

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra biologických a lékařských věd**

**TOLL-LIKE RECEPTORY PŘI BAKTERIÁLNÍCH INFEKČÍCH**

TOLL-LIKE RECEPTORS IN BACTERIAL INFECTIONS

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.

Konzultant diplomové práce: Doc. Ing. Bc. Igor Šplíchal, CSc.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum:

Podpis:

Ráda bych poděkovala doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za příjemnou spolupráci a ochotu a konzultantovi doc. Ing. Bc. Igoru Šplíchalovi, CSc. za cenné rady a podnětné připomínky při psaní této práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Věře Slavíkové a ostatním pracovníkům Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Novém Hrádku. Dále děkuji rodině a přátelům za podporu a trpělivost.

Výzkumný záměr Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. RVO:61388971 a granty Grantové agentury České republiky 524-09-0365, 13-14736S a 13-08803S.

## **Abstrakt**

Bc. Barbora Svobodová

Toll-like receptory při bakteriálních infekcích

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Odborný pracovník v laboratorních metodách

Cíl práce: Stanovení aktivace a exprese toll-like receptorů 2, 4, 5 a 9 pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase a western blottingem (WB). Zavedení metody WB na pracovišti Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Novém Hrádku.

Metody: 1) Optimalizace metody WB – extrakce proteinů, měření koncentrace proteinů, elektroforéza, western blotting, imunodetekce proteinů. 2) 4 skupiny gnotobiotických selat: kontrolní bezmikrobní skupina (GF), skupina infikovaná bakterií *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium kmen LT2 (LT2), skupina infikovaná kmenem *Escherichia coli* O55 (O55) a skupina kolonizovaná *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). 3) Real-time PCR - izolace celkové RNA, spektrofotometrické stanovení koncentrace a odhad čistoty RNA, syntéza cDNA, real-time PCR, normalizace a relativizace dat z real-time PCR.

Výsledky: Optimalizovali jsme WB detekci TLR5 v tkáňových homogenátech ilea a mezenterálních lymfatických uzlin. Otestovali jsme protilátky proti prasečím TLR2, 4 a 9. V ileu skupiny EcN byla zvýšena exprese mRNA TLR5 a TLR9. U skupiny O55 nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v expresi sledovaných TLRs oproti GF skupině. U skupiny LT2 byla zvýšena hodnota exprese TLR2, 4 a 5 v mezenterálních lymfatických uzlinách.

Závěr: Zhodnotili jsme různé přípravy tkáňových homogenátů pro přípravu supernatantů vhodných pro WB. Stanovením exprese TLR2, 4, 5 a 9 na úrovni mRNA jsme dokumentovali změny exprese vybraných TLRs v imunologicky exponovaném ileu a mezenterálních lymfatických uzlinách po kolonizaci/infekci bezmikrobních selat probiotickou bakterií nebo střevními patogeny. Stanovení TLRs na úrovni genového přepisu a na úrovni proteinu nám mohou umožnit získat dobrou představu o regulaci a funkci TLRs.

## **Abstract**

Bc. Barbora Svobodová

Toll-like receptors in bacterial infections.

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Medical Laboratory Technician

Aim: The aim of this diploma thesis was to determine the expression and the activation of the toll-like receptors (TLRs) 2, 4, 5 and 9 in bacterial infections by reverse transcription by real time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and by Western blotting (WB). Another aim was to introduce detection of TLRs in a pig by WB in the Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i. in Nový Hrádek.

Methods: 1) Optimization of WB – extraction of proteins, protein quantification, electrophoresis, Western blotting, immunodetection of proteins. 2) Four groups of one-week-old gnotobiotic piglets: germfree as a control (GF), piglets infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain LT2 (LT2), piglets infected with *Escherichia coli* O55 (O55) and piglets colonized with *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). 3) RT-qPCR - purification of a total RNA, spectrophotometric RNA quantification and estimation of purity, synthesis of cDNA, RT-qPCR, normalization and relativization of real-time PCR data.

Results: WB analysis of TLR5 in the piglet ileum and mesenteric lymph nodes was optimized. Antibodies against TLR2, 4 and 9 were tested. The mRNA expression of TLR5 and 9 was increased in the piglet ileum of EcN group. There were no significant differences in the TLRs expression between the group O55 and the group GF. The expression of TLR2, 4 and 5 was increased in mesenteric lymph nodes of group LT2.

Conclusion: Different ways of sample preparation for WB were evaluated. The expression of mRNA of TLR2, 4, 5 and 9 in piglet ileum and mesenteric lymph nodes after colonization/infection of germ-free piglets with probiotic bacteria or intestinal pathogens were described. The detection of gene message and protein expression of TLRs make possible good imagination dealing with a regulation and function of TLRs.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	9
2.1	Toll-like receptory .....	9
2.1.1	Ligandy pro TLRs .....	10
2.1.1.1	TLR2 .....	11
2.1.1.2	TLR4 .....	11
2.1.1.3	TLR5 .....	12
2.1.1.4	TLR9 .....	14
2.1.2	Struktury podílející se na TLR signalizaci .....	15
2.1.2.1	MyD88 .....	15
2.1.2.2	TIRAP/MAL.....	15
2.1.2.3	TRIF.....	16
2.1.2.4	TRAM .....	16
2.1.2.5	IRAKs.....	17
2.1.2.6	TRAF6.....	17
2.1.2.7	TAK1 a TABs .....	19
2.1.2.8	IKK komplex .....	19
2.1.2.9	Inhibiční proteiny I $\kappa$ B .....	20
2.1.2.10	Rodina proteinů NF- $\kappa$ B.....	20
2.1.2.11	IRFs .....	21
2.1.3	Signální dráhy aktivovaných TLRs .....	21
2.1.3.1	Signální kaskáda závislá na MyD88 .....	21
2.1.3.2	Signální kaskáda závislá na TRIF.....	22
2.2	Exprese TLRs a následky jejich aktivace .....	25

2.2.1	TLR2.....	25
2.2.2	TLR4.....	26
2.2.3	TLR5.....	26
2.2.4	TLR9.....	27
2.3	Bakteriální kmeny.....	28
2.3.1	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 .....	28
2.3.2	<i>Escherichia coli</i> O55.....	28
2.3.3	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhimurium .....	28
2.4	Prasečí gnotobiotický model.....	30
3	ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE .....	32
4	MATERIÁL A METODY .....	33
4.1	Odchov gnotobiotických selat.....	33
4.2	Western blotting .....	34
4.2.1	Extrakce proteinů.....	34
4.2.1.1	Tkáň v mrazícím médiu TissueTek .....	34
4.2.1.2	Buňky IPEC-J2.....	34
4.2.1.3	Hlubokozmrazená tkáň.....	35
4.2.2	Měření koncentrace proteinů .....	35
4.2.3	Příprava vzorků pro elektroforézu .....	36
4.2.4	Elektroforéza.....	36
4.2.5	Western blotting.....	36
4.2.6	Imunodetekce proteinů.....	37
4.3	Real-time kvantitativní PCR .....	39
4.3.1	Izolace celkové RNA .....	39
4.3.2	Měření čistoty a koncentrace RNA .....	41
4.3.3	Syntéza cDNA.....	41

