



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Συσχέτιση των πολυμορφισμών rs5743708 (R753Q) του Toll -Like receptor (TLR)-2 και rs4986790 (D299G) και rs4986791 (T399I) του TLR4 με την επίπτωση λοιμώξεων σε παιδιατρικούς ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες.

Γεωργοπούλου Ελένη Ραφαηλία του Αντωνίου

Τριμελής επιτροπή:

Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας,
Επιβλέπων

Παπουτσοπούλου Σταματία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής
Ανοσολογίας, Συνεπιβλέπουσα

Καλαλά Φανή, Επίκουρος Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας,
Μέλος



University of Thessaly
School of Health Science
Department of Biochemistry & Biotechnology

Correlation between rs5743708 (R753Q) polymorphism of Toll-Like receptor (TLR) -2 and rs4986790 (D299G) and rs4986791 (T399I) polymorphisms of TLR4 with infection incidence in pediatric patients with hematological malignancies.

Georgopoulou Eleni Rafailia

Examining Committee:

Speletas Matthaios, Professor of Medical Immunology

Papoutsopoulou Stamatia, Assistant Professor of Molecular Immunology

Kalala Fani, Assistant Professor of Medical Immunology

Περιεχόμενα

1.Ευχαριστίες	5
2.Περίληψη	6
3.Abstract	7
4.Γενικό μέρος	8
A. Αιματολογικές Κακοήθειες	8
4.A.i Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία	9
4.A.ii Λεμφώματα	12
B. Υποδοχείς τύπου Toll	14
4.B.i Γενικές πληροφορίες	14
4.B.ii Προσδέτες και Συσχέτιση με παθογόνα	16
4.B.iii Μεταγωγή Σήματος	17
4.B.iv TLR4	20
4.B.v TLR2	23
C. TLRs και πολυμορφισμοί	26
4.C.i TLR4 D299G	27
4.C.ii TLR4 T399I	28
4.C.iii TLR4 R753Q	29
5.Σκοπός	29
6.Ειδικό Μέρος	30
A. Μελέτη Ατόμων	30
B. Υλικά και Μέθοδοι	30

C. Μεθοδολογία	31
6.C.i Απομόνωση DNA	31
6.C.ii PCR	32
6.C.iii Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%	34
6.C.iv Πέψη	36
6.C.v Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 3%	39
7. Αποτελέσματα	40
8. Συζήτηση	42
9. Βιβλιογραφία	44

Ευχαριστίες

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Σπελέτα Ματθαίο ,Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας, ο οποίος μου επέτρεψε να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας αλλά και για την συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση του καθ'όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τις καθηγήτριες κ. Παπουτσοπούλου Σταματία και κ. Καλαλά Φανή, οι οποίες συμφώνησαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή μου αλλά και για τις χρήσιμες συμβουλές που μου παρείχαν.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια κ. Πολυχρονοπούλου Σοφία , και την επίκουρη επιμελήτρια κ. Τζότζολα Βασιλική του Παιδοογκολογικού τμήματος του Γ.Ν.Παιδων « Η Αγία Σοφία», για την παροχή των δειγμάτων και όλων των κλινικών στοιχείων των ασθενών αλλά και για την έγκριση συμμετοχής μου στο ερευνητικό αυτό πρόγραμμα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Παλιάτσα Βασιλική για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη της κατά την εκπόνηση της εργασίας μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη που απαρτίζουν το εργαστήριο της Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας και ιδιαίτερα την κ. Φουσίκα Αθανασία που με την παρουσία και καθοδήγησή της στα τεχνικά θέματα του εργαστηρίου βοήθησε να πραγματοποιηθεί η εργασία αυτή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και όλα τα άτομα που με στήριξαν όλο αυτό το διάστημα .

Περίληψη

Οι πιο συχνές μορφές νεοπλασματος σε παιδιά έχει βρεθεί ότι είναι η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ) και τα λεμφώματα. Και στις δυο περιπτώσεις πρόκειται για κακοήθειες των λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος , οι οποίες οδηγούν στον αλόγιστο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίησή τους.

Είναι πολλοί οι παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση των νεοπλασιών αυτών , οι οποίες χαρακτηρίζονται κυρίως από ανοσοκαταστολή. Λόγω της ανοσοκαταστολής οι ασθενείς είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην προσβολή από λοιμογόνους παράγοντες και στην επακόλουθη εμφάνιση λοιμώξεων.

Οι λειτουργικοί πολυμορφισμοί των υποδοχέων τύπου Toll (Toll Like Receptors, TLRs) και συγκεκριμένα των υποδοχέων TLR2 και TLR4 έχουν συσχετιστεί ευρέως με την εμφάνιση λοιμώξεων σε παιδιατρικούς ασθενείς με αιματολογικές νεοπλασίες κατά τη διάρκεια της θεραπείας τους.

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί T399I (rs4986791) και D299G (rs4986790) του γονιδίου *TLR4* και ο πολυμορφισμός R753Q (rs5743708) του γονιδίου *TLR2* έτσι ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος τους στην επίπτωση λοιμώξεων σε έναν πληθυσμό 98 δειγμάτων ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες του Γ.Ν Παιδών «Η Αγία Σοφία».

Τα ποσοστά των πολυμορφισμών του TLR4 που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα μας βρίσκονται κοντά σε αυτά του ευρωπαϊκού πληθυσμού , όμως δεν βρέθηκε κανένα ετερόζυγο άτομο για τον πολυμορφισμό του *TLR2*.

Έτσι στην μελέτη μας δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση των πολυμορφισμών με την επαγωγή λοιμώξεων στους ασθενείς , ενώ θα μπορούσε να απορρέει κάποιος προστατευτικός ρόλος των πολυμορφισμών σε παιδιά με λεμφώματα. Βέβαια κάποιο τέτοιο συμπέρασμα θα απαιτούσε ένα πολύ μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και περαιτέρω μελέτη πάνω στο αντικείμενο.

Abstract

The most common forms of childhood neoplasm include Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) and different types of Lymphomas. Both cases appertain to malignancies of the lymphocytes exited in the bloodstream, leading to their improvident proliferation.

A plethora of factors responsible for generating neoplasms has been identified, all of them involving immunosuppression. Due to this fact, most patients are highly prone to invasion by virulence factors and to subsequent infection development.

Functional polymorphisms of the TLR receptor genes, particularly those of the TLR2 and TLR4 receptors, have been widely associated with infection development in pediatric patients with hematological neoplasms during their treatment.

In this current study, three polymorphisms were delved into. The first two, T399I (rs4986791) and D299G (rs4986790) involve the TLR4 gene, while the last one, R753Q (rs5743708) involves the TLR2 gene. The following chapters focus on investigating the impact of these 3 polymorphisms regarding infections on a population of 98 samples, derived from patients with hematological malignancies of the General Children's Hospital 'Agia Sophia'.

The results of this research indicate that TLR4 polymorphism rates of the population appear close to the corresponding rates of the european population. However, no heterozygous individuals regarding the *TLR2* gene polymorphisms were found.

In this light, the present study does not introduce any association of these particular polymorphisms with infection development, whereas a beneficial role of the polymorphisms could be indicated. Nonetheless, this conclusion is needs a much larger sample group, as well as further research on the subject.

4.Γενικό μέρος

4.Α.Αιματολογικές Κακοήθειες

Οι λευχαιμίες αποτελούν ένα είδος κακοηθειών που αφορούν στον αιμοποιητικό ιστό συμπεριλαμβανομένου και του μυελού των οστών όπου και έχουμε μεγάλη εμφάνιση λευκοκυττάρων πέρα από τα φυσιολογικά όρια.

Διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: τις Οξείες λευχαιμίες (Acute Leukemias) και τις Χρόνιες λευχαιμίες (Chronic Leukemias) . Οι οξείες λευχαιμίες διακρίνονται περαιτέρω στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία ή ΟΜΛ (Acute myeloid leukemia, AML) και στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία ή ΟΛΛ (Acute lymphoblastic leukemia, ALL) . Οι χρόνιες διακρίνονται στην Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία (ΧΛΛ, CLL) και στην Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ, CML) ως τις δυο κύριες.

Τα λεμφώματα αποτελούν τους όγκους οι οποίοι προκύπτουν από λεμφοκύτταρα και διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τα λεμφώματα Hodgkin (HL) και Non-Hodgkin (NHL).

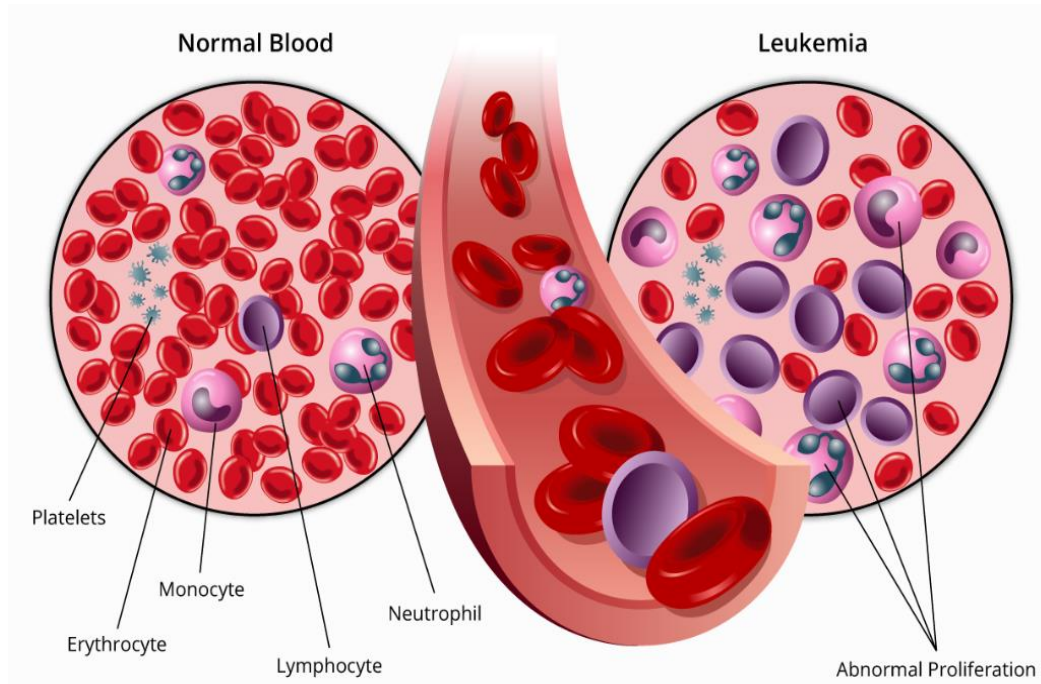
Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ) και τα Λεμφώματα είναι οι πιο συχνές μορφές νεοπλασματος σε παιδιά (1).



Εικόνα 1: Κατηγορίες των λευχαιμιών και των λεμφωμάτων.

4.A.i Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ)

Η ΟΛΛ προκαλείται από κακοήγη εξαλλαγή των βλαστικών κυττάρων της λευκοκυτταρικής σειράς που οδηγούν στον ανώμαλο πολλαπλασιασμό τους. Τα κύτταρα αυτά κυκλοφορούν στον μυελό των οστών και οδηγούν στην καταστολή της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος (2) (3) (4) .



Εικόνα 2: Κατηγορίες κυττάρων που εμφανίζονται συχνότερα στη κυκλοφορία του αίματος υγιών ασθενών (αριστερά) και ασθενών με λευχαιμία (δεξιά). Platelets= αιμοπετάλια, Erythrocyte= ερυθροκύτταρο, Monocyte= μονοκύτταρο, Lymphocyte=λεμφοκύτταρο, Neutrophil=ουδετερόφιλο, Abnormal Proliferation=ανώμαλη ανάπτυξη.

Τα κλινικά συμπτώματα είναι η αναιμία ,η ουδετεροπενία (πτώση του απόλυτου αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων του περιφερικού αίματος) και η θρομβοπενία (ελάττωση του αριθμού των αιμοπεταλίων στο αίμα) (2)(4).

