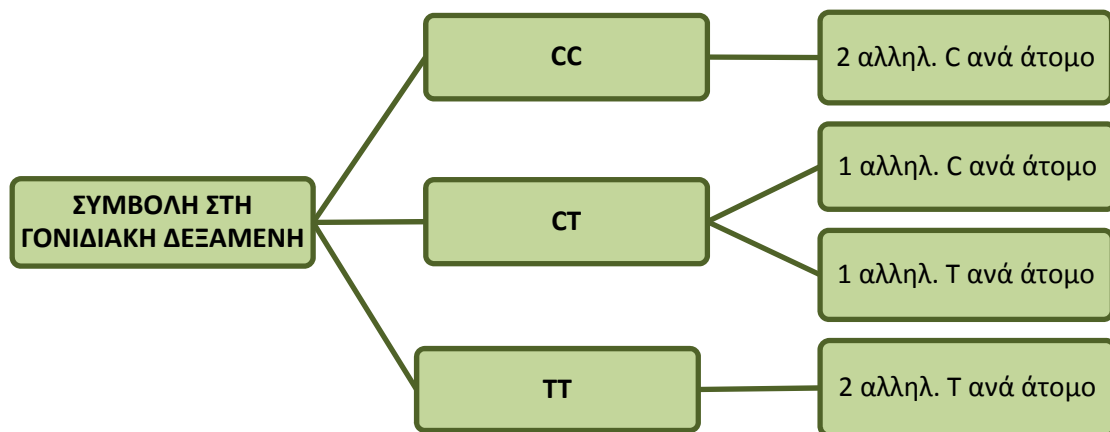
$$\text{Συχνότητα G: } 13/218 = 0,059 \sim 6\%$$

	Αναμενόμενα	Παρατηρούμενα
AA	$0,94 \times 0,94 = 0,883$	$98/109 = 0,899$
AG	$2 \times (0,94 \times 0,06) = 0,112$	$9/109 = 0,082$
GG	$0,006 \times 0,006 = 0,003$	$2/109 = 0,018$

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, και μετά από δοκιμασία χ^2 για $P > 0,95$ συμπεράναμε ότι ο πληθυσμός για τον πολυμορφισμό Asp299Gly βρίσκεται σε ισορροπία Hardy – Weinberg.

Για τον πολυμορφισμό Thr399Ile έγιναν οι παρακάτω υπολογισμοί:

Thr399Ile	Γενότυποι		
Δείγμα πληθυσμού	CC	CT	TT
109	96	12	1



$$C: 192 + 12 = 204$$

$$T: 12 + 2 = 14$$

$$\text{Σύνολο αλληλομόρφων: } 204 + 14 = 218 \text{ (αλλιώς: } 109 \times 2 = 218)$$

$$\text{Συχνότητα C: } 204/218 = 0,937 \sim 94\%$$

$$\text{Συχνότητα T: } 14/218 = 0,064 \sim 6\%$$

	Αναμενόμενα	Παρατηρούμενα
CC	$0,94 \times 0,94 = 0,8836$	$96/109 = 0,8807$
CT	$2 \times (0,94 \times 0,06) = 0,1128$	$12/109 = 0,1100$
TT	$0,006 \times 0,006 = 0,0036$	$1/109 = 0,00917$

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, και μετά από δοκιμασία χ^2 για $P > 0,95$ συμπεράναμε ότι ο πληθυσμός για τον πολυμορφισμό The399Ile βρίσκεται σε ισορροπία Hardy – Weinberg.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αδιαμφισβήτητα αν και ο αριθμός των εθελοντών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αρκετά ικανοποιητικός στατιστικά, η παρούσα έρευνα θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων ώστε να μπορέσει να καθοριστεί εάν οι πολυμορφισμοί αυτοί είναι σπάνιοι ή συχνοί στον πληθυσμό και εάν υπάρχει ανισορροπία σύνδεσης μεταξύ τους. Στη συνέχεια θα μπορούσε να γίνει κάποια συσχέτιση των πολυμορφισμών με την εμφάνιση ή την παθογένεια ασθενειών όπως έχει ήδη πραγματοποιηθεί στην περίπτωση του σηπτικού σοκ που προκαλείται από Gram αρνητικά βακτήρια και με άλλες νόσους.