4.3.4	Real-time qPCR .....	42
4.4	Statistická analýza .....	43
4.5	Další přístroje, pomůcky a software .....	43
5	VÝSLEDKY .....	44
5.1	Western blotting .....	44
5.1.1	Extrakce proteinů z kryožezů .....	44
5.1.2	Extrakce proteinů z IPEC-J2 buněk.....	46
5.1.3	Extrakce proteinů z hlubokozmrazených tkání.....	47
Optimalizace podmínek WB pro TLR2, TLR4 a TLR9 .....	48	
5.1.3.1	Různé koncentrace primárních protilátek.....	48
5.1.3.2	Různé blokační podmínky.....	49
5.1.3.3	Změna ředícího roztoku primárních protilátek .....	50
5.1.3.4	Změna primárních protilátek.....	50
5.2	RT - qPCR.....	53
5.2.1	Izolace celkové RNA a syntéza cDNA .....	53
5.2.2	Real-time PCR .....	54
6	DISKUSE.....	62
7	ZÁVĚR.....	67
8	LITERATURA.....	71



## 1 ÚVOD

Nás organismus je vystaven neustálé přítomnosti mikroorganismů a v případě průniku přes mechanické bariéry je s nimi nucen bojovat. Nástrojem pro rozpoznání cizích a nebezpečných struktur je imunitní systém, jehož úkolem je nejen rozpoznávat struktury, ale také aktivovat rychlou obrannou reakci.

Jedním z mechanismů odhalení patogenních mikroorganismů jsou TLRs (toll-like receptory). Jedná se o bílkovinné molekuly, které patří do skupiny PRRs (pattern-recognition receptors, receptory rozpoznávající molekulární vzory). TLRs rozeznávají PAMPs (pathogen-associated molecular patterns, molekulární vzorky spojené s patogenitou) a DAMPs (damage-associated molecular patterns, molekulární vzory signalizující poškození).

TLRs jsou evolučně velmi konzervativní molekuly svou strukturou i funkcí (Leulier and Lemaitre, 2008). Strukturálně podobné proteiny byly nalezeny i u jednobuněčných organismů (Chen et al., 2007).

Lidské TLRs byly poprvé popsány v roce 1997 jako homology Toll proteinu u hmyzu *Drosophila melanogaster* (Medzhitov et al., 1997). Hmyzí Toll protein je součástí signální dráhy řídící expresi genu pro antifungální peptid (Lemaitre et al., 1996).

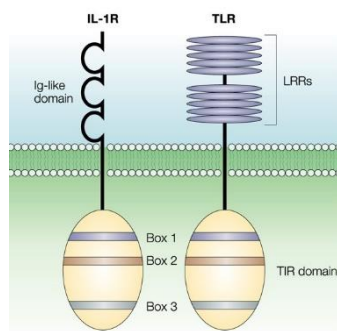
Aktivace TLRs spouští signalizační kaskády vedoucí k aktivaci exprese genů důležitých pro správné fungování imunitního systému.

Cílem této diplomové práce bylo pokusit se zavést metodu Western blotting prasečích proteinů TLR 2, 4, 5 a 9. Dalším cílem bylo stanovit expresi vybraných TLRs pomocí metod real-time PCR a western blotting po infekci bakteriemi *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium kmen LT2 nebo *Escherichia coli* O55 nebo kolonizaci probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917. Získané hodnoty jsme porovnali s hodnotami získanými u bezmikrobních selat.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Toll-like receptory

TLRs tvoří rodinu transmembránových receptorů I. typu, která je charakteristická extracelulární doménou bohatou na LRRs (leucine-rich repeats, leucinové repetice) a intracelulární TIR (Toll/Interleukin-1 receptor) doménou (Obrázek 1) (Medzhitov et al., 1997).



**Obrázek 1: Struktura TLR.** Extracelulární část bohatá na leucinové repetice a intracelulární část s TIR doménou (Akira and Takeda, 2004).

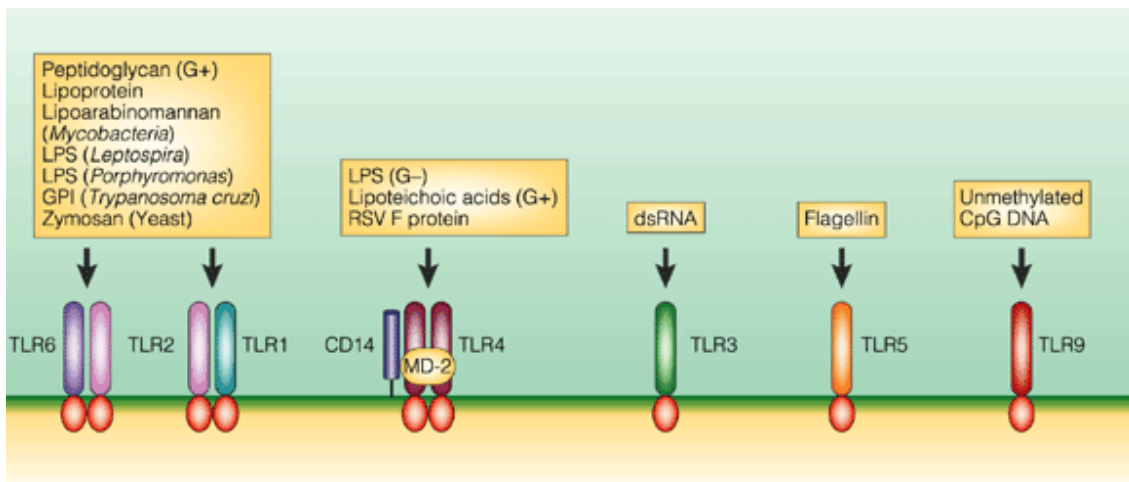
Podle své buněčné lokalizace se tato rodina dělí na dvě podrodiny. První z nich je složená z TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 a TLR6, nachází se na buněčném povrchu a rozpoznává především části mikrobiálních membrán. Druhá skupina se nachází výhradně v intracelulárním prostoru, například v endoplasmatickém retikulu, endozomech, lysozomech a endolysozomech, kde váží mikrobiální nukleové kyseliny. Zástupci této skupinou jsou TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9.

TLRs mají dvě hlavní signální dráhy. První z nich je závislá na MyD88 (myeloid differentiation primary response protein) a vede k aktivaci NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, jaderný faktor  $\kappa$ B) a je důležitá pro tvorbu prozánětlivých cytokinů. Druhá dráha je závislá na TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) a indukuje opožděnou aktivaci NF- $\kappa$ B a produkci IFNs (interferony) (Akashi-Takamura and Miyake, 2006; Yamamoto et al., 2003).

V této práci se zaměřujeme na TLR2, 4, 5 a 9.