Το 80% των περιπτώσεων της ΟΛΛ προσβάλλει παιδιά μικρότερα των 6 ετών με το ποσοστό προσβολής αγοριών να είναι μεγαλύτερο του ποσοστού προσβολής κοριτσιών. Κάθε περίπτωση μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τα έμφυλα , τα ηλικιακά ,τα εθνικά χαρακτηριστικά σε αντιστοιχία με την έκβαση της ασθένειας . (3) (4)

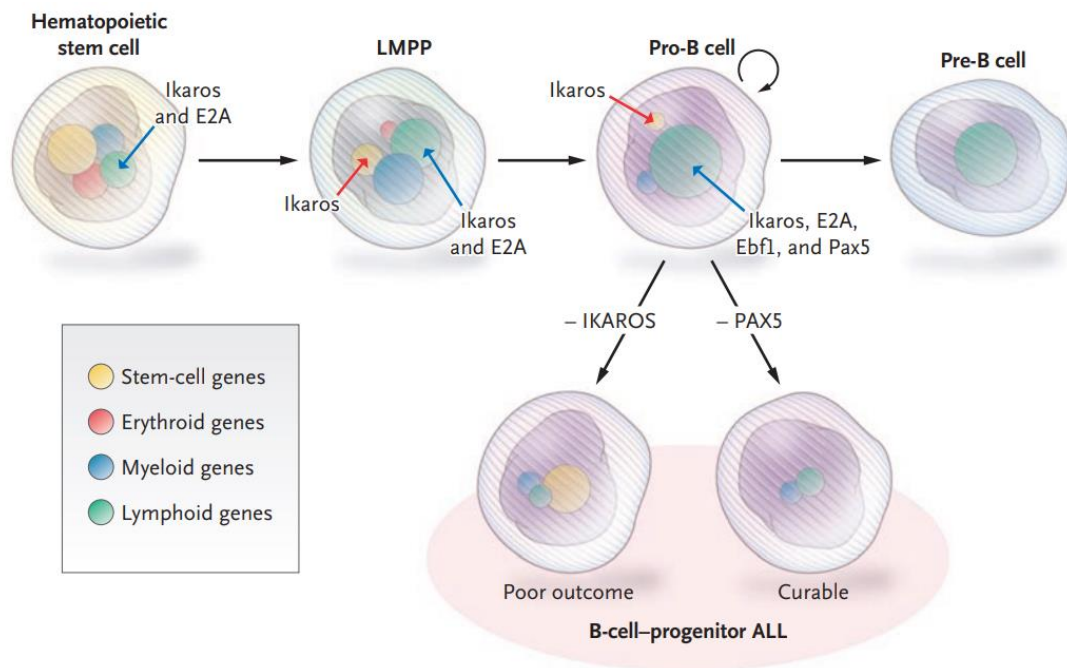
Παρόλο που για τα παιδιά έχει υπάρξει μεγάλη βελτίωση στο κομμάτι της πρόγνωσης, για τους ενήλικες τα πράγματα είναι διαφορετικά καθώς κατά την εμφάνιση της ΟΛΛ τα αποτελέσματά είναι καταστροφικά (3).

Έχει βρεθεί ότι το σύνδρομο Down, η αναιμία Fanconi, μεταλλάξεις σε παράγοντες όπως ο PAX5 (Paired Box 5), ο ETV6 (ETS Variant Transcription Factor) και ο IKZF1 (Ikaros family zinc finger protein 1), προδιαθέτουν στην εμφάνιση μιας μειονότητας των περιστατικών. Άλλοι παράγοντες που θα μπορούσαν να προδιαθέτουν την ΟΛΛ αποτελούν η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, τα φυτοφάρμακα και κάποιοι ιοί συμπεριλαμβανομένου του Epstein Barr και HIV (human immunodeficiency virus) (1) (3) (4).

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες και συγκεκριμένα οι διαμεταθέσεις είναι ένας κύριος παράγοντας εμφάνισης ΟΛΛ, εφόσον προκαλούν καταστολή έκφρασης πολλών μεταγραφικών παραγόντων αλλά και την ενεργοποίηση ή καταστολή της ενεργότητας πολλών κινασών όπως η JAK2 και ο αρνητικός ρυθμιστής της, LNK. Τέτοιες διαμεταθέσεις είναι οι t(9;22), t(4;11), t(8;14) (2) (3).

Άλλες έρευνες έχουν δείξει τον σημαντικό ρόλο των ελλείψεων στην εμφάνιση και έκβαση της ΟΛΛ. Συγκεκριμένα έχουν βρεθεί ελλείψεις στο γονίδιο IKZF1, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη IKAROS, πρωτεΐνη απαραίτητη για την ενεργοποίηση πληθώρας γονιδίων τα οποία επιτρέπουν τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων στις διάφορες κατηγορίες των λεμφοκυττάρων (εικόνα 3).

Οι ελλείψεις στο γονίδιο της IKAROS έχουν συσχετιστεί με αυξημένη συχνότητα υποτροπών κατά το 5^ο και 10^ο έτος παιδιατρικών ασθενών με ΟΛΛ καθώς και με αντίσταση στην χημειοθεραπεία.



Εικόνα 3: Ο ρόλος της πρωτεΐνης IKAROS, στην ενεργοποίηση ή καταστολή γονιδίων διαφόρων κατηγοριών λεμφοκυττάρων. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της IKAROS μπορούν να προξενήσουν ΟΛΛ (21).

Διακρίνουμε 3 υποτύπους: L1, L2, L3 σύμφωνα με το μέγεθος των κυττάρων, του κυτταροπλάσματος και το μοτίβο της χρωματίνης. Η κατηγοριοποίηση μπορεί να γίνει με μεθόδους όπως ο καρυότυπος, ο ανοσοφαινότυπος (χρήση αντισωμάτων ειδικών για αντιγόνα επιφάνειας στα διάφορα κύτταρα της λευκοκυτταρικής σειράς) και διάφορες μοριακές τεχνικές (2) (3) (4).

Ο υπότυπος L1 αποτελεί το 80% των περιπτώσεων σε παιδιά και 30% σε ενήλικες, ο υπότυπος L2 αποτελεί την πλειονότητα της ΟΛΛ σε ενήλικες και ο υπότυπος L3 έχει τη μικρότερη συχνότητα και εμφανίζεται σε ένα ποσοστό 3-4% και στα παιδιά και στους ενήλικες. Η μορφολογία του L3 είναι πανομοιότυπη με το λέμφωμα Burkitt (2).

Κύρια θεραπεία η χημειοθεραπεία και βασίζεται σε παιδιατρικά πρωτόκολλα.

4.A.ii Λεμφώματα

Τα λεμφώματα αποτελούν και αυτά νεοπλασίες των κυττάρων του αίματος που αφορούν ώριμα λεμφοκύτταρα και διακρίνονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τα λεμφώματα Hodgkin (HL) και Non-Hodgkin (NHL).

Αρχικά κατηγοριοποιούνταν σύμφωνα με την κυτταρική προέλευση από Β κύτταρα, Τ κύτταρα ή φυσικά κυτταροκτόνα (NK) κύτταρα . Έπειτα κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με το αν οφείλονταν σε πρόδρομα ή ώριμα λεμφοκύτταρα. Σήμερα έχει επικρατήσει τα Hodgkin και Non-Hodgkin (5).

Παράγοντες κινδύνου για ορισμένους τύπους λεμφωμάτων αποτελούν οι χρόνιες λοιμώξεις από ιούς όπως ο ιός EpsteinBarr (EBV) και ο ανθρώπινος ερπητοϊός τύπου 8 (HHV8), η ανοσοκαταστολή αλλά και κάποια κληρονομικά χαρακτηριστικά (5).

Ακόμη τα αυτοάνοσα νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το σύνδρομο Sjögren, μπορεί να προκαλέσουν λέμφωμα λόγω της χρόνιας διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ανοσοκαταστολή προάγει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης τόσο HL όσο και NHL κάτι το οποίο έχει δειχθεί από έρευνες σε άτομα με HIV (human immunodeficiency virus) .

Κίνδυνος επίσης υπάρχει και λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία και τα φυτοφάρμακα (5).

Η θεραπεία για τα λεμφώματα είναι η χημειοθεραπεία με διαφορές στα πρωτόκολλα ανάλογα με τον τύπο του λεμφώματος (6).

Λέμφωμα Hodgkin.

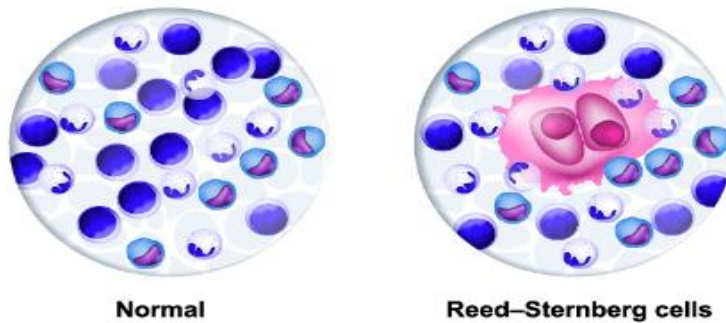
Το λέμφωμα Hodgkin χαρακτηρίζεται παθολογικά από την παρουσία των κυττάρων Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) και των παραλλαγών τους και πρόκειται για μια μορφή ευρέως θεραπεύσιμη (5) (6) (7) (8).

Βεβαίως αυτά τα κύτταρα αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των κυττάρων του λεμφοειδούς ιστού. Η πλειονότητα αποτελείται από Τ κύτταρα και Β κύτταρα.

Οι μορφές του λεμφώματος Hodgkin προέρχονται λόγω βλαβών σε γονίδια καταστολής όγκων, μεταλλάξεων σε πρωτο-ογκογονίδια αλλά και χρωμοσωμικές μετατοπίσεις. Συσχετισμός υπάρχει και με επιρροή του

μεταγραφικού παράγοντα NF-κB αλλά και του μονοπατιού JAK/STAT , βλάβες στο οποίο επηρεάζουν την παραγωγή της πρωτεΐνης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD1 (6).

Hodgkin's lymphoma



Εικόνα 4: Μορφολογία των κυττάρων Hodgkin and Reed-Sternberg.

Λέμφωμα Non-Hodgkin.

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων του NHL προέρχονται από βλάβες στην κατηγορία των Β λεμφοκυττάρων.

Οι μορφές του λεμφώματος Non -Hodgkin προέρχονται λόγω διαμεταθέσεων όπως οι t(8;14), t(2;8) and t(8;22) αλλά και βλαβών στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος του NF-κB , στο μονοπάτι NOTCH/FBXW7 και στην πρωτεΐνη καταστολέα όγκων PTEN (Phosphatase and tensin homolog) (6).

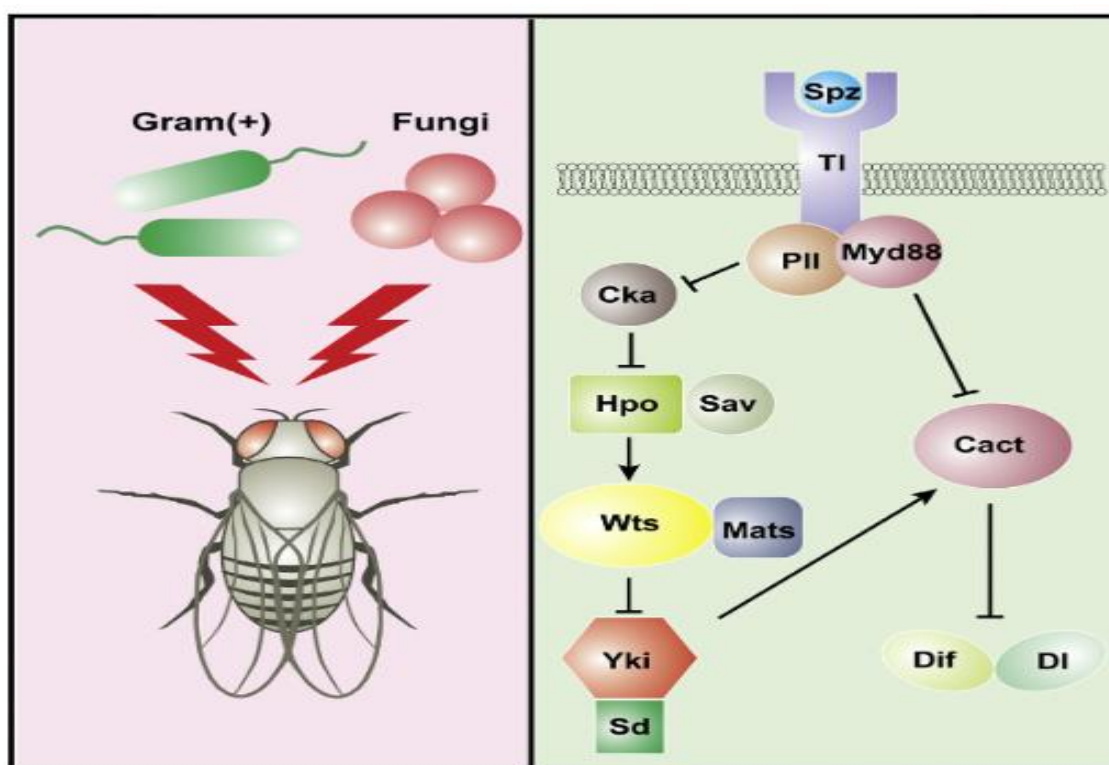
4.B.Υποδοχείς τύπου Toll

4.B.i Γενικές πληροφορίες

Το σύστημα της φυσικής ανοσίας περιέχει υποδοχείς οι οποίοι μπορούν να αναγνωρίσουν ειδικά μοριακά πρότυπα σε διάφορα παθογόνα όπως *M. Tuberculosis*, *Brucella* κ.α (9).