Έχουν ήδη πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες για να κατανοήσουμε τα μονοπάτια σηματοδότησης της έμφυτης ανοσίας που επάγονται από τον TLR4 έναντι των Gram αρνητικών μολύνσεων. Εξαιτίας αυτού, ο TLR4 είναι ένα ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη των συνεπειών των γενετικών πολυμορφισμών και της σχέσης τους με τη λειτουργία του υποδοχέα, και την ευαισθησία του σε ασθένειες. Επίσης πρέπει να γίνει προσπάθεια να καταλάβουμε εάν οι πολυμορφικοί γενότυποι του TLR4 οδηγούν σε φαινοτυπικές συνέπειες. Μελλοντικές μελέτες θα περιλαμβάνουν αναμφίβολα μια προσεκτική ανάλυση των πολυμορφισμών των TLRs. Το τελευταίο θα μπορούσε να επιτρέψει μια συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών και έκβασης της νόσου σε ασθενείς στο νοσοκομείο με κίνδυνο σηπτικού σοκ. Ιδιαίτερη θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μελέτη για ανίχνευση πολυμορφισμών που επηρεάζουν τον υποκινητή του γονιδίου του υποδοχέα του TLR4, ή της διαδικασίας του ματίσματος, παρόλο που αυτοί θα είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτούν.

Άλλες σημαντικές πρόοδοι θα προέλθουν από μια καλύτερη κατανόηση του πώς οι διαφορετικοί TLRs αλληλεπιδρούν για να αναγνωρίσουν παθογόνους μικροοργανισμούς και από προσδιορισμό της χωρικής οργάνωσης των διάφορων πρωτεϊνών που αποτελούν έναν υποδοχέα για μια συγκεκριμένη κατηγορία προϊόντων που απελευθερώνονται από τα παθογόνα.

Μέχρι στιγμής, εννέα διαφορετικά TLRs θηλαστικών έχουν περιγραφεί και η πλήρης αλληλουχία του TLR10 έχει διευκρινιστεί (T.-H. Chuang και RJU, αδημοσίευτες παρατηρήσεις). Δεν είναι παράλογο να υποθέσουμε ότι οι επιπλέον TLRs μπορεί να βρεθούν καθώς οι γονιδιωματικές βάσεις δεδομένων σιγά σιγά γίνονται πιο ολοκληρωμένες. Μέχρι στιγμής, τα γενετικά δεδομένα δείχνουν ότι η TLRs έχουν μοναδικές λειτουργίες. Ο προσδιορισμός των προσδετών για τους TLRs είναι ένας σημαντικός τομέας της έρευνας. Είναι ασφαλές να υποθέσουμε ότι πολλές ενεργοποιητές της έμφυτης ανοσίας δεν έχουν ακόμη συνδεθεί με μέλη της οικογένειας TLR, παρόλα αυτά αναμένουμε πρόοδο με αυτό σύντομα.

Πιο πρόσφατα μια πρόσθετη πρωτεΐνη, που ονομάζεται MD-2, έχει δειχθεί ότι είναι σημαντική για τη σηματοδότηση μέσω TLR4. Η MD-2, όπως αναφέρθηκε είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη που λειτουργεί με δέσμευση στην εξωκυτταρική περιοχή του TLR4, όπου διευκολύνει την LPS ανταπόκριση, ίσως σταθεροποιώντας τα διμερή του TLR4. Ωστόσο, η ακριβής λειτουργία του MD-2 στο σύμπλοκο του υποδοχέα LPS είναι άγνωστη προς το παρόν. Ο καθορισμός της λειτουργίας του MD-2 όσον αφορά το ρόλο της στην LPS σηματοδότηση, καθώς και τον καθορισμό των συσχετισμών των πρωτεϊνών του υποδοχέα LPS παραμένουν σημαντικά ερωτήματα για μελλοντική έρευνα. Επιπλέον, θα πρέπει επίσης να εξεταστεί το ενδεχόμενο της ύπαρξης άλλων MD-2-like μορίων που θα μπορούσαν να ρυθμίσουν συγκεκριμένες λειτουργίες του TLRs.