### 2.1.1 Ligandy pro TLRs

TLRs jsou aktivovány díky interakci extracelulární části jejich molekuly s PAMPs. TLRs rozpoznávají širokou škálu molekulových struktur, které jsou konzervativní a charakteristické mnohdy pro celé skupiny mikroorganismů jako je LPS (lipopolisacharid) gramnegativních bakterií nebo nemetylované CpG (cytidine-phosphate-guanosine, cytidin-fosfát-guanosin) dinukleotidy typické pro DNA bakterií a virů (Hemmi et al., 2000; Medzhitov et al., 1997). Mechanismus samotného rozpoznání je stále nejasný, předpokládá se však, že důležitou roli hrají LRRs motivy. Základní LRR motiv obsahuje 24 aminokyselin, které vytváření struktury  $\beta$ -skládaných listů a  $\alpha$ -helixů. TLRs mají ve své extracelulární části unikátní motiv  $xLxxLxLxx(N/L)x+xx+xxxxFxxLx$  ( $x$  = jakákoliv aminokyselina,  $+$  = hydrofobní aminokyselina,  $L$  = leucin,  $N$  = asparagin,  $F$  = fenylalanin). Jednotlivé TLRs se od sebe liší inzercemi po 10. nebo 15. repetici, což je pravděpodobně příčinou ligandové specifity (Bell et al., 2003). Hlavní ligandy pro jednotlivé TLRs ukazuje Obrázek 2.



**Obrázek 2: Ligandy pro TLRs.** Ligandem pro TLR2 je peptidoglykan grampozitivních bakterií, lipoprotein, mykobakteriální lipoarabinomannan, LPS produkovaný rody *Leptospira* a *Porphyromonas*, GPI (glykosylfosfatidylinositolová kotva) z prvoka *Trypanosoma cruzi* a zymosan. Ligandem pro TLR4 je LPS gramnegativních bakterií, lipoteichoová kyselina grampozitivních bakterií a F protein RSV (respirační syncytiální virus). Flagelin je hlavní ligand pro TLR5 a nemetylované CpG dinukleotidy pro TLR9 (Medzhitov, 2001).

#### 2.1.1.1 TLR2

TLR2 se účastní rozpoznání širokého množství PAMPs z bakterií, hub, parazitů a virů (Akira et al., 2001), funguje jako heterodimer s TLR1 (Wyllie et al., 2000) nebo TLR6 (Ozinsky et al., 2000; Takeuchi et al., 2001).

Heterodimer TLR1/TLR2 rozpoznává velkou škálu bakteriálních lipoproteinů včetně mykobakteriálního lipopeptidu o velikosti 19 kDa (Takeuchi et al., 2002) a meningokokových lipoproteinů (Wyllie et al., 2000). TLR6/TLR2 heterodimery rozpoznávají mykoplazmatické lipoproteiny (Takeuchi et al., 2001) a peptidoglykany (Imler and Hoffmann, 2001). Existuje několik dalších ligandů, které vyvolávají imunitní odpověď závislou na TLR2, ale nevyžadují přítomnost dimeru s TLR1 ani TLR6, což naznačuje možnost tvorby dimerů s dalšími TLRs nebo jinými molekulami (Wetzler, 2003), protože TLR2 nefunguje jako homodimer (Ozinsky et al., 2000). Těmito ligandy jsou například lipoteichoová kyselina (která je také ligandem pro TLR4) (Schwandner et al., 1999), mykobakteriální lipoarabinomannan (Means et al., 1999), LPS produkované rody *Legionella* (Girard et al., 2003), *Leptospira* (Werts et al., 2001) *Porphyromonas* (Hirschfeld et al., 2001), *Bordetella* (Girard et al., 2003) a poriny přítomné ve vnější membráně rodu *Neisseria* (Massari et al., 2002). Mimo bakteriální PAMPs rozpoznává TLR2 i molekuly charakteristické pro houby (zymosan – směs glukánů, mannanů, proteinů, chininu a glykolipidů extrahovaných z buněčné membrány hub) (Kataoka et al., 2002; Underhill et al., 1999) a parazity (glykosylfosfatidylinositolová kotva a glykoinositolfosfolipidy z *Trypanosoma cruzi*) (Campos et al., 2001). Mezi rozpoznávání DAMPs patří heat shock protein 60 (Vabulas et al., 2001).

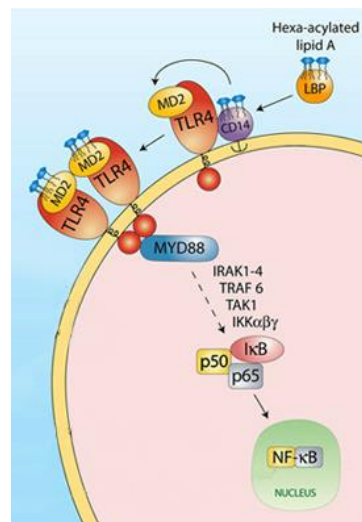
Za jeden z TLR2 ligandů byl původně považován i LPS z *E. coli* (Kirschning et al., 1998), avšak následně bylo zjištěno, že ligandem byl bakteriální lipoprotein, který byl obsažen v použitém LPS (Hirschfeld et al., 2000). LPS je však ligandem pro TLR4 (Heine et al., 1999).

#### 2.1.1.2 TLR4

Nejvíce studovaným ligandem pro TLR4 je již zmíněný LPS, což je glykolipidová složka vnější membrány gramnegativních bakterií (Ulevitch and Tobias, 1995; West et al., 2006). Lipidová část LPS zodpovědná za patogenitu - lipid A je také samostatným ligandem (Obrázek 3) (Lien et al., 2000). TLR4 vytváří na buněčném povrchu komplex

s MD2 (myeloid differentiation protein). I nepatrné množství LPS uvolněné z gramnegativní bakterie se naváže na LPS vázající protein, který se váže na protein CD14, který je přichycený na buněčném povrchu a doručuje LPS k TLR4-MD2 komplexu, čímž dojde k oligomerizaci TLR4 (Poltorak et al., 1998; Shimazu et al., 1999; Teghanemt et al., 2005).

Dalšími ligandy jsou například taxol (rostlinný diterpen) (Perera et al., 2001), polysacharidové pouzdro *Cryptococcus neoformans* (Shoham et al., 2001), protein F respiračního syncytiálního viru (Kurt-Jones et al., 2000).



**Obrázek 3: Lipid A jako ligand TLR2.** Lipid A se naváže na LBS (LPS binding protein), který zprostředkuje přenos lipidu A na protein CD14, který je přichycený na buněčném povrchu a předává lipid A do TLR4-MD2 komplexu, čímž dojde k oligomerizaci TLR4. Upraveno (2007).

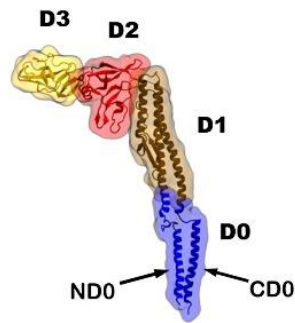
### 2.1.1.3 TLR5

TLR5 rozpoznává molekulu flagelinu, což je protein nacházející se v bičících některých gramnegativních i grampozitivních bakterií. Bičík je virulentní faktor, který usnadňuje kolonizaci hostitele a přispívá k invazivitě (Smith et al., 2003).