Οι υποδοχείς TLRs (Toll Like Receptors) είναι μια οικογένεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου 1 στα ανθρώπινα κύτταρα, ομόλογες με την πρωτεΐνη Toll της μύγας *Drosophila* (10). Έχουν βρεθεί 13 υποδοχείς στον ποντικό και 10 στον άνθρωπο (11).

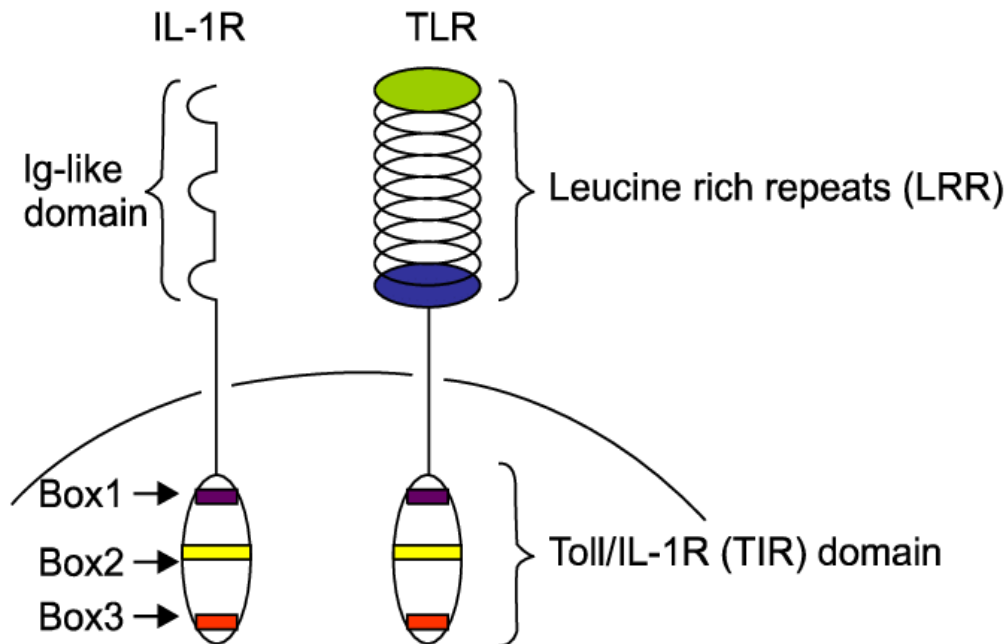
Αρχικά στην *Drosophila* ο Toll υποδοχέας ανακαλύφθηκε λόγω του σημαντικού του ρόλου στα στάδια της ανάπτυξης και έπειτα βρέθηκε η σημασία του στην προστασία των εντόμων έναντι μολύνσεων. Συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις του γονιδίου Toll καθιστούσαν τις μύγες ευάλωτες σε μολύνσεις από τον μύκητα *Aspergillus tumigatus*, μολύνσεις που οδηγούσαν ακόμη και στο θάνατο.



Εικόνα 5: Ρόλος και μεταγωγή σήματος του υποδοχέα Toll στη *Drosophila* (24).

Οι TLRs εκφράζονται σε πληθώρα κυττάρων της φυσικής αλλά και της επίκτητης ανοσίας, με σημαντικό ρόλο στην διέγερσή τους. Συγκεκριμένα στα Β και Τ λεμφοκύτταρα λειτουργούν σαν συνδιεγέρτες για την ενίσχυση του πολλαπλασιασμού, της ωρίμανσης και της παραγωγής κυτταροκινών. Γι αυτό το λόγο μεταλλάξεις στα διάφορα μόρια TLRs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση διαφόρων κακοηθειών των λεμφοκυττάρων. (29)

Οι TLRs είναι υποδοχείς PRRs (Pattern Recognition Receptors). Είναι υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων δηλαδή αναγνωρίζουν μοριακά πρότυπα μικροβιακής προέλευσης τα οποία είναι εξελικτικά διατηρημένα. Οι περιοχές αυτές αναφέρονται ως PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) και μπορεί να είναι νουκλεϊκά οξέα, σάκχαρα, λιπίδια, πρωτεΐνες. Ακόμη αναγνωρίζονται και περιοχές DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), οι οποίες προέρχονται από νεκρά ή κατεστραμμένα κύτταρα (12) (23).



Εικόνα 6: Δομή του υποδοχέα TLR και σύγκρισή του με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (26).

Η αναγνώριση των PAMPs και των DAMPs γίνεται μέσω μιας δομής στην εξωκυτταρική πλευρά του υποδοχέα αποτελούμενη από 24 έως 29 επαναλήψεις του αμινοξέος λευκίνη και ονομάζεται LRR (Leukine Rich Repeat). Την αναγνώριση αυτή ακολουθεί μία σειρά γεγονότων που περιλαμβάνει την επαγωγή μεταγραφικών παραγόντων (με κύριο τον NF-κB) οι οποίοι επάγουν τη σύνθεση πληθώρας κυτταροκινών, χημειοκινών, ιντερφερονών, συνδιεγερτικών μορίων κ.α (10) (12).

Ενδοκυτταρικά του υποδοχέα TLR βρίσκεται ένας άλλος υποδοχέας που ονομάζεται TIR1 (TLR-ιντερλευκίνης 1) που απαιτείται για την μεταγωγή σήματος. Κάθε TIR1 ανιχνεύει ένα ρεπερτόριο από πολύ συντηρημένα μόρια παθογόνων (11) (22)

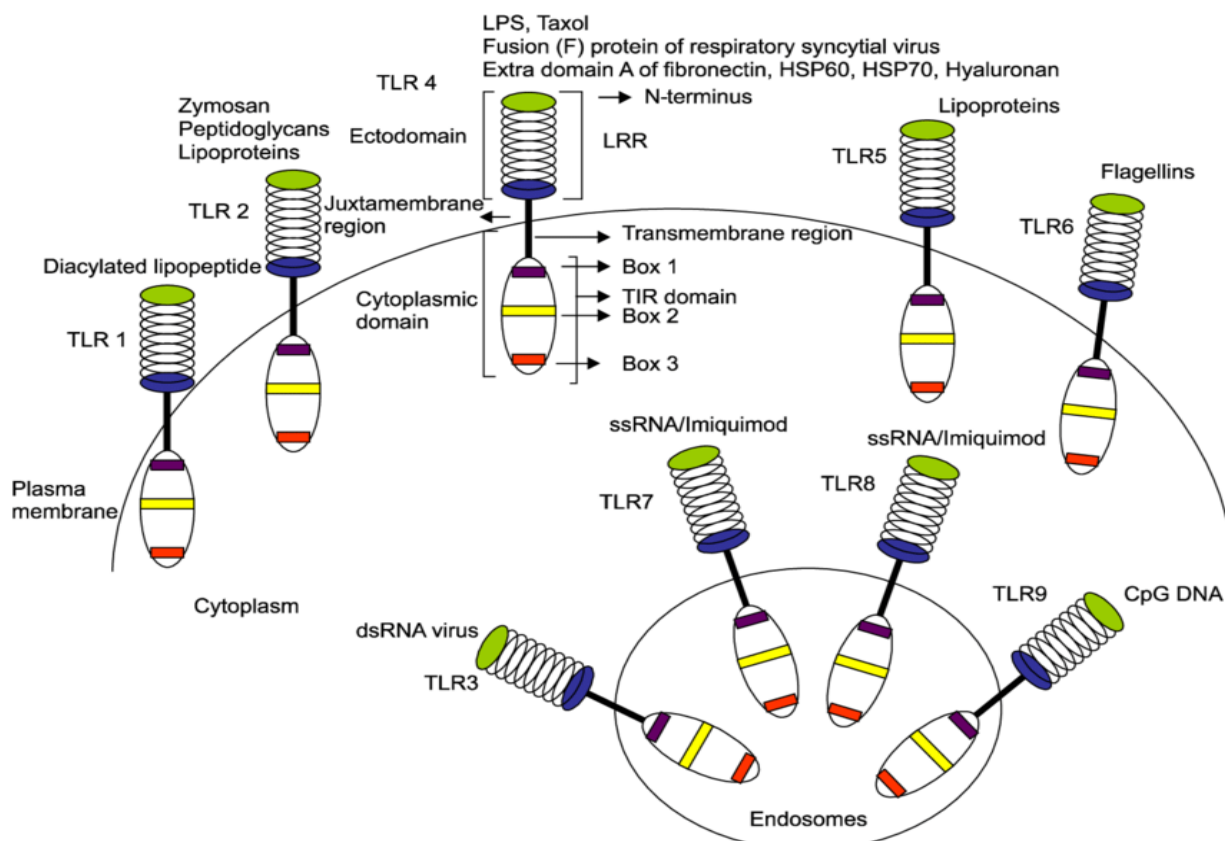
Υπάρχουν 13 τύποι TLRs :

2,4,5,6,10 → επιφάνεια του κυττάρου

7,8,9,11,12,13 → ενδοκυττάρια πχ ενδοπλασματικό δίκτυο ή λυσοσώματα

4.B.ii Προσδέτες και Συσχέτιση με παθογόνα

Οι TLRs που είναι ειδικοί για λιπίδια , πολυσακχαρίτες αλλά και μικροβιακές πρωτεΐνες συναντώνται στην επιφάνεια των κυττάρων , ενώ αυτοί που είναι ειδικοί για νουκλεϊκά οξέα (dsRNA, ssRNA) συναντώνται ενδοκυτταρικά μέσα στα ενδοσώματα που γίνεται η εγκόλπωση των μικροοργανισμών. Αναφέρουμε ότι σχεδόν όλα τα ιικά PAMPs αποτελούν νουκλεϊκά οξέα τα οποία απελευθερώνονται μόνο έπειτα από την εγκόλπωση. Οι TLRs οι οποίοι αναγνωρίζουν αυτές τις περιοχές βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά ενδοκυτταρικά (11).



Εικόνα 7: Προσδέτες των διαφόρων κατηγοριών υποδοχών TLR (26).

Διαφορετικοί TLRs αναγνωρίζουν διαφορετικά μόρια: Ο TLR2 μπορεί να αναγνωρίσει γλυκολιπίδια και πεπτιδογλυκάνες των διαφόρων βακτηρίων ενώ ο TLR4 εμφανίζει ειδικότητα για τον LPS. Οι TLR3, TLR7 και TLR8 μπορούν να αναγνωρίσουν μονόκλωνα αλλά και δίκλωνα μόρια RNA ιών. Ο TLR5 αναγνωρίζει την πρωτεΐνη φλαγγελίνη στο μαστίγιο των βακτηρίων και ο TLR9 αναγνωρίζει νησίδες CpG που δεν έχουν υποστεί μεθυλίωση στο DNA (10).

Οι TLRs σχηματίζουν ετεροδιμερή ή ομοδιμερή. Το ετεροδιμερές των TLR1-TLR2 είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση βακτηρίων, το ετεροδιμερές TLR2-TLR6 για την αναγνώριση Gram - βακτηρίων και μυκήτων, ενώ το ομοδιμερές TLR4-TLR4 για την αναγνώριση gram + βακτηρίων λόγω των βακτηριακών λιποπολυσακχαριτών.

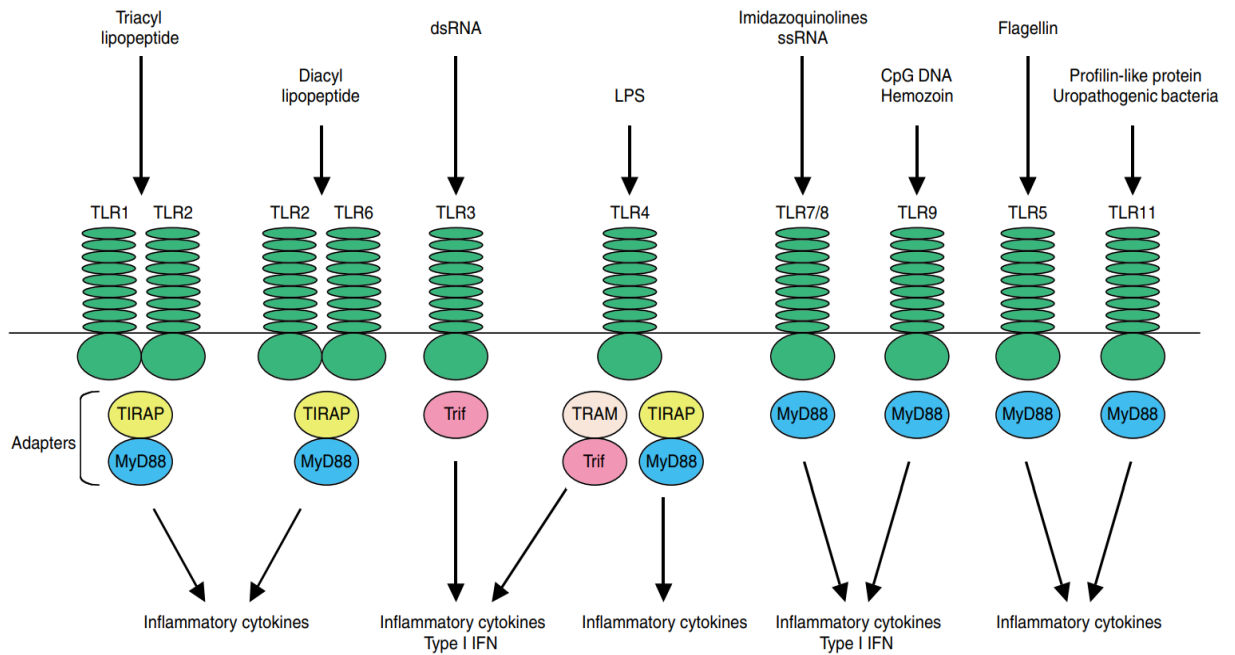
Οι TLRs συναντώνται σε πληθώρα κυττάρων της φυσικής ανοσίας όπως μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα, φυσικά κυτταροκτόνα NK αλλά και στα B λεμφοκύτταρα, στα T λεμφοκύτταρα και στους ινοβλάστες. Έχει βρεθεί συσχέτιση των TLRs με την μειωμένη απάντηση των υποδοχέων και την ανοσοπαθολογία, συμπεριλαμβανόμενης και της ευαισθησίας σε βακτηριακές, μυκητιακές και ιικές μολύνσεις (13) (14).