Στη συνέχεια είναι ενδιαφέρον να αναφέρουμε ότι, αν και δεν έχει βρεθεί ακόμα ομόλογο του MγD88, διαγραφή αυτού του γονιδίου δεν καταργεί εντελώς την απόκριση σε LPS, αν και η απόκριση καθυστερεί σημαντικά. Συνεπώς η επεξήγηση για αυτή την υπολειμματική ανταπόκριση παραμένει να διευκρινιστεί.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne, KUBY ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2013.
2. Alan Aderem and Richard J. Ulevitch; Toll-like receptors in the induction of the innate immune response; Department of Immunology, University of Washington, Seattle, USA; Department of Immunology, USA; Nature; Vol. 406; 17 August 2000; 782-787.
3. Frank P. Mockenhaupt, Jakob P. Cramer, et al.; Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria; Institute of Tropical Medicine, Charité-Universita Berlin, Spandauer Damm, Berlin; Bernhard-Nocht-Institute for Tropical Medicine, Clinical Department, Bernhard-Nocht Hamburg; Institute for Microbiology and Hygiene, Charité-Universita Berlin; School of Medicine and Health Sciences, University for Development Studies, Ghana; and Division of International Health, Institute of Social Medicine, Epidemiology, and Health Economy, Charité Universita Berlin; PNAS; January 3, 2006 ; vol. 103; no. 1; 177–182.
4. Stefan Kiechl, et al.; Toll-Like Receptor 4 polymorphisms and Atherogenesis; The New England Journal Of Medicine; Vol. 347; No. 3; July 18, 2002; 185-192.
5. Irina Smirnova, Navjiwan Mann, Annemiek Dols, H. H. Derkx, Martin L. Hibberd, Michael Levin, and Bruce Beutler; Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility; Department of Immunology, The Scripps Research Institute, La Jolla; Department of Pediatrics, Academic Medical Centre, University of Amsterdam, The Netherlands; Providence Portland Medical Center, Portland; and Department of Pediatrics, Imperial College Faculty of Medicine at St. Mary's Hospital, London, United Kingdom; PNAS; May 13, 2003; vol. 100; no. 10; 6075–6080.
6. Nicolas S. Merle, Sarah Elizabeth Church, Veronique Fremeaux-Bacchi and Lubka T. Roumenina; Complement system part i – molecular mechanisms of activation and regulation; Cordeliers Research Center, Complement and Diseases Team, Paris, France, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, France, Integrative Cancer Immunology Team, Paris, France, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Paris, France; Frontiers in Immunology; June 2015; Vol. 6; Article 262.
7. Greg Angel Esparza; The molecular requirements for activation of specific toll-like receptor 4 signaling pathways; Theses and Dissertations; University of Iowa; 2012.
8. Werner Koch, Petra Hoppmann, Arne Pfeufer, Albert Schomig, and Adnan Kastrati; Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population; Deutsches Herzzentrum Munchen, Lazarettstrasse, Munchen and Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universitat Munchen, Munich, Germany and Institut fur