Bakteriální bičík je tvořen filamentem, které je složeno z 11 protofilament skládajících se z flagelinových monomerů (Samatey et al., 2001; Yonekura et al., 2003). Analýza krystalické struktury flagelinu bakterie rodu *Salmonella* ukázala, že tato molekula je složena z N- a C- koncových  $\alpha$ -helixových řetězců (ND0, CD0), centrálního  $\alpha$ -

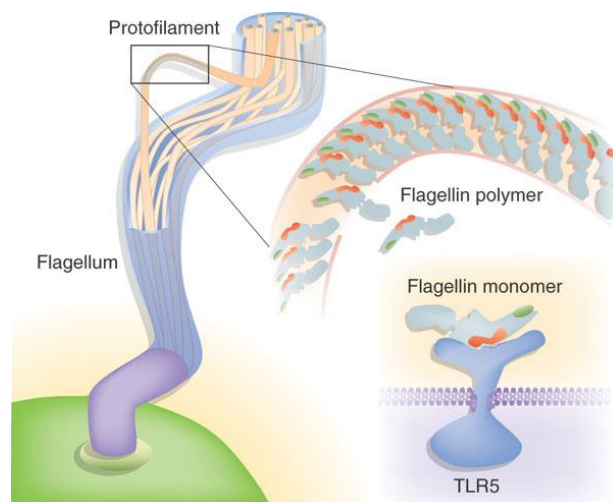
helixového řetězce (D1) a hypervariabilní centrální oblast D2 a D3 s  $\beta$ -skládanými listy (Obrázek 4) (Yonekura et al., 2003; Yoon et al., 2012).

Tyto domény mají globulární charakter a D0 a D1 jsou konzervativní napříč různými bakteriálními druhy (Hayashi et al., 2001). Protofilamenta se navzájem spojují díky intermolekulárním kontaktům mezi D1 doménami konkávních a konvexních povrchů přilehlých monomerů (Samatey et al., 2001; Yonekura et al., 2003).



**Obrázek 4: Struktura flagelinu.** Molekula flagelinu se skládá ze čtyř základních domén: D0 (modrá), D1 (hnědá), D2 (červená) a D3 (žlutá) (Tanner et al., 2011).

TLR5 rozpoznává úsek 13 aminokyselin centrální D1 domény flagelinové molekuly, která je nezbytná pro komplementaci flagelárních protofilament, a tím pro pohyblivost bakterií. Tato rozpoznávaná část se běžně nachází skryta ve filamentu, což vysvětluje, proč TLR5 reaguje pouze s monomerním flagelinem (Obrázek 55) (Smith et al., 2003).



**Obrázek 5: Vazba monomeru flagelinu na TLR5.** Bičíková protofilamenta jsou složena z monomerů flagelinu, které spolu interagují svými konkávními (zelená) a konvexními (červená) povrchy D1 domény. TLR5 rozpoznává monomery flagelinu (Reichhart, 2003).

#### 2.1.1.4 TLR9

TLR9 je zástupcem receptorů nacházejících se výhradně intracelulárně v endosomálních kompartmentech a endoplazmatickém retikulu (Latz et al., 2004).

TLR9 je aktivován DNA bohatou na nemetylované CpG dinukleotidové motivy. Savčí DNA příliš těchto motivů neobsahuje a většina z nich je metylována, takže tato DNA nevyvolá imunitní odpověď. Nemetylované CpG dinukleotidy jsou však typické pro DNA bakterií a virů (Hemmi et al., 2000; Lund et al., 2003).

Protože se TLR9 nachází intracelulárně, rozpoznává pouze DNA, která se endosomem dostane do buňky. Zde je kyselé a redukční prostředí, ve kterém je dvouvláknová DNA degradována na jednovláknové menší úseky, které svými CpG motivy reagují s TLR9, jehož TIR doména směřuje do cytoplazmy buňky (Ahmad-Nejad et al., 2002; Latz et al., 2004).

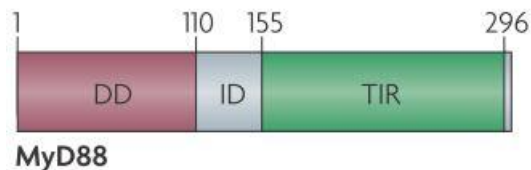
### 2.1.2 Struktury podílející se na TLR signalizaci

Po navázání ligandu dochází k dimerizaci TLRs a konformačním změnám jejich TIR domén, které jsou nezbytné pro předání signálu dalším molekulám. Tyto molekuly zahrnují adaptorové proteiny, kinázy, inhibiční proteiny a transkripční faktory.

#### 2.1.2.1 MyD88

MyD88 je adaptorový protein, jehož molekula obsahuje N-koncovou DD (death doména) a C-koncovou TIR doménu, která se skládá z přibližně 140 aminokyselin (Bonnert et al., 1997). Tato doména byla původně popsána na základě homologie s cytoplazmatickou signální oblastí TLR4 (Burns et al., 1998) a právě tato oblast interaguje s TIR doménou TLR (Bonnert et al., 1997; Burns et al., 1998). Death a TIR domény jsou spojeny krátkou ID (intermediální doména) tvořenou přibližně 45 aminokyselinami (Bonnert et al., 1997).

MyD88 se účastní signalizace spuštěné všemi TLRs kromě TLR3 (Akira et al., 2006). Na TLR2 a 4 se MyD88 váže za pomoci TIRAP/MAL (Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like)(Horng et al., 2002).



**Obrázek 6: Struktura molekuly MyD88.** C-koncová TIR doména, N-koncová death doména a intermediální doména (O'Neill and Bowie, 2007).

#### 2.1.2.2 TIRAP/MAL

TIRAP/MAL je adaptorový protein účastnící se TLR2 a TLR4 signalizační kaskády. Stejně jako ostatní adaptorové proteiny obsahuje ve své molekule TIR doménu, navíc má však doménu vázající PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), pomocí které je TIRAP vázán na plazmatickou membránu (Horng et al., 2001; Kagan and Medzhitov, 2006; McLaughlin et al., 2002).

MyD88 a TIRAP mají v signalizační kaskádě rozdílné úlohy. MyD88 je protein nezbytný pro přenos signálu z ligandem aktivovaného TLR na další signální proteiny, čímž

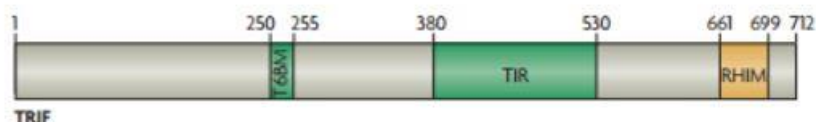


iniciuje signalizační kaskádu, zatímco funkcí TIRAP je prostorové určení této interakce mezi MyD88 a TLR4 na plazmatické membráně (Kagan and Medzhitov, 2006).