4.B.iii Μεταγωγή Σήματος

Έπειτα από την αναγνώριση των παθογόνων, οι TLRs σηματοδοτούν ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής που οδηγούν στη σύνθεση φλεγμονωδών κυτταροκινών, ιντερφερονών και χημειοκινών (10).

Η σηματοδότηση μέσω TLRs επάγει ακόμη την αυξορρύθμιση συν διεγερτικών μορίων σε εξειδικευμένα αντιγονοπροσυναρπαστικά κύτταρα όπως τα δενδριτικά κύτταρα (ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων). Με τον τρόπο αυτό γίνεται η επαγωγή της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης και άρα οι TLRs διαδραματίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στην σύνδεση έμφυτης και επίκτητης ανοσίας (10).

Οι TLRs επάγουν μονοπάτια μεταγωγής σήματος που καταλήγουν στη έκφραση κυτταροκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF, η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) και η ιντερλευκίνη 12 (IL-12).



Εικόνα 8: Κύρια μόρια στη μεταγωγή σήματος κάθε TLR υποδοχέα (10).

Οι TLRs όπως ήδη αναφέραμε επάγουν την ενεργοποίηση κυρίως μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB (nuclear factor κ-B) και η πρωτεΐνη AP-1 (activating protein-1).

Πέντε είναι τα κύρια μόρια που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος αφού πρώτα προηγηθεί η διέγερση και ενεργοποίηση των TLRs. Τα μόρια αυτά αποτελούν ο παράγοντας μυελικής διαφοροποίησης 88 MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88), οι πρωτεΐνες προσαρμογείς TRIF (TIR domain-containing adapter inducing IFNβ) ή TICAM1, TIRAP ή MAL (TIR domain-containing adapter protein), TRAM (Trif-related adapter molecule) ή TICAM2 (23).

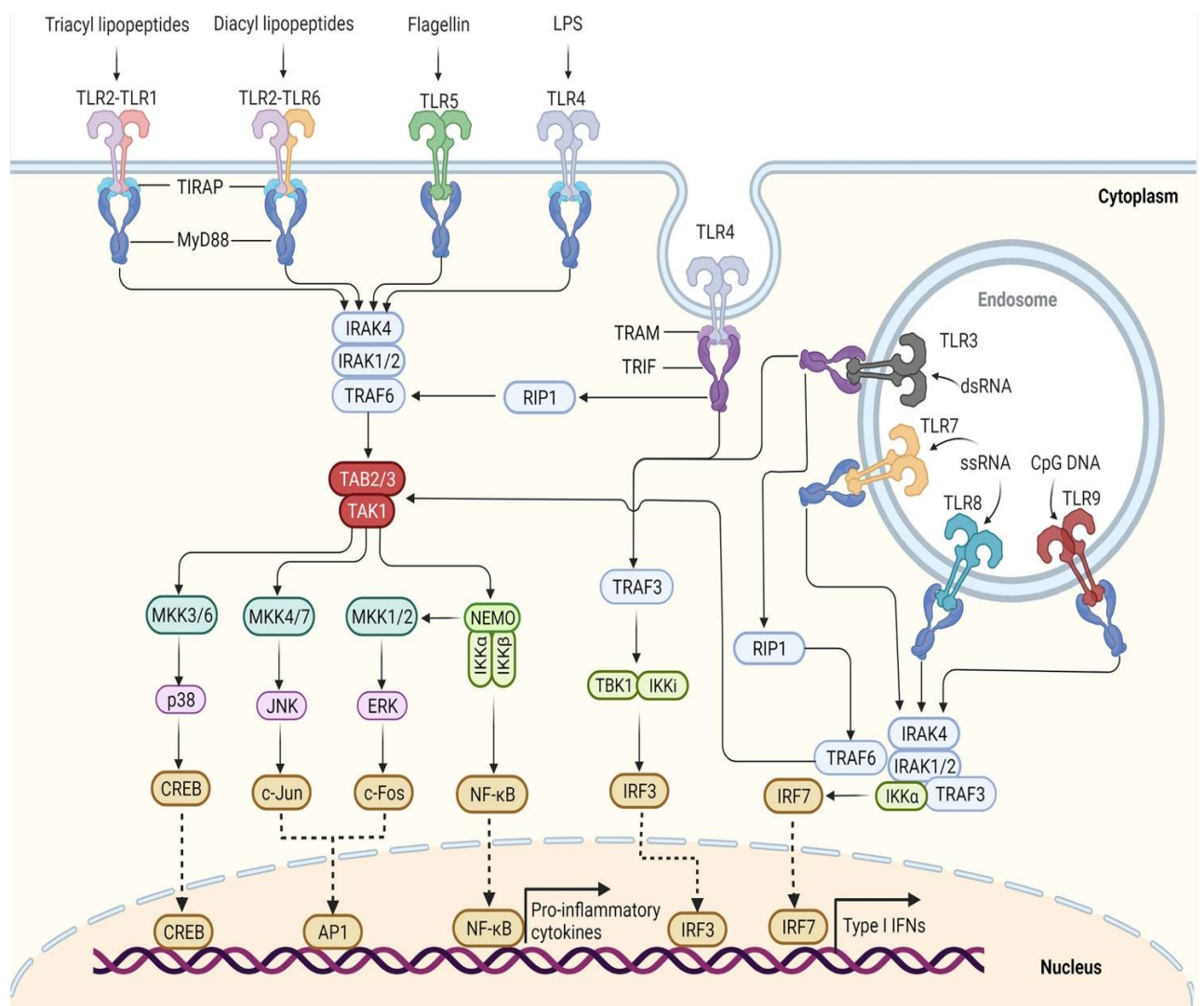
Κατά τη διέγερση των TLRs έπειτα από τον διμερισμό, στον υποδοχέα προσδένεται η πρωτεΐνη TIRAP-MAL δημιουργώντας ένα σύμπλοκο πάνω στο οποίο προσδένεται ο MyD88. Μετά την πρόσδεση του MyD88, στρατολογούνται μόρια όπως οι κινάσες του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase). Οι IRAK αποτελούν κινάσες σερίνης/θρεονίνης

Έχουν ταυτοποιηθεί 4 μόρια IRAK τα IRAK1, IRAK2, IRAK4, IRAK-M (23).

Τα μόρια IRAK1/2 και IRAK4 φωσφορυλιώνονται από το MyD88 και οδηγούν στην ενεργοποίηση του μορίου TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6), και της E3 λιγάσης της ουβικιτίνης. Έπειτα έχουμε την ενεργοποίηση της TAK1 κινάσης (TGF-β - Activated Kinase 1) και των

πρωτεϊνών που προσδένονται σε αυτή, TAB2 και TAB3 (TAK1 binding proteins). Τέλος από το σύμπλοκο TAB2/3-TAK1 πραγματοποιείται η ενεργοποίηση διαφόρων μονοπατιών όπως p38, ERKs, JNK, NEMO τα οποία απορρέουν στην ενεργοποίηση της AP-1, του NF-κB και άλλων πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων (10) (15) (16).

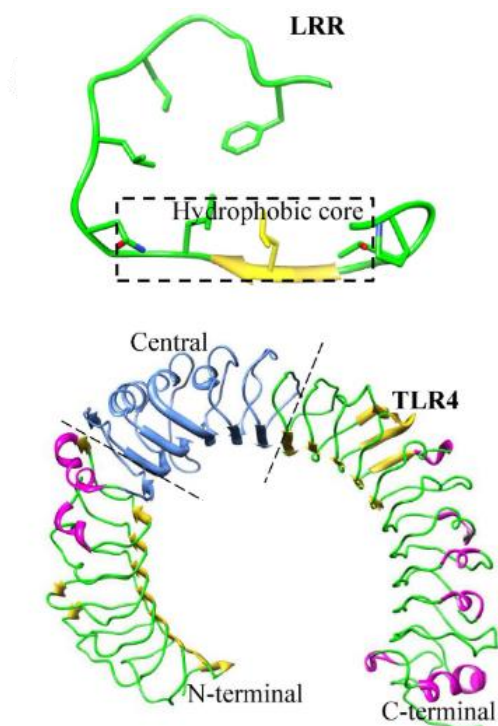
Μια άλλη πιθανή πορεία για τον υποδοχέα TLR4 είναι η μετατροπή του TIRAP σε TRAM και του MyD88 σε TRIF μόλις ο υποδοχέας TLR4 βρεθεί στα ενδοσώματα με τη βοήθεια του CD14. Ακολουθεί η ενεργοποίηση του μορίου TRAF3, του συμπλόκου TBK1/IKK α και του μεταγραφικού παράγοντα IRF3 και επαγωγή ιντερφερονών τύπου β (17).



Εικόνα 9: Μονοπάτια μεταγωγής σήματος των υποδοχέων TLR (18).

4.B.iv TLR4

Το γονίδιο για τον TLR4 βρίσκεται στο σημείο 9q32-q33 δηλαδή στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 9. Η πρωτεΐνη που παράγεται αποτελείται από 839 αμινοξικά κατάλοιπα και το μοριακό της βάρος είναι 90kDa.



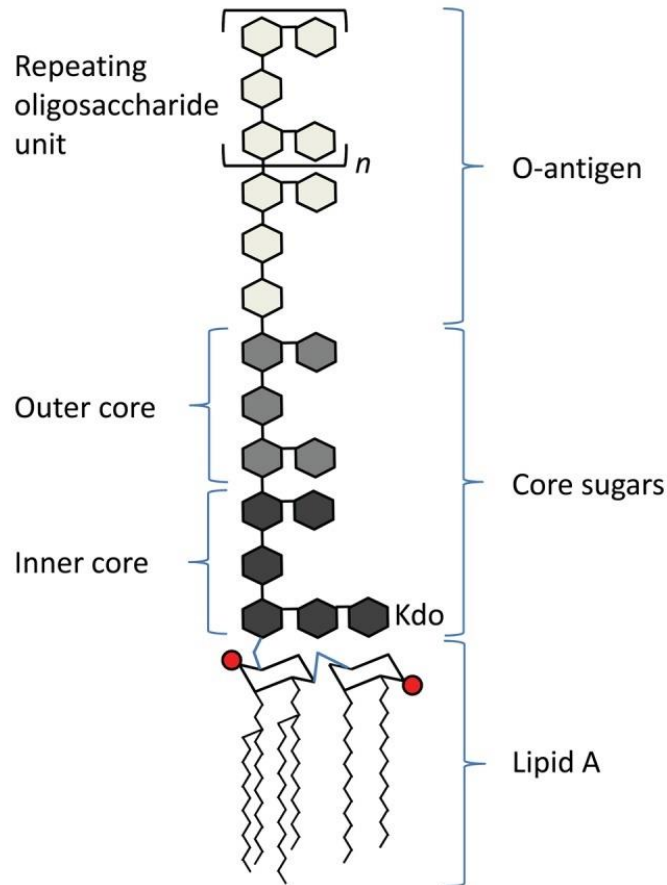
Εικόνα 10: Δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα TLR4 και πρότυπο LRR (27).

Εντοπίζεται σε πολλά κύτταρα όπως δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και σε κάποια T κύτταρα. Ο υποδοχέας αποτελείται όπως όλοι οι υποδοχείς TLRs από έναν εξωκυτταρικό τομέα με το πρότυπο LRR, μία διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική περιοχή TIR.

Ο υποδοχέας TLR4 έχει δείχθει ότι μπορεί να αναγνωρίσει με μεγάλη συγγένεια τον λιποπολυσακχαρίτη LPS ο οποίος αποτελεί και τον κύριο προσδέτη του. Άλλοι προσδέτες είναι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSP, β-ντεφενσίνες κ.α (18).