- Humangenetik, Klinikum rechts der Isar, and Institut für Humangenetik, Forschungszentrum, Neuherberg, Germany; *European Heart Journal* (2006) 27; 2524–2529.
9. Eva Lorenz, Mikko Hallman, Riitta Marttila, Ritva Haataja and David A. Schwartz; Association between the Asp299Gly Polymorphisms in the Toll-like Receptor 4 and Premature Births in the Finnish Population; Department of Internal Medicine, Section of Infectious Diseases, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, Department of Pediatrics and Biocenter Oulu, University of Oulu, Finland, Hospital of Seinäjoki, Seinäjoki, Finland, Department of Medicine and the Department of Veterans Affairs Medical Center at Duke University Medical Center, Durham, North Carolina; *International Pediatric Research Foundation*; Vol. 52, No. 3, 2002; 373-376.
 10. D. Santini, S. Angeletti, et al.; Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in gastric cancer of intestinal and diffuse histotypes; *Clinical and Experimental Immunology*; 2008; 154: 360–364.
 11. Claudia Marsik, Bernd Jilma, Christian Joukhadar, Christine Mannhalter, Oswald Wagner, and Georg Endler; The Toll-Like Receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms Influence the Late Inflammatory Response in Human Endotoxemia; Department of Clinical Pharmacology and Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnostic, Medical University of Vienna; *Clinical Chemistry* 51, No.11, 2005; 2178-2180.
 12. René N. Douville, et al.; TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms: No Impact on Human Immune Responsiveness to LPS or Respiratory Syncytial Virus; National Training Program in Allergy and Asthma Research, Department of Immunology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada, Department of Medical Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada, Department of Community Health Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, Canada, Department of Pediatrics/Child Health, University of Manitoba, Winnipeg, Canada, Canadian Science Centre for Human and Animal Health, Winnipeg, Canada, Department of Pediatrics, University of British Columbia, BC Children's Hospital and Child and Family Research Institute, Vancouver, Canada; *Plos One*; August 2010; Vol.5; Issue 8; e12087.
 13. Gottfried Rudofsky, et al.; Asp299Gly and Thr399Ile Genotypes of the TLR4 Gene Are Associated With a Reduced Prevalence of Diabetic Neuropathy in Patients With Type 2 Diabetes; *Diabetes Care*; Vol.27 Number 1; January 2004; 179-183.
 14. Bart Ferwerda, et al.; Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms; Department of Internal Medicine, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; Nijmegen University Center for Infectious Diseases and Department of Parasitology, Nijmegen, The Netherlands; *Ferwerda et al.*; May – June 2008; *Molmed* 14 (5-6) 346-352.

15. Huaicong Long, Brian P. O'Connor, Rachel L. Zemans, Xiaofang Zhou², Ivana V. Yang, David A. Schwartz; The Toll-Like Receptor 4 Polymorphism Asp299Gly but Not Thr399Ile Influences TLR4 Signaling and Function Center for Genes, Environment and Health, National Jewish Health, Denver, Colorado, United States of America, Department of Geriatrics, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan, P.R. of China, Integrated Department of Immunology, University of Colorado and National Jewish Health, Denver, Colorado, United States of America, Department of Medicine, University of Colorado Denver, Aurora, Colorado, United States of America; Plos One; April 2014 ; Volume 9; Issue 4; e93550.
16. Nicholas H.Barton, Derek E.G. Briggs, Jonathan A.Eisen, David B. Goldstein, Nipam H.Patel; *E3EΛIEH*; Utopia; CSHL PRESS; 2013.
17. Vogel SN, Fenton M; Toll-like receptor 4 signalling: new perspectives on a complex signal-transduction problem. *Biochem Soc Trans* 31: 664–668; 2003.
18. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F; Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 274: 10689–10692; 1999.
19. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, et al.; Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages; 2001; *Infect Immun* 69: 1477–1482.
20. Gay NJ, Gangloff M Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem*; 2007; 76: 141–165.
21. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein; 1990; *Science* 249: 1429–1431.
22. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ; Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein; 1989; *J Biol Chem* 264: 10867–10871.
23. Bhuvanendran S, Hussin HM, Meran LP, Anthony AA, Zhang L, et al.; Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and typhoid susceptibility in Asian Malay population in Malaysia. *Microbes Infect* 13: 2011; 844–851.
24. Ohto U, Yamakawa N, Akashi-Takamura S, Miyake K, Shimizu T; Structural analyses of human Toll-like receptor 4 polymorphisms D299G and T399I. *J Biol Chem*; 2012.
25. Figueroa L, Xiong Y, Song C, Piao W, Vogel SN, et al.; The Asp299Gly polymorphism alters TLR4 signaling by interfering with recruitment of MyD88 and TRIF. *J Immunol* 188: 4506–4515; 2012.
26. Janeway, C. A. Jr & Medzhitov, R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin. Immunol.* 10, 349–350; 1998.
27. Lien, E. et al. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 105, 497–504; 2000.

28. Williams, M. J., Rodriguez, A., Kimbrell, D. A. & Eldon, E. D. The 18-wheeler mutation reveal complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J.* 16, 6120–6130; 1997.
29. Medzhitov, R. et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253–258; 1998.
30. Schröder NW, Schumann RR; Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease; 2005; *Lancet Infect. Dis.* 5:156-64.
31. Takeda K, Kaisho T, Akira S; Toll-like receptors; 2003; *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-76.
32. Ferwerda B, et al.; TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 2007; 104:16645-50.