TIRAP je nejpolymorfnější adaptorový protein v TLR signalizaci, má 8 různých jednonukleotidových polymorfismů v kódující oblasti jeho genu (Nagpal et al., 2009).

### 2.1.2.3 TRIF

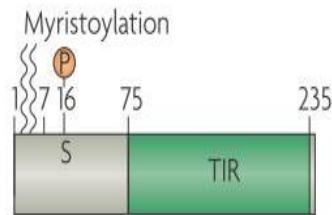
Molekula TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) byla objevena díky studii TIRAP-deficitních myší (Yamamoto et al., 2002). Stejný protein byl ale nezávisle identifikován metodou two-hybrid screen a byl nazván TICAM1 (TIR domain-containing adapter molecule 1) (Oshiumi et al., 2003a). TRIF má ve své molekule TB6M (Tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6 (TRAF6)-binding motif) (McWhirter et al., 2004) a RHIM (receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif) – viz **Obrázek 7** (Gohda et al., 2004).



**Obrázek 7: Schématické zobrazení molekuly TRIF.** TRIF obsahuje TIR doménu a motivy T6BM a RHIM (O'Neill and Bowie, 2007).

### 2.1.2.4 TRAM

TRAM (TRIF-related adapter molecule) je molekula zprostředkovávající vazbu mezi TRIF a TLR4 (Fitzgerald et al., 2003b; Oshiumi et al., 2003b). Má stejnou funkci jako MAL a i tento adaptorový protein je přichycen k membráně, avšak pomocí myristylovaného N-konce jeho molekuly (McGettrick et al., 2006; Oshiumi et al., 2003b; Rowe et al., 2006). Myristylace je typ modifikace proteinu, při kterém je zbytek nasycené mastné kyseliny myristové kovalentně navázán na  $\alpha$ -amino skupinu N-koncového glycinu proteinu. Druhou významnou modifikací je fosforylace serinu na pozici 16, který je velmi blízko místu myristylace (McGettrick et al., 2006).



**Obrázek 8: Schématické zobrazení molekuly TRAM.** V molekule TRAM se nachází TIR doména, její N-konec je myristylován a serin na pozici 16 je fosforylován (O'Neill and Bowie, 2007).

#### 2.1.2.5 IRAKs

IRAKs (Interleukin-1 receptor-associated kinases) patří do skupiny serin/threonin kináz. U savců byly nalezeny 4 zástupci IRAKs: IRAK1, IRAK2, IRAK4 a IRAK-M (správně IRAK-3) (Janssens and Beyaert, 2003). Jejich molekuly se skládají z konzervativní N-koncové DD a centrální kinázové domény (Kollewe et al., 2004). Kinázové domény mají 12 oblastí typických pro všechny serin/threonin kinázové domény (Johnson et al., 1996). U všech typů IRAKs se v kinázové oblasti II nachází místo s lysinem pro navázání ATP. V pouze kinázová oblast VIb u IRAK-1 a IRAK-4 obsahuje funkční katalytické místo s asparátem. IRAK-2 a IRAK-M mají v tomto místě asparagin nebo serin, což činí tuto oblast katalyticky neaktivní (Wesche et al., 1999).

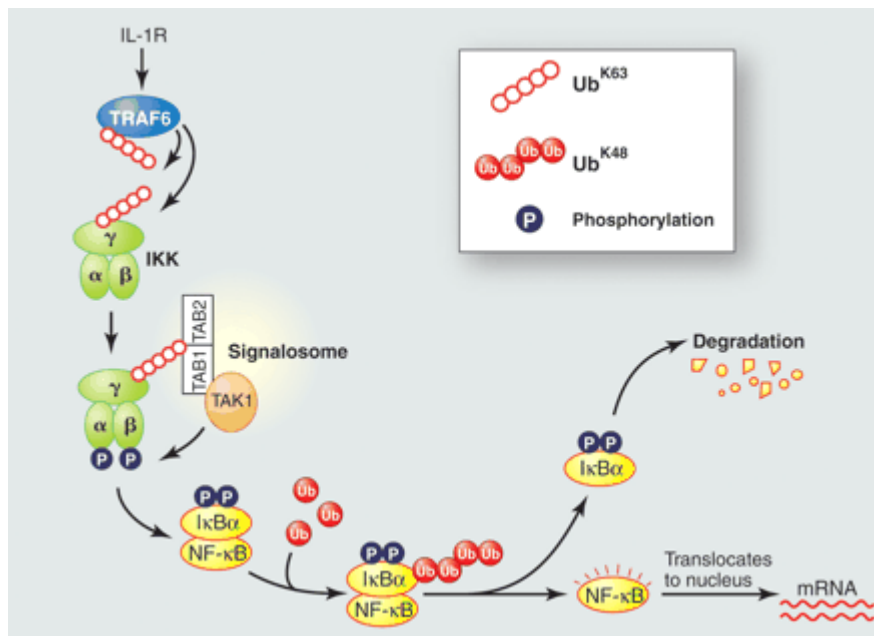
U IRAK1, IRAK2 a IRAK-M byla nalezena sekvence Pro-X-Glu-X-X (Pro = prolin, Glu = glutamátová kyselina, X = libovolná aminokyselina), na kterou se váže TRAF6 (Tumor necrosis factor (TNF) receptor associated factor 6) (Ye et al., 2002).

#### 2.1.2.6 TRAF6

TRAFs jsou evolučně konzervativní skupinou adaptorových proteinů (Bradley and Pober, 2001). Jejich molekuly jsou charakteristické přítomností N-koncové domény (nazývané TRAF-N) s terciálním prostorovým uspořádáním „coiled coil“, ve kterém jsou levotočivé  $\alpha$ -helixové proteiny spleteny dohromady, čímž vytváření spirálu připomínají strukturu provazu (Mason and Arndt, 2004; Yang et al., 2004). Tato doména také obsahuje strukturní motiv typu zinkového prstu – RING (really interesting new gene) finger, který díky prostorovému uspořádání vytváří vazebná místa pro dva kationty zinku (Borden and Freemont, 1996; Wong et al., 1998). RING finger je důležitý pro katalýzu syntézy unikátního polyubikvitinového řetězce (Deng et al., 2000; Wang et al., 2001).

Polyubikvitinace je vazba molekul globulárního proteinu Ub (ubikvitin) na cílový protein, čímž je regulována jeho aktivita nebo stabilita (Ben-Neriah, 2002). Proces ubikvitinace je zprostředkován enzymatickou kaskádou složenou z aktivačního enzymu E1, konjugačního enzymu E2 a ligačního enzymu E3, který spojí Ub s cílovým proteinem. Ub je nejprve aktivován enzymem E1 a za přítomnosti ATP vytváří makroergickou vazbu. Aktivovaný Ub je potom přenesen na E2, který se spojí s komplexem E3-cílový protein. Vzniká komplex E2-E3-Ub-cílový protein a Ub je navázán přes glycin na  $\epsilon$ -amino skupinu lyzinu cílového proteinu, čímž mezi nimi vznikne isopeptidová vazba (vazba mezi karboxylem a jinou než  $\alpha$ -amino- skupinou) (Laney and Hochstrasser, 1999).