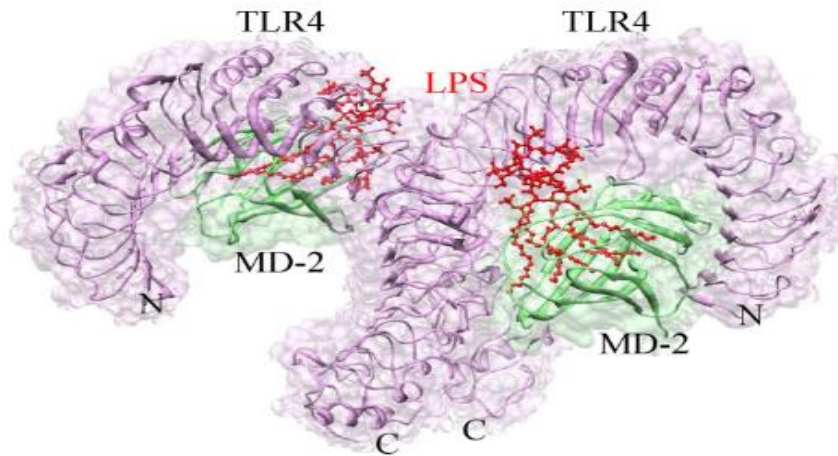
Ο LPS είναι ένας λιποπολυσακχαρίτης που συναντάται στο κυτταρικό τοίχωμα πολλών Gram - βακτηρίων συμβάλλοντας σημαντικά στη δομική ακεραιότητα τους και προστατεύοντας τη μεμβράνη από διάφορα χημικά. Ακόμη διεγείρει πολύ αποτελεσματικά το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου (14) (18).

Τα 3 μέρη από τα οποία αποτελείται ο LPS είναι η αλυσίδα ολιγοσακχαριτη που ονομάζεται O- αντιγόνο , έναν πυρήνα ολιγοσακχαριτών και το λιπίδιο A που αποτελείται από δι-γλυκοζαμίνες.



Εικόνα 11: Δομή του μορίου LPS (25)

Ο TLR4 δεν αναγνωρίζει και συνδέεται με τον προσδέτη του άμεσα , αλλά μέσω τριών βοηθητικών μορίων: την πρωτεΐνη LBP (LPS Binding Protein), το μόριο LY96 (Lymphocyte antigen 96) ή αναφέρεται σαν MD-2 (Myeloid Differentiation factor-2) και τον συνυποδοχέα CD14 (18).



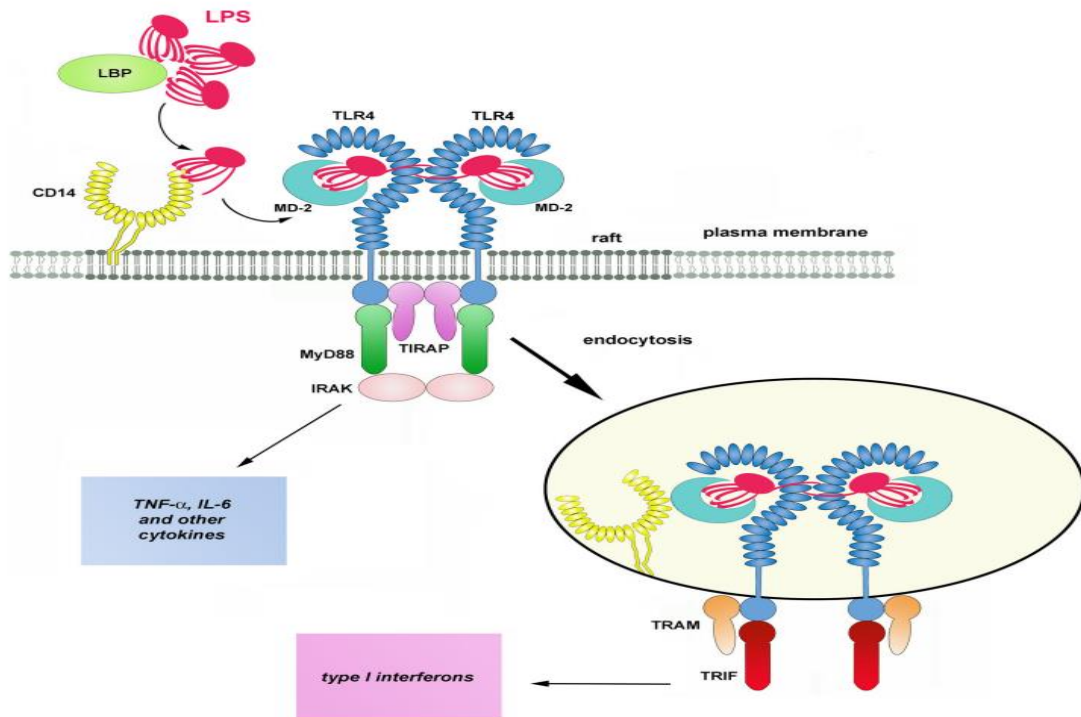
Εικόνα 12: Δομή του ομοδιμερούς TLR4-TLR4 και θέση πρόσδεσης του LPS (27).

Η LBP έρχεται σε επαφή με τη μεμβράνη του προσδέτη και με τη βοήθεια του συνοποδοχέα CD14 γίνεται η πρόσδεση. Το μόριο του LPS μεταφέρεται στο μόριο MD-2 και στη συνέχεια ακολουθεί ο διμερισμός του υποδοχέα TLR4 και ακολουθεί η μεταγωγή σήματος. Η διαδικασία μπορεί να επιτευχθεί και από λίγα μόλις μόρια του LPS.

Η σηματοδότηση μέσω TLR4 περιλαμβάνει τα μόρια MyD88 και TRIF . Μέσω της σηματοδότησης με MyD88 έχουμε ως αποτέλεσμα την πρόωμη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nf -κB και την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών.

Μέσω της σηματοδότησης με TRIF έχουμε καθυστέρηση στην ενεργοποίηση του παράγοντα NF -κB και με αυτό τον τρόπο την παραγωγή ιντερφερονών τύπου1 και άλλων κυτταροκινών.

Η πρόσδεση του LPS τελικά οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα και στον ολιγομερισμό της περιοχής TIR.



Εικόνα 13: Μεταγωγή σήματος ειδικά για το υποδοχέα TLR4 (28)

4.B.v TLR2

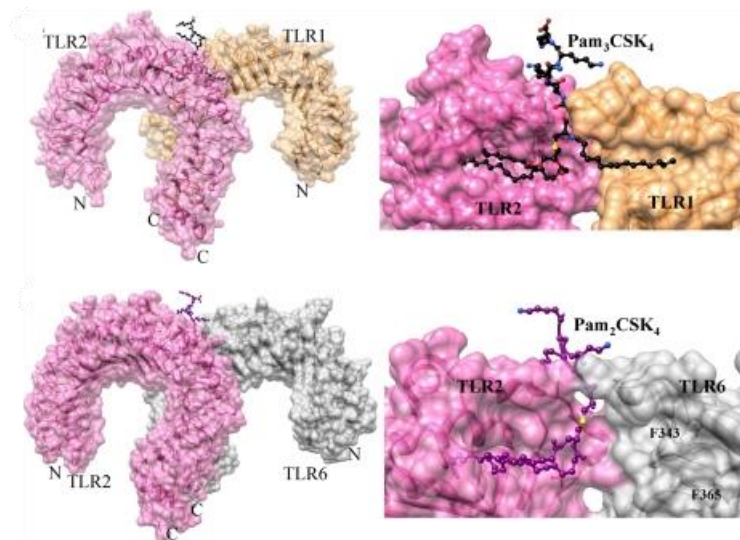
Το γονίδιο για τον TLR2 βρίσκεται στο σημείο 4q32 δηλαδή στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 4.

Η πρωτεΐνη που παράγεται αποτελείται από 784 αμινοξικά κατάλοιπα και το μοριακό της βάρος είναι 84kDa.

Η έκφρασή του είναι υψηλή κυρίως σε λευκοκύτταρα του μυελού των οστών και του λεμφικού ιστού, ενδοθηλιακά αλλά και επιθηλιακά κύτταρα.

Η δομή του είναι η κλασσική δομή ενός TLR υποδοχέα με μία εξωκυτταρική περιοχή πλούσια σε επαναλήψεις λευκίνης LRR (16-18 αμινοξικά κατάλοιπα), μια διαμεμβρανική περιοχή α έλικας και μια ενδοκυτταρική περιοχή TIR.

Ο υποδοχέας ετεροδιμερίζεται με τους TLR1 και TLR6 έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η λειτουργικότητά του και να αποτελέσει το αρχικό βήμα για την επαγωγή των ανοσολογικών αποκρίσεων Βέβαια το μόριο TLR2 μπορεί να αντιδράσει και με μία πληθώρα άλλων μορίων , επιτρέποντας την αναγνώριση ακόμη περισσότερων περιοχών PAMPS σε παθογόνα όπως μικρόβια , μύκητες, βακτήρια, ιούς και παράσιτα (11).



Εικόνα 14: Δομή των ετεροδιμερών TLR2-TLR1, TLR2-TLR6 και θέση πρόσδεσης των προσδετών τους (27).

Ο υποδοχέας TLR2 μπορεί να προσδεθεί με ποικίλα μόρια που περιέχουν δι-ακυλο και τρι-ακυλο γλυκερόλες, μόρια πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών.

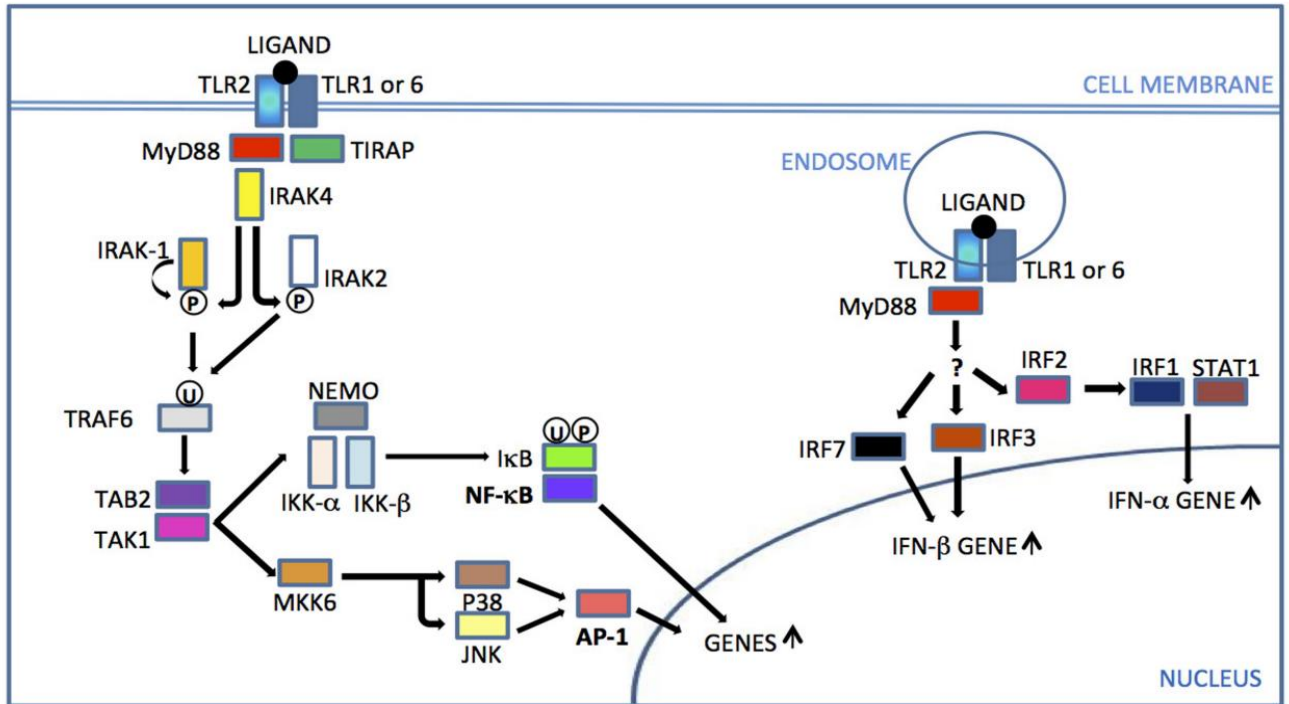
Ως κύριο προσδέτη των TLR2 αναφέρουμε τα μόρια λιποπρωτεϊνών, τα οποία αφθονούν στην επιφάνεια των βακτηρίων και κυρίως των μεμβρανών των Gram + βακτηρίων. Τέτοια βακτήρια είναι αυτά που ανήκουν στο είδος *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Mycobacterium*, και *Mycoplasma* (9) (11).

Τα ετεροδιμερή TLR1-TLR2 αναγνωρίζουν κυρίως μόρια τριάκυλο γλυκερολών ενώ τα TLR2-TLR6 διάκυλο γλυκερολών. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι ο ιός HCV (Hepatitis C virus) μπορεί να αναγνωριστεί από το ετεροδιμερές TLR2-TLR6.