Konjugovaný Ub je následně sám ubikvitován přes jednu z jeho 7 lyzinových aminokyselin a vytváří se tím polyubikvitinovaný řetězec. Byly popsány dva hlavní typy polyubikvitinovaný řetězců. V prvním typu je Ub navázán přes lyzin na 48. pozici aminokyselinového řetězce jednoho Ub a karboxylový konec následujícího Ub (K-48 řetězec). Takto modifikované proteiny jsou rozpoznány proteazomem a jsou degradovány (Chau et al., 1989). Druhou formou je připojení Ub na lyzin v 63. pozici (K-63 řetězec) (Deng et al., 2000).



**Obrázek 9: K-63 a K-48 polyubikvitinace v signalizační kaskádě.** Polyubikvitinace řetězcem K-48 je rozpoznána proteazomem a takto označený protein je degradován. Polyubikvitinace řetězce K-63 má význam pro signalizaci (Mukhopadhyay and Riezman, 2007).

Právě polyubikvitinace TRAF6 K-63 řetězcem způsobuje jeho dimerizaci a je důležitá i pro další signální molekuly (Deng et al., 2000; Sun and Chen, 2004).

Další částí TRAF6 molekuly je konzervativní C-koncová doména (TRAF-C), která je zodpovědná za spojování molekul TRAF6 mezi sebou a interakce s proteiny výše v signalizační kaskádě, zatímco TRAF-N doména je důležitá pro předání signálu dále směrem k jádru buňky (Baud et al., 1999; Deng et al., 2000; Wang et al., 2001).

#### 2.1.2.7 TAK1 a TABs

Serinová/threoninová kináza TAK1 (transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-activated kinase 1) je členem rodiny mitogen-activated protein kinase kinase kinase a je součástí mnoha signálních drah v buňkách (Yamaguchi et al., 1995). Aktivita TAK1 vyžaduje navázání TABs (TAK1-binding proteins) - TAB1 a TAB2 nebo TAB3 (Cheung et al., 2003; Shibuya et al., 1996; Takaesu et al., 2000).

TAB1 se váže svojí TAK1-aktivující doménou (Brown et al., 2005) na kinázovou doménu TAK1 (Shibuya et al., 1996), čímž zvyšuje jeho kinázovou aktivitu (Shibuya et al., 1996) a vyvolává jeho autofosforylaci (Kishimoto et al., 2000) na 3 místech jeho molekuly – threoninech na pozicích 184 a 187 a serinu na pozici 192 (Kishimoto et al., 2000; Ono et al., 2001; Sakurai et al., 2000).

TAB2 je adaptorový protein napomáhající vazbě TAK1 k TRAF6, čímž usnadňuje aktivaci TAK1 (Takaesu et al., 2000).

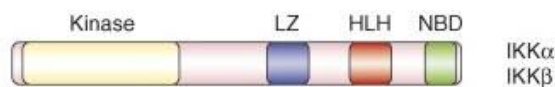
TAB3 je strukturně podobný TAB2 (shoduje se z 48%) a také usnadňuje aktivaci TAK1 a aktivuje NF- $\kappa$ B (Ishitani et al., 2003).

Velkou roli při aktivaci TAK1 hraje ubikvitinace. Aktivovaný TRAF6 totiž působí jako E3 ubikvitin ligáza (Deng et al., 2000) a může interagovat přes RING-finger doménu s ubikvitin-konjugujícím enzymem E2 13 a utvořit komplex, který spouští aktivaci komplexu TAK1/TAB2 (nebo TAB3) díky vytvoření polyubikvitinového řetězce K-63 (Wang et al., 2001).

#### 2.1.2.8 IKK komplex

IKK (Inhibitor-NF- $\kappa$ B kinase) komplex se skládá ze dvou katalytických částí (IKK $\alpha$  a IKK $\beta$ ) a regulační složky NEMO (NF- $\kappa$ B essential modifier neboli IKK $\gamma$ ). Obě katalytické jednotky IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  jsou strukturně podobné a mají kinázovou doménu, leucine-zipper

doménu, helix-otáčka-helix struktury a NEMO-vázající doménu – viz Obrázek 10 (Kawai and Akira, 2007).



**Obrázek 10: Struktura složek IKK komplexu.** IKKa a IKKb mají kinázovou doménu, LZ (leucin-ziper) doménu, struktury HLH (helix-loop-helix) a NBD (NEMO binding-domain)(Kawai and Akira, 2007).

Tento komplex je nezbytný pro fosforylaci I $\kappa$ B (inhibiční proteiny NF- $\kappa$ B) a uvolnění a translokaci NF- $\kappa$ B (Karin and Ben-Neriah, 2000).

Do rodiny IKKs patří ještě IKK $\epsilon$  (neboli IKKi) a TBK1 (TRAF-family member-associated NF- $\kappa$ B aktivátor (TANK) binding kinase 1) (Hacker and Karin, 2006). Tyto dvě kinázy fosforylují a aktivují transkripční faktory IRF (interferon regulatory transcription factor) 3 a 5 (Fitzgerald et al., 2003a; Sharma et al., 2003).

#### 2.1.2.9 Inhibiční proteiny I $\kappa$ B

Za nestimulovaných podmínek jsou transkripční faktory  $\kappa$ B v cytoplasmě v inaktivní formě díky interakcím s inhibitorovými proteiny známými jako I $\kappa$ B. Tyto proteiny mají ve své molekule ankyrin repetic, což je úsek 33 aminokyselin složený do dvou antiparalelních  $\alpha$ -helixových motivů oddělených smyčkou (Mosavi et al., 2004).

I $\kappa$ B proteiny jsou fosforylovány díky IKK komplexu a jsou následně polyubikvitinilovány (řetězcem K-48) a degradovány v 26S proteasomu, po čemž následuje přesun NF- $\kappa$ B do jádra (Hayden et al., 2006).

#### 2.1.2.10 Rodina proteinů NF- $\kappa$ B

Tato rodina proteinů se skládá z dimerických transkripčních faktorů, které obsahují Rel-homology domény, kterými se váží na různé DNA sekvence známé jako  $\kappa$ B místa (5'-GGGRNNYYCC-3' kde G = guanin, R = purinová báze, Y = pyrimidinová báze, N = jakýkoliv nukleotid), které se nacházejí v promotorových a enhancerových oblastech různých genů (Gilmore, 2006). V savčích buňkách je 5 zástupců NF- $\kappa$ B rodiny: RelA (p65), RelB, C-Rel, p105 (NF- $\kappa$ B1, prekurzor p50) a p100 (NF- $\kappa$ B2, prekurzor p52) (Chen et al., 1999).

NF- $\kappa$ B proteiny vytvářejí homodimery nebo heterodimery a regulují expresi genů důležitých pro vrozenou i získanou imunitu, záněť, proliferaci, odpovědi na stres a vývoj nádorových onemocnění (Gilmore, 2006; Karin and Greten, 2005). Nejčastěji aktivovaná forma NF- $\kappa$ B v TLR signalizaci je heterodimer složený z Rel-A a p50 (Hayden et al., 2006).

#### 2.1.2.11 IRFs

IRFs jsou další rodinou transkripčních faktorů. Všechny faktory se shodují na N-konci v 115 aminokyselinách, které obsahují DNA-vázací doménu a jsou charakteristické pěti tryptofanovými repeticemi. (Nguyen et al., 1997; Paun and Pitha, 2007). Signalizační kaskády aktivované TLRs se účastní IRF3 a IRF5.

IRF3 se vyskytuje v cytoplasmě v inaktivní formě. TBK1 a IKK $\alpha$  zprostředkovávají fosforylaci serinu na C-konci IRF3 molekuly. To umožní dimerizaci, translokování do jádra a vazbu na cílové DNA sekvence (Honda et al., 2006).

IRF5 je po aktivaci komplexem MyD88/TRAF6 přímo translokován do jádra, kde se váže na promotorové oblasti prozánětlivých genů, čímž zahajuje jejich transkripci (Schoenemeyer et al., 2005; Takaoka et al., 2005).

### 2.1.3 Signální dráhy aktivovaných TLRs

Široká škála PAMPs stimuluje TLRs a indukuje tak transkripci cílových genů důležitých pro efektivní imunitní odpověď. Po navázání ligandu TLRs dimerizují a nastávají konformační změny, které umožňují vytvoření komplexu s adaptorovými molekulami prostřednictvím TIR domén (Akira et al., 2006).

Jsou popsány dvě hlavní signalizační dráhy. První z nich je MyD88-závislá vedoucí k aktivaci NF- $\kappa$ B a IRF3 a 5. Druhé MyD88-nezávislé/TRIF-závislé dráhy se účastní adaptorové proteiny TRIF a TRAM a indukují opožděnou aktivaci NF- $\kappa$ B a přes IRF3 aktivuje transkripci genů pro IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  (Akashi-Takamura and Miyake, 2006; Yamamoto et al., 2003).

#### 2.1.3.1 Signální kaskáda závislá na MyD88

Tato kaskáda začíná navázáním MyD88 svou TIR doménou na C-konci na TIR doménu TLR. U TLR2 a TLR4 je k této vazbě vyžadována ještě přítomnost MAL (Horng et al., 2002). N-koncová death doména MyD88 se váže na death doménu IRAK4 (Burns et al., 2003; Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1997; Suzuki et al., 2002). Po navázání

IRAK4 se do komplexu navazuje IRAK1, který je fosforylován, čímž je aktivována jeho kinázová aktivita. IRAK1 poté podléhá autofosforylaci a ke komplexu se vazbou na T6BM přidává TRAF6, čímž vzniká komplex MyD88/IRAK4/IRAK1/TRAF6. Tento komplex aktivuje IRF5. Následně IRAK1 a TRAF6 disociují z receptorového komplexu a interagují s dalšími molekulami (Hayden and Ghosh, 2004; Chen and Goeddel, 2002; Takeda and Akira, 2005).

TRAF6 je polyubikvitinován K-63 řetězcem, což způsobí jeho dimerizaci (Deng et al., 2000). TRAF6 působí jako ubikvitin protein ligáza (E3) (Li et al., 2002) a spolu s E2 enzymovým komplexem složeným z ubikvitin-konjugujícího enzymu E2 N a ubikvitin-konjugujícího enzymu E2 varianta 1 katalyzuje vytvoření K-63 polyubikvitinového řetězce na NEMO (Deng et al., 2000; Sun et al., 2004). TRAF6 se dále spojí s TAK1. Této vazbě napomáhá adaptorový protein TAB2 nebo TAB3 (Takaesu et al., 2000). TAB1 se váže na kinázovou doménu TAK1 (Shibuya et al., 1996) čímž zvyšuje jeho kinázovou aktivitu (Shibuya et al., 1996). Tento komplex aktivuje signalizační kaskádu přes IRF3 (Obrázek). TAK1 aktivuje IKK pomocí fosforylace IKK $\beta$ , čímž dochází k fosforylaci I $\kappa$ Bs (Karin and Ben-Neriah, 2000), které jsou následně polyubikvitinovány řetězcem K-48 a jsou degradovány v proteasomu 26S (Hayden et al., 2006). Tím vznikají volné  $\kappa$ B transkripční faktory, které se translokují do jádra a iniciují transkripci genů kódujících prozánětlivé cytokiny a chemokiny (Hayden and Ghosh, 2004; Chen and Goeddel, 2002; Takeda and Akira, 2005).

TAK1 také fosforyluje mitogenem-aktivované proteinkinázy p38 a c-Jun N-terminální kinázu, které aktivují transkripční faktor aktivátorový protein 1, který reguluje expresi genů účastnících se diferenciaci, proliferace a apoptózy (Ip and Davis, 1998; Wang et al., 2001).

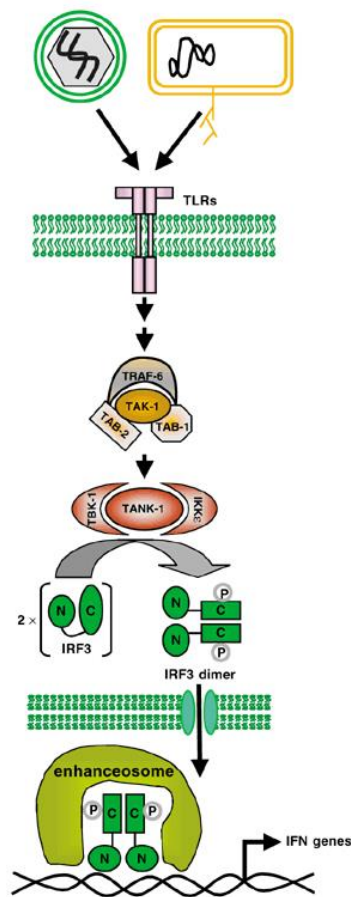
#### 2.1.3.2 Signální kaskáda závislá na TRIF

Tato cesta se týká TLR4 a je zahájena navázáním adaptorového proteinu TRIF na TIR doménu TLR4, což je zprostředkováno molekulou TRAM (Fitzgerald et al., 2003b; Oshiumi et al., 2003b). TRIF se poté svým T6BM váže na TRAF6 (McWhirter et al., 2004). Pro tuto kaskádu je nezbytné navázání receptor-interacting protein 1 na C-konec TRIF (Gohda et al., 2004; Meylan et al., 2004).

TRIF aktivuje TBK1 (Hacker et al., 2006; Oganessian et al., 2006) a IKK $\epsilon$  a tyto kinázy přímo fosforylují IRF3 (Fitzgerald et al., 2003b; Sharma et al., 2003). Fosforylovaný IRF3 vytváří homodimery, translokuje se do jádra a aktivuje transkripci genů pro IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$  (Au et al., 1995).