Έχουν βρεθεί και ενδογενείς προσδέτες για τον υποδοχέα, μόρια γνωστά ως σήματα κινδύνου και υποδεικνύουν την νέκρωση, την καταστροφή ιστών και πιθανά κύτταρα όγκων. Τέτοια σήματα αποτελούν οι β ντεφενσίνες, HSP πρωτεΐνες κ.α.

Υποβοηθητικά μόρια στη σύνδεση των ετεροδιμερών του TLR2 υποδοχέα αποτελούν το CD36 το οποίο μεταφέρει τους προσδέτες σε έναν άλλο συνυποδοχέα του TLR2 τον CD14 το οποίο στη συνέχεια συνδέει τον προσδέτη με τα ετεροδιμερή. Τα CD36 και CD14 παραδίδουν τα μόρια-προσδέτες με τη βοήθεια κάποιων λιπιδικής σχεδίας (11).

Η μεταγωγή σήματος για τα ετεροδιμερή TLR2-TLR1 αλλά και TLR2-TLR6 γίνεται μέσω του μονοπατιού MyD88/ NF-κB.



Εικόνα 15: Μεταγωγή σήματος ειδικά για το υποδοχέα TLR2 (11).

Ο καταρράκτης μεταγωγής σήματος για τον TLR2 μπορεί να ενεργοποιήσει και ειδικές κινάσες σερίνης / θρεονίνης MAPKs, οι οποίες επηρεάζουν την μεταγραφή φλεγμονοδών κυτταροκινών αλλά και την ενεργοποίηση της AP-1 (16) (17).

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με το γονίδιο του TLR2 ,και την ποικιλομορφία που παρουσιάζει , αφορούν *in vivo* πειράματα σε ποντίκια στα οποία είχε επιτευχθεί απενεργοποίηση/ αφαίρεση (knock out) του γονιδίου του υποδοχέα στα ποντίκια αυτά .

Οι *in vitro* πειραματικές διαδικασίες αφορούσαν κύτταρα ποντικού , ανθρώπινα κύτταρα ή κυτταρικές σειρές που προέρχονται και από τα δυο είδη, συμπεριλαμβανομένων δενδριτικών κυττάρων, μακροφάγων και ανθρώπινων PBMCs (Human peripheral blood mononuclear cells) .

Σύγκριση της αλληλουχίας αννάμεσα σε ποντικό και άνθρωπο έδειξε μεγαλύτερη ομολογία στην ενδοκυτταρική αλληλουχία (περι 84%) σε σύγκριση με την εξωκυτταρική (περι 65%).

Μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκάθαρο εάν οι υποδοχείς TLR1 και TLR6 μπορούν να επάγουν την ανοσολογική απόκριση εάν υπάρχει απουσία του TLR2 , ζήτημα το οποίο σίγουρα χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Έχει βρεθεί ότι υπάρχουν λειτουργικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια των TLR1 και TLR6 , οι οποίοι σχετίζονται με την εμφάνιση λοιμωδών ασθενειών (11).

4.C.TLRs και πολυμορφισμοί

Στην παρούσα μελέτη όσον αφορά τον υποδοχέα TLR4 ασχοληθήκαμε με δυο μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) του, τον D299G και T399I . Οι δυο πολυμορφισμοί συχνά παρατηρούνται μαζί και λαμβάνουν χώρα στο εξωκυτταρικό μέρος του υποδοχέα (14) (18).

Έχει βρεθεί ότι και τα δυο SNPs και κυρίως το D299G , προκαλούν μειωμένη απάντηση στην πρόσδεση του υποδοχέα με τον LPS , όμως αυξάνουν την ευαισθησία στα Gram αρνητικά παθογόνα στον άνθρωπο. Πιθανότατα ο T399I να δρα αντισταθμιστικά του D299G.

Μελέτες έδειξαν πως δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των συγκεκριμένων πολυμορφισμών και της ανάπτυξης των κυττάρων , στην έκφραση πρωτεϊνών ή στην κατανομή τους στην κυτταρική επιφάνεια ή ενδοκυτταρικά.

Κότταρα με τον πολυμορφισμό D299G παρήγαγαν λιγότερη ιντερλευκίνη 8 σε σχέση με τα αγρίου τύπου ή αυτά με τον πολυμορφισμό T399I.

Κότταρα με D299G και με D299G/ T399I παρήγαγαν λιγότερο NF-κΒ σε σχέση με αγρίου τύπου.

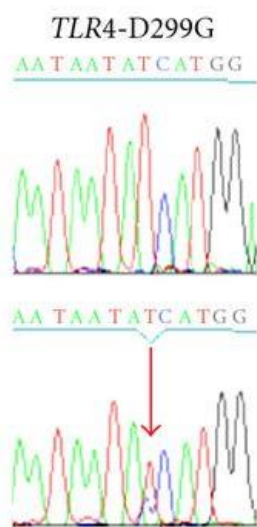
Έχει φανεί από μελέτες ότι οι δυο αυτοί πολυμορφισμοί συσχετίζονται με την εκδήλωση μυκητιακών λοιμώξεων , τυφοειδούς πυρετού κ.α .

Σε αντίθεση με το γεγονός της ευαισθησίας , από άλλες μελέτες έχει ανακαλυφθεί ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί παρέχουν προστατευτικό ρόλο έναντι της λοίμωξης από *Streptococcus Pneumoniae*.

Η μελέτη (Liadaki et al., 2011) έδειξε την επηρέπεια των ατόμων που φέρουν τον τους πολυμορφισμούς 299 και 399 του TLR4 στην εμφάνιση αμυγδαλίτιδας που οφείλεται στα βακτήρια *Streptococcus pyogenes* και *Haemophilus influenzae* (13).

Τα άτομα τα οποία έχουν μολυνθεί από HIV και φέρουν τους πολυμορφισμούς D299G και T399I έχει δείχθει ότι υπάρχει πιθανότητα προσβολής από φυματίωση (9).

4.C.i TLR4 D299G



Εικόνα 16: Διάγραμμα αλληλούχισης Sanger για τον πολυμορφισμό rs4986790 (14)

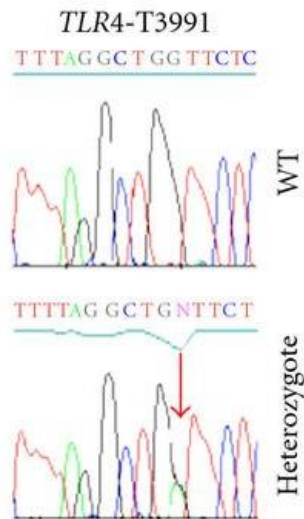
Ο πολυμορφισμός αυτός συμβολίζεται ως rs4986790 ή Asp299Gly , δηλαδή γίνεται μετατροπή του Ασπαρτικού οξέος σε γλυκίνη στο 299^ο αμινοξύ. Η μετάλλαξη συμβαίνει στο νουκλεοτίδιο 826 το οποίο τροποποιείται από αδερίνη (A) σε γουανίνη (G).

Η θέση 299 παρατηρείται ανάμεσα από το σημείο στο οποίο γίνεται η πρόσδεση του μορίου MD με τον TLR4. Η μετάλλαξη προκαλεί αλλαγή της δομής του βρόχου στις επαναλήψεις LRR

Η συχνότητα εμφάνισης της στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό ανέρχεται στο 5,9%

Έχει υπάρξει μεγάλη συσχέτιση του πολυμορφισμού με κίνδυνο σήψης ειδικά σε παιδιατρικούς ασθενείς.

4.C.ii TLR4 T399I



Εικόνα 17: Διάγραμμα αλληλούχησης Sanger για τον πολυμορφισμό rs4986791 (14)

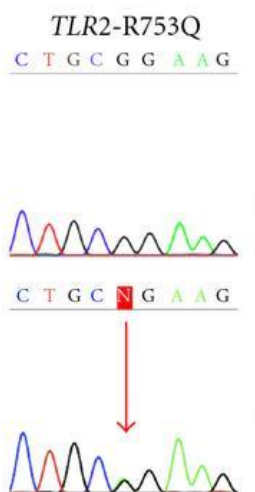
Ο πολυμορφισμός αυτός συμβολίζεται ως rs4986791 ή Thr399Ile δηλαδή γίνεται μετατροπή της θρεονίνης σε ισολευκίνη στο 399^ο αμινοξύ. Η μετάλλαξη συμβαίνει στο νουκλεοτίδιο 1996 το οποίο τροποποιείται από κυτοσίνη (C) σε θυμίνη (T).

Η μετάλλαξη δεν επηρεάζει δομικά τον υποδοχέα.

Διαφορετικό αμινοξύ αλλά το μήκος της αλληλουχίας διατηρείται

Η συχνότητα εμφάνισης της στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό ανέρχεται στο 5,5% .

4.C.iii TLR2 R753Q



Εικόνα 18: Διάγραμμα αλληλούχισης Sanger για τον πολυμορφισμό rs5743708 (14)

Ο λειτουργικός αυτός πολυμορφισμός συμβολίζεται ως rs5743708 ή Arg753Gln. Πρόκειται για την μετατροπή ενός νουκλεοτιδίου γουανίνης G σε αδενίνη A στο κωδικόνιο της αργινίνης στη θέση 753 με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια γλουταμίνη.

Η συχνότητα εμφάνισης της στον Ευρωπαϊκό πληθυσμό ανέρχεται στο 1.7% .

Τα άτομα τα οποία φέρουν τον πολυμορφισμό έχει δειχθεί από έρευνα ότι είναι πιο ευάλωτα στην εμφάνιση φυματίωσης.

Έρευνα σε άτομα με οικογενειακό μεσογειακό πυρετό (FMF) έδειξε συσχέτιση του πολυμορφισμού R753Q με εμφάνιση δευτερογενούς αμυλοειδωσης. Στα άτομα που έπασχαν από FMF, ο R753Q υπήρχε σε πολύ μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό . (9)

5.Σκοπός

Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε με σκοπό να διερευνηθεί η ύπαρξη των σημαντικότερων πολυμορφισμών των υποδοχέων TLR4 και TLR2 που είναι οι T399I, D299G και R753Q αντίστοιχα, στα δείγματα των παιδιατρικών ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες (ΟΛΛ, λεμφώματα) οι οποίοι εμφάνισαν λοιμώξεις κατά τη νοσηλεία/θεραπεία τους και να καθοριστεί αν μπορεί να υπάρξει συσχέτιση σε κάθε περίπτωση με την ευαισθησία σε λοιμώξεις και την έκβαση αυτών.

6.Ειδικό Μέρος

A.Μελέτη Ατόμων

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 100 δείγματα παιδιατρικών ασθενών από το νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία», οι οποίοι έπασχαν από αιματολογική κακοήθεια . Από τα υπο μελέτη άτομα τα 62 ήταν αγόρια και τα 36 ήταν κορίτσια.

Η μέση ηλικία των αγοριών ήταν $SD \pm 7,7$ χρόνια , και η μέση ηλικία των κοριτσιών ήταν $SD \pm 7,2$ χρόνια. (SD, standard deviation: τυπική απόκλιση)

Αρχικά ομαδοποιήθηκαν τα άτομα σύμφωνα με την αιματολογική κακοήθεια από την οποία έπασχαν :

58 άτομα με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (56,84%)

16 άτομα με λέμφωμα Hodgkin (15,68%)

13 άτομα με λέμφωμα Non-Hodgkin (12,74%)

6 άτομα με Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (5,88%)

3 άτομα με Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο (2,94%)

1 άτομο με λέμφωμα Hodgkin-Burkitt (0,98%)

1 άτομο με λέμφωμα Gray Zone (0,98%)

B.Υλικά και Μέθοδοι

Οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν οι εξής:

- Απομόνωση γενετικού υλικού από περιφερικό αίμα ή μυελό των οστών των ασθενών.
- Σχεδίαση εκκινητών για τους πολυμορφισμούς που μελετήθηκαν και διεξαγωγή PCR για την ενίσχυση των τμημάτων.
- Πέψη με περιοριστικό ένζυμο και ηλεκτροφόρηση για εντοπισμό της ύπαρξης του εκάστοτε πολυμορφισμού.

C.Μεθοδολογία

6.C.i Απομόνωση Γενετικού Υλικού

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του DNA ήταν η προτεινόμενη σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Kit της εταιρίας Birt . Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

- a. Τοποθέτηση 200μl αίματος σε erpendorf των 1,5mL
- b. Προσθήκη 1000μL λυτικού διαλύματος και επώαση για 5 λεπτά στον πάγκο, προκειμένου να λυθούν τα ερυθροκύτταρα
- c. Έπειτα από τη λύση των κυττάρων , φυγοκέντριση στα 8.600 g για 4 λεπτά.
- d. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος με προσθήκη 375μL GL buffer, ενός δευτέρου διαλύματος λύσης κυττάρων.
- e. Προσθήκη 10μL Πρωτεΐνάσης K.
- f. Επώαση στους 55°C για 30 λεπτά στο υδατόλουτρο.
- g. Αφαίρεση από το υδατόλουτρο, προσθήκη 4μL RNAάσης A και ξανά επώαση στο υδατόλουτρο στους 37oC για 10 λεπτά.
- h. Αφαίρεση του διαλύματος από το υδατόλουτρο, προσθήκη 400μL GB Buffer και ανάδευση.
- i. Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 2 λεπτά.
- j. Μεταφορά του υπερκειμένου σε ειδική στήλη, στην οποία δεσμεύεται το γενετικό υλικό και διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα στοιχεία του δείγματος.
- k. Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 1 λεπτό και πρώτη πλύση με 600μL Wash Buffer 1.
- l. Φυγοκέντρηση στα 13.000g για 30 δευτερόλεπτα και δεύτερη πλύση με 500μL Wash Buffer 2.
- m. Φυγοκέντρηση στα 16.000g για 2 λεπτά.
- n. Μεταφορά της στήλης σε τελικό erpendorf των 1,5mL.
- o. Προσθήκη στη στήλη 100μL Elution Buffer και επώαση στον πάγκο για 5 λεπτά.
- p. Τελική φυγοκέντρηση στα 13.000g για 1 λεπτό.

6.C.ii Τεχνική PCR

Για την μελέτη και ενίσχυση των τμημάτων στα οποία παρουσιάζονται οι πολυμορφισμοί με στους οποίους ασχοληθήκαμε έγινε σχεδιασμός εκκινητών με το πρόγραμμα Primer Blast και έλεγχος αυτών με το πρόγραμμα Oligo.

Εγινε χρήση του πρωτοκόλλου το οποίο υπήρχε ήδη στο εργαστήριο και έχει χρησιμοποιηθεί και στην μελέτη (14).

Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

TLR2 R753Q→

Forward: 5' TATGGTCCAGGAGCTGGAGA 3'

Reverse: 5' TGACATAAAGATCCCAACTAGACAA 3'

TLR4 T399I→

Forward: 5' GGTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGCAA 3'

Reverse: 5' ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGC 3'

TLR4 D299G→

Forward: 5' GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCGATG 3'

Reverse: 5' GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCACCAC 3'

Στον πρόσθιο εκκινητή των πολυμορφισμών D299G και T399I έχει γίνει μια αλλαγή βάσης , έτσι ώστε να δημιουργείται εσωτερικά αυτών μια θέση αναγνώρισης του κατάλληλου ενζύμου περιορισμού το οποίο θα χρησιμοποιηθεί στο επόμενο βήμα στους πέψης.

Οι μετατροπές παρουσιάζονται παραπάνω με κόκκινο χρώμα . Όσον αφορά τον forward primer του T399I η κυτοσίνη έχει αντικαταστήσει μια γουανίνη και αντίστοιχα στον D299G μια γουανίνη έχει αντικαταστήσει μια κυτοσίνη.

Οι συνθήκες στους οποίες πραγματοποιήθηκαν οι PCRs φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

TLR2 R753Q

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
First Denaturation (Αρχική αποδιάταξη)	94°C	2 min	
Denaturation (Αποδιάταξη)	94°C	30 sec	38
Annealing (Υβριδισμός)	64°C	30 sec	
Extension (Επιμήκυνση)	72°C	45 sec	
Final extension (Τελική επιμήκυνση)	72°C	5 min	

TLR4 T399I / TLR4 D299G

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
First Denaturation (Αρχική αποδιάταξη)	94°C	2 min	
Denaturation (Αποδιάταξη)	94°C	30 sec	32
Annealing (Υβριδισμός)	57°C	30 sec	
Extension (Επιμήκυνση)	72°C	60 sec	
Final extension (Τελική επιμήκυνση)	72°C	5 min	

Χρησιμοποιήθηκαν 22 μl PCR mix , 6 μl DFS Taq και 2 μl DNA.

Το mix της PCR για τους πολυμορφισμούς **R753Q** και **T399I** κατασκευάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

Reagents	Volume added (μl)
H ₂ O	242,5
PCR Buffer 10x	50
dNTPs	40
MgCl ₂	7,5
5' primer (50 pmol)	10
3' primer (50 pmol)	10

Ενώ για το D299G χρησιμοποιήθηκαν 22 μl PCR mix , 6 μl Xpert Taq και 2 μl DNA και το mix της PCR κατασκευάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

Reagents	Volume added (μl)
H ₂ O	225
PCR Buffer 10x	96
dNTPs	-
MgCl ₂	-
5' primer (20 pmol)	17
3' primer (20 pmol)	17

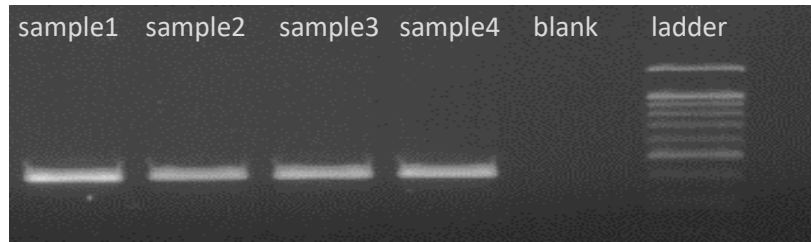
6.C.iii Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%

Για να ελεγχθεί το μέγεθος και η ποιότητα των προϊόντων της PCR δημιουργήθηκε γέλη αγαρόζης της οποίας η σύσταση είναι: 2 γραμμάρια αγαρόζη, 100mL ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE και διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με τελική συγκέντρωση 5ng/mL . Το βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμοποιείται λόγω της ιδιότητας του να παρεμβάλλεται στο μόριο του γενετικού υλικού και να φθορίζει όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

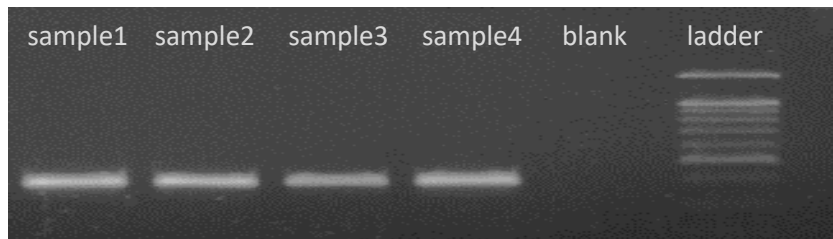
Κατά την ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιήθηκαν 5μl PCR προϊόντος αναμειγμένο με 5μl χρωστικής (loading buffer) για σταθεροποίηση. Ακόμη φορτώθηκε στη γέλη μαζί με τα δείγματα και μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους έτσι ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να συγκριθούν τα διάφορα μοριακά βάρη με τα αναμενόμενα.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120V ,400 mA για 30 λεπτά.

Τέλος η γέλη φωτογραφήθηκε υπό υπεριώδη ακτινοβολία.



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση PCR του πολυμορφισμού R753Q του TLR2.
Sample 1,2,3,4= δείγματα προς μελέτη.



TLR4 T399I ► 404bp

Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση PCR του πολυμορφισμού T399I του TLR4.
Sample 1,2,3,4= δείγματα προς μελέτη.



TLR4 D299G ► 249bp

Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση PCR του πολυμορφισμού D299G του TLR4.
Sample 1,2,3,4= δείγματα προς μελέτη.

6.C.iv Πέψη

TLR2 R753Q→

Η διαδικασία της πέψης για τον πολυμορφισμό rs5743708 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ενζύμου SfcI από την εταιρεία New England Biolabs . Αρχικά κατασκευάστηκε mix SfcI σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

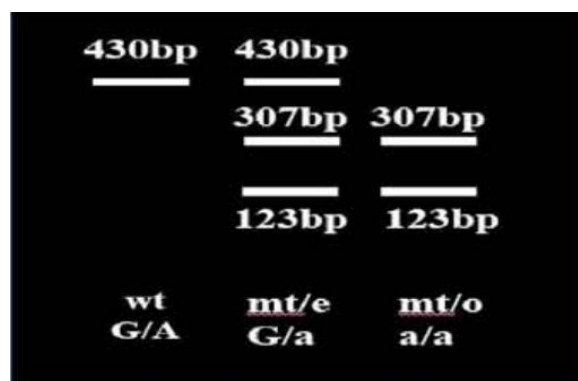
SfcI Mix (R753Q)
130 μl H ₂ O
30 μl 10X CutSmart Buffer
10μl SfcI

Για το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 9 μl SfcI mix και 6 μl PCR προϊόν. Έπειτα έγινε επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 4 ώρες ή κατά τη διάρκεια της νύχτας. Η αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει το ένζυμο και διασπά είναι η :



Έτσι τα θραύσματα που αναμένεται να δημιουργηθούν έπειτα από την πέψη είναι τα εξής:

PCR (bp)	WT (bp)	Heterozygote (bp)	Homozygote (bp)
430	430	430, 307, 123	307, 123



Εικόνα 22: Πρότυπο πέψης του πολυμορφισμού rs5743708.

TLR4 T399I→

Η διαδικασία της πέψης για τον πολυμορφισμό rs4986791 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ενζύμου *HinfI* από την εταιρεία New England Biolabs. Αρχικά κατασκευάστηκε *mix HinfI* σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

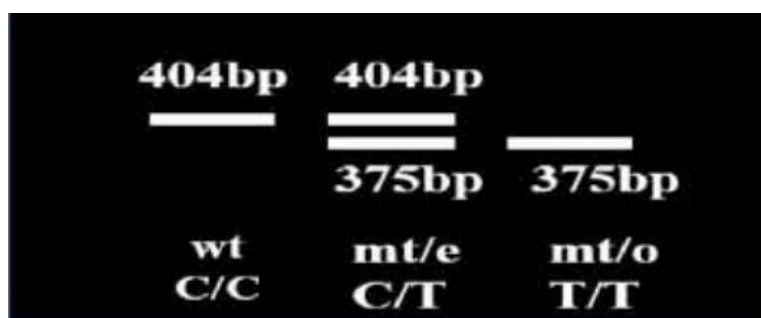
HinfI Mix (T399I)
150 µl H ₂ O
30 µl 10X CutSmart Buffer
5µl HinfI

Η επώαση και οι ποσότητες ήταν ακριβώς οι ίδιες όπως στον R753Q πολυμορφισμό. Η αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει το ένζυμο και διασπά είναι η:



Έτσι τα θραύσματα που αναμένεται να δημιουργηθούν έπειτα από την πέψη φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

T399I	PCR (bp)	WT (bp)	Heterozygote (bp)	Homozygote (bp)
	404	404	404, 375	375



Εικόνα 23: Πρότυπο πέψης του πολυμορφισμού rs4986791

TLR4 D299G→

Η διαδικασία της πέψης για τον πολυμορφισμό rs4986790 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ενζύμου NcoI από την εταιρεία New England Biolabs. Αρχικά κατασκευάστηκε mix NcoI σύμφωνα με το πρωτόκολλο:

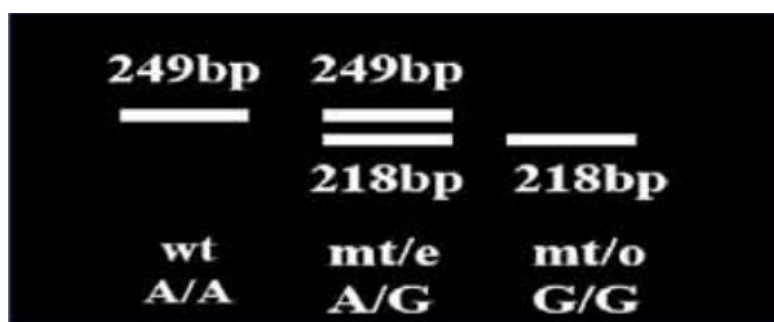
NcoI Mix (D299G)
150 µl H ₂ O
30 µl 10X CutSmart Buffer
5µl NcoI

Η επώαση και οι ποσότητες ήταν ακριβώς οι ίδιες όπως στους δύο παραπάνω πολυμορφισμούς. Η αλληλουχία την οποία αναγνωρίζει το ένζυμο και διασπάζεται είναι η:



Έτσι τα θραύσματα που αναμένεται να δημιουργηθούν έπειτα από την πέψη είναι τα εξής:

D299G	PCR (bp)	WT (bp)	Heterozygote (bp)	Homozygote (bp)
	249	249	249, 218	218



Εικόνα 24: Πρότυπο πέψης του πολυμορφισμού rs4986790

6.C.v Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 3%

Μετά το πέρας της πέψης, το επόμενο βήμα ήταν η ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη με σύσταση 3% , δηλαδή 3 γραμμάρια αγαρόζη, 100mL ρυθμιστικού διαλύματος 1X TBE και διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου με συγκέντρωση 5ng/mL.

Έγινε χρήση και των 15 μl από το δείγμα της πέψης αναμειγμένο με 5μl χρωστικής (loading buffer).

Μαζί με τα δείγματα φορτώθηκε και μάρτυρας γνωστού MB (ladder) αλλά και ένας αρνητικός μάρτυρας , δηλαδή ένα PCR προϊόν από τα δείγματα που δουλέψαμε. Ακόμη στα δείγματα που είχαν υποστεί πέψη προστέθηκε ένα δείγμα ακόμη ,το οποίο συνιστούσε τον θετικό μάρτυρα και ήταν επιβεβαιωμένα ετερόζυγο (δείγμα control).

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120V , 400 mA για 30 λεπτά για τον πολυμορφισμό R753Q και για 1 ώρα για τους πολυμορφισμούς T399I και D299G.

7.Αποτελέσματα

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό T399I του υποδοχέα TLR4 , στη μελέτη μας βρέθηκαν 12 άτομα τα οποία ήταν ετερόζυγα , 88 άτομα αγρίου τύπου, όμως κανένα άτομο το οποίο να έφερε τον πολυμορφισμό σε ομόζυγη μορφή.

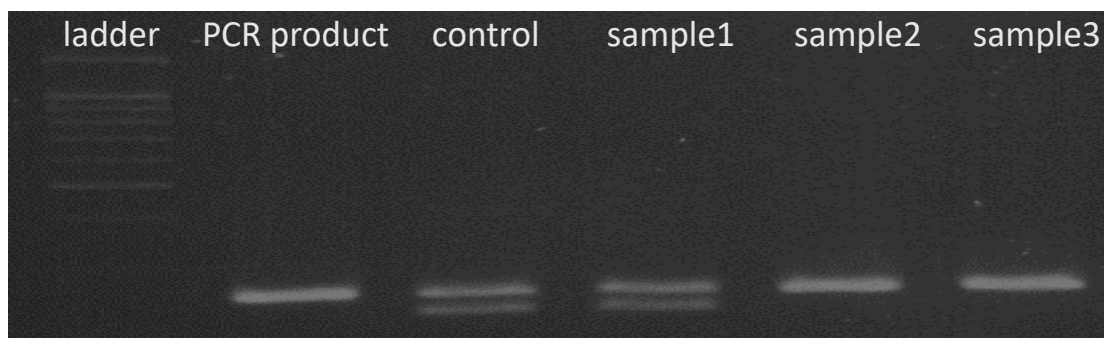
TLR4→T399I



Εικόνα 25: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs4986791

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό D299G , βρήκαμε 10 άτομα τα οποία ήταν ετερόζυγα , 90 άτομα αγρίου τύπου αλλά κανένα άτομο ομόζυγο.

TLR4→ D299G



Εικόνα 26: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs4986790

Στην έρευνά μας υπήρχε παράλληλη ύπαρξη των πολυμορφισμών T399I και D299G στα 10 άτομα από τα 12 που έφεραν τον T399I .

Κάτι αξιοσημείωτο ήταν ότι στην περίπτωση του R753Q του υποδοχέα TLR2 δεν βρέθηκε κανένα άτομο που να φέρει τον πολυμορφισμό ούτε σε ομόζυγη ούτε σε ετερόζυγη μορφή παρά μόνο βρέθηκαν αγρίου τύπου άτομα.

TLR2→ R753Q



Εικόνα 24: Ηλεκτροφόρηση πέψης του πολυμορφισμού rs5743708.

Επισημαίνουμε ότι όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν για απόκλιση από την ισοροπία Hardy-Weinberg.

T399I→

Γονότυπος	Σύνολο
CC (wt)	86
CT	12
TT	0

$$P_{\text{value T399I}} = 0,518526 > 0,05$$

D299G→

Γονότυπος	Σύνολο
AA (wt)	88
AG	10
GG	0

$$p_{\text{value D299G}} = 0,594566 > 0,05$$

Η συχνότητα αλληλίου που βρέθηκε από την μελέτη μας για τον πολυμορφισμό D299G ήταν 5,1% και για τον πολυμορφισμό T399I ήταν 6,1% και συνάδουν με το ποσοστό στον ευρωπαϊκό πληθυσμό .

Βρέθηκε επίσης ότι οι δυο αυτοί πολυμορφισμοί βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης , με τον T399I να υπάρχει σε δυο παραπάνω άτομα από ότι ο D299G.

Η ανάλυση έγινε μέσω του προγράμματος Wizard και με τη βοήθεια της δοκιμασίας χ^2 (Chi-square).

Τα άτομα τα οποία εμφάνισαν κατά την διάρκεια της θεραπείας τους παραπάνω από 5 λοιμώξεις ήταν 29 (28,42%) ενώ αυτά τα οποία εμφάνισαν λιγότερες από 5 ήταν 69 (67,62%). Όλα τα άτομα βρήκαν ίαση στις λοιμώξεις που προέκυψαν.

8.Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα μας λοιπόν, μπορούμε να προβούμε δε δυο πολύ σημαντικά συμπεράσματα.

Πρώτο συμπέρασμα αποτελεί το γεγονός ότι όσον αφορά τον πολυμορφισμό στον υποδοχέα TLR2 , ενώ σύμφωνα με την συχνότητα αλληλίου στον πληθυσμό θα έπρεπε να υπάρχει στο δείγμα μας ένα ποσοστό της τάξεως του 3% ετερόζυγων ατόμων, δεν βρέθηκε κανένα άτομο που να φέρει τουλάχιστον μια φορά τον πολυμορφισμό R753Q, παρά τις συσχετίσεις του πολυμορφισμού με την διαδικασία της καρκινογένεσης.

Δεύτερο συμπέρασμα μέσω της ανάλυσης των αποτελεσμάτων είναι ότι κανένας από τους ασθενείς που έπασχαν από λεμφώματα και ήταν ετερόζυγοι για τον πολυμορφισμό του T399I ,δεν προσβλήθηκε από περισσότερες από 5 λοιμώξεις κατά την διάρκεια της νοσηλείας/ θεραπείας του. Όσα άτομα εμφάνισαν περισσότερες από 5 λοιμώξεις ήταν όλα αγρίου τύπου δείγματα.

Σε μελέτη των (Noreen & Arshad, 2015) φαίνεται να συσχετίζεται η ύπαρξη των πολυμορφισμών T399I και D299G με ευαισθησία στην ανάπτυξη ελονοσίας , βρουκέλλωσης , τυφοειδούς πυρετού , λοιμώξεων από τον μύκητα Candida, φλεγμονών του στόματος (20).

Η μελέτη των (Liadaki et al., 2011) έδειξε την επιρρέπεια των ατόμων που φέρουν τον τους πολυμορφισμούς 299 και 399 του TLR4 στην εμφάνιση αμυγδαλίτιδας που οφείλεται στα βακτήρια *Streptococcus pyogenes* και *Haemophilus influenzae* (13).

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έρχονται σε αντιπαράθεση με τις έρευνες οι οποίες συσχετίζουν τους πολυμορφισμούς των TLRs με την επιρρέπεια σε λοιμώξεις . Αντι αυτού πιθανότατα οι πολυμορφισμοί να ασκούν κάποια προστατευτική δράση κυρίως στους παιδιατρικούς ασθενείς με λεμφώματα, παρόμοιο αποτέλεσμα με έρευνα που ανακαλύπτει τον προστατευτικό ρόλο των πολυμορφισμών έναντι της λοίμωξης από *Streptococcus pneumoniae*.

Τέλος, θα πρέπει να υπογραμμίσουμε το γεγονός ότι το μέγεθος των δειγμάτων που μελετήσαμε ήταν σχετικά μικρό και λόγω αυτού δεν μπορούμε να εξάγουμε ένα επαρκώς τεκμηριωμένο συμπέρασμα για την προστατευτική δράση των πολυμορφισμών αυτών. Για το λόγο αυτό περαιτέρω μελέτη με μεγαλύτερο δείγμα καθίσταται απαραίτητη.

9.Βιβλιογραφία

1. Juliusson, G., & Hough, R. (2016). Leukemia. *Progress in Tumor Research*, 43, 87–100. <https://doi.org/10.1159/000447076>
2. Devine, S. M., & Larson, R. A. (1994). Acute leukemia in adults: recent developments in diagnosis and treatment. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 44(6), 326–352. <https://doi.org/10.3322/canjclin.44.6.326>
3. Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(6), e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>
4. Seth, R., & Singh, A. (2015). Leukemias in Children. *Indian Journal of Pediatrics*, 82(9), 817–824. <https://doi.org/10.1007/s12098-015-1695-5>
5. Matasar, M. J., & Zelenetz, A. D. (2008). Overview of Lymphoma Diagnosis and Management. *Radiologic Clinics of North America*, 46(2), 175–198. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2008.03.005>
6. Mauz-Körholz, C., Ströter, N., Baumann, J., Botzen, A., Körholz, K., & Körholz, D. (2018). Pharmacotherapeutic Management of Pediatric Lymphoma. *Pediatric Drugs*, 20(1), 43–57. <https://doi.org/10.1007/s40272-017-0265-x>
7. Mauz-Körholz, C., Metzger, M. L., Kelly, K. M., Schwartz, C. L., Castellanos, M. E., Dieckmann, K., Kluge, R., & Körholz, D. (2015). Pediatric hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(27), 2975–2985. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4853>
8. Allen, C. E., Kelly, K. M., & Bollard, C. M. (2015). Pediatric lymphomas and histiocytic disorders of childhood. *Pediatric Clinics of North America*, 62(1), 139–165. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2014.09.010>
9. Speletas, M., Kalala, F., Mitroulis, I., Papadopoulos, V., Merentiti, V., Germanis, A. E., & Ritis, K. (2009). TLR2 and TLR4 polymorphisms in familial Mediterranean fever. *Human Immunology*, 70(9), 750–753. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.05.004>
10. Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 816–825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>

11. Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., & Wetzler, L. M. (2012). The role of TLR2 in infection and immunity. *Frontiers in Immunology*, 3(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079>
12. Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5(10), 987–995. <https://doi.org/10.1038/ni1112>
13. Liadaki, K., Petinaki, E., Skoulakis, C., Tsirevelou, P., Klapsa, D., Germanis, A. E., & Speletas, M. (2011). Toll-like receptor 4 gene (TLR4), but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to streptococcus pyogenes and haemophilus influenzae. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(2), 217–222. <https://doi.org/10.1128/CVI.00460-10>
14. Speletas, M., Merentiti, V., Kostikas, K., Liadaki, K., Minas, M., Gourgoulisanis, K., & Germanis, A. E. (2009). Association of TLR4-T399I polymorphism with chronic obstructive pulmonary disease in smokers. *Clinical and Developmental Immunology*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/260286>
15. Takeda, K., & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 16(1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2003.10.003>
16. Slomiany, B. L., & Slomiany, A. (2018). Proinflammatory Signaling Cascades of Periodontopathic Oral Pathogen <i>Porphyromonas gingivalis</i>. *Journal of Biosciences and Medicines*, 06(05), 63–88. <https://doi.org/10.4236/jbm.2018.65009>
17. Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y., & Wang, R. F. (2022). Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Frontiers in Immunology*, 13(March), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>
18. Long, H., O'Connor, B. P., Zemans, R. L., Zhou, X., Yang, I. V., & Schwartz, D. A. (2014). The Toll-Like Receptor 4 polymorphism Asp299Gly but not Thr399Ile influences TLR4 signaling and function. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093550>

19. Hawn, T. R., Scholes, D., Li, S. S., Wang, H., Yang, Y., Roberts, P. L., Stapleton, A. E., Janer, M., Aderem, A., Stamm, W. E., Zhao, L. P., & Hooton, T. M. (2009). Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women. *PLoS ONE*, 4(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005990>

20. Noreen, M., & Arshad, M. (2015). Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunologic Research*, 62(2), 234–252. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8640-6>

21. Georgopoulos, K. (2009). Acute Lymphoblastic Leukemia – On the Wings of IKAROS. *New England Journal of Medicine*, 360(5), 524–526. <https://doi.org/10.1056/nejme0809819>

22. Arlaud, G. J. (2002). Structural biology of C1. *Biochemical Society Transactions*, 30(5), A98–A98. <https://doi.org/10.1042/bst030a098b>

23. O’Neill, L. A. J., Hennessy, E. J., & Parker, A. E. (2010). Targeting Toll-like receptors: Emerging therapeutics? *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(4), 293–307. <https://doi.org/10.1038/nrd3203>

24. Liu, B., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Silverman, N., & Pan, D. (2016). Toll Receptor-Mediated Hippo Signaling Controls Innate Immunity in *Drosophila*. *Cell*, 164(3), 406–419. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.029>

25. Maeshima, N., & Fernandez, R. C. (2013). Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(FEB), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00003>

26. Krishnan, J., Selvarajoo, K., Tsuchiya, M., Lee, G., & Choi, S. (2007). Toll-like receptor signal transduction. *Experimental and Molecular Medicine*, 39(4), 421–438. <https://doi.org/10.1038/emm.2007.47>

27. Manavalan, B., Basith, S., & Choi, S. (2011). Similar structures but different roles-an updated perspective on TLR structures. *Frontiers in Physiology*, JUL(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00041>

28. Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K., & Kwiatkowska, K. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(3), 557–581. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1762-5>
29. Kabelitz, D. (2007). Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 19(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.11.007>