I v této signální dráze TRAF6 může vytvářet komplex s TAK1 a TABs a aktivovat IKK, což vede k opožděné aktivaci NF- $\kappa$ B (Akashi-Takamura and Miyake, 2006).

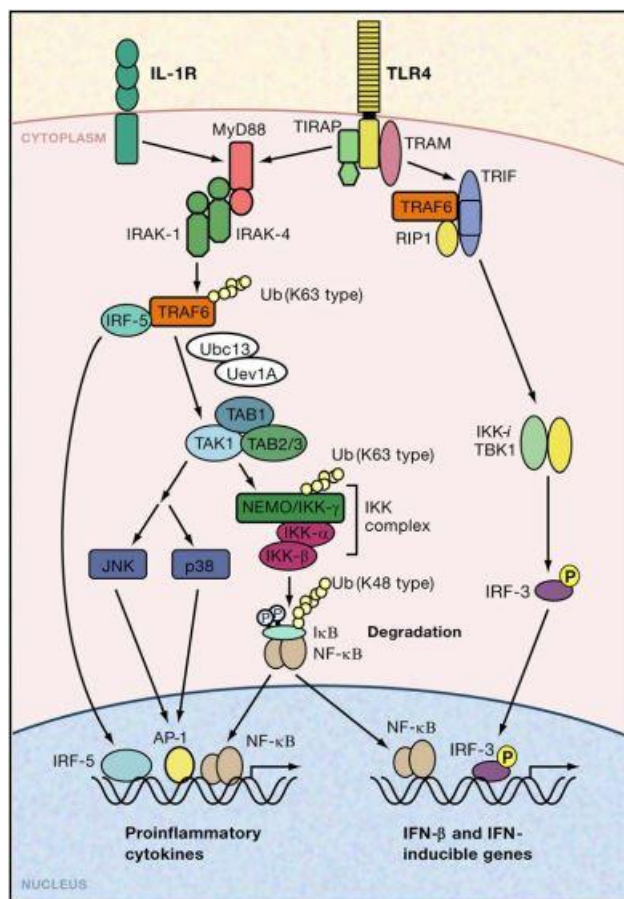
Schématické zobrazení obou signálních kaskád ukazuje Obrázek.



**Obrázek 11: Schéma signální kaskády přes IRF3.**

Po navázání ligandu na TLR receptor je aktivován kinázový komplex složený z molekul TAK1, TAB1, TAB2 a TRAF6. Aktivovaný TAK1 vede k fosforylaci a aktivaci multikinázového komplexu TANK1/TBK1/IKK $\epsilon$ , který fosforyluje monomerní IRF3 na jeho C-koncové doméně, což má za následek konformační změny vedoucí k dimerizaci IRF3 a jeho rychlé translokaci do jádra, kde je součástí enhanceosomů pro IFNs (Moustakas and Heldin, 2003).





**Obrázek 12: Schéma signální kaskády TLRs.** Po stimulaci TLRs jejich ligandy dochází k interakcím s adaptorovými proteiny MyD88 a TIRAP. Vytváří se komplex složený z IRAKs, TRAF6, která vyvolává produkci IRF5. TRAF6 působí jako E3 ubikvitinová ligáza a spolu s E2 ubikvitin-ligázovým komplexem složeným z Ubc13 (ubikvitin-konjugující enzym E2 N) a UEV1A (ubikvitin-konjugující enzym E2 varianta 1) katalyzuje polyubikvitinaci řetězcem K-63 na NEMO. Tato ubikvitinace aktivuje TAK1 komplex, což vede k fosforylaci NEMO a aktivaci IKK komplexu. Fosforylované I $\kappa$ B jsou polyubikvitinovány řetězcem K-48 a jsou degradovány v proteasomu. Uvolněné NF- $\kappa$ B se translokují do jádra a zahajují expresi prozánětlivých cytokinových genů. Podobně TAK1 fosforyluje mitogenem-aktivované proteinkinázy p38 a c-Jun N-terminální kinázu (JNK), což vede k aktivaci AP-1, která je také důležitá pro indukci cytokinových genů. TLR4 přes TRIF-závislou cestu indukuje produkci IFN. TRAF6 s navázaným RIP1 (receptor-interacting protein 1) indukuje aktivaci komplexu TBK1/IKKi, který fosforyluje IRF3, což vyvolává jeho translokaci do jádra (Akira et al., 2006).

## 2.2 Exprese TLRs a následky jejich aktivace

V mnoha studiích bylo ukázáno, že TLRs souvisí s mnoha typy onemocnění. Od plicních (Becker et al., 2002; Ramirez Cruz et al., 2004; Redecke et al., 2004) a srdečních (Dybdahl et al., 2002; Nemoto et al., 2002; Shishido et al., 2003) onemocnění přes nemoci jater (Seki et al., 2005; Zuo et al., 2003), ledvin (Kim et al., 2005), kůže (Baker et al., 2003), kloubů (Pierer et al., 2004) a kostí (Kikuchi et al., 2001) až po studie spojující TLRs s předčasným porodem (Elovitz et al., 2003) a plodností (Fazeli et al., 2005). Dále se účastní procesu angiogeneze u nádorových onemocnění (Pinhal-Enfield et al., 2003) a svou roli hrají i při transplantacích (Goldstein et al., 2003; Tesar et al., 2004). V neposlední řadě figurují v patogenezi onemocnění zažívacího traktu (Franchimont et al., 2004; Lakatos et al., 2005).

TLRs se nacházejí především na antigen-prezentujících buňkách, jako jsou dendritické buňky, monocyty, makrofágy a B buňky, a buňkách asociovaných s vrozenou imunitou, hlavně na endotelových a epitelových buňkách (Faure et al., 2001; Flo et al., 2001; Zarembler and Godowski, 2002; Zhang et al., 1999).

Ve střevech jsou TLRs exprimovány epiteliálními buňkami (na povrchu nebo v endozomech) a dalšími buňkami imunitního systému v *lamina propria*, kde aktivují zánětlivou odpověď charakterizovanou NF- $\kappa$ B aktivací a produkcí cytokinů (Santaolalla and Abreu, 2012). TLR signalizace ve střevech se ukázala být součástí proliferace epitelových buněk (Fukata et al., 2009; Fukata et al., 2006), produkce IgA (Shang et al., 2008), udržování těsných spojů (Cario et al., 2004) a exprese antimikrobiálních peptidů (Hooper and Macpherson, 2010).

Panethovy buňky střevní sliznice mají autonomní mechanismus detekce potencionálně invazivních bakterií. Tyto buňky exprimují TLR2, TLR4, TLR5 a TLR9 (Ayabe et al., 2000; Kinnebrew et al., 2010; Rumio et al., 2004) a signalizací přes tyto molekuly můžou indukovat sekreci antimikrobiálních proteinů a lektinů (Cash et al., 2006).

### 2.2.1 TLR2

TLR2 je exprimován na povrchu monocytů a makrofágů (Flo et al., 2000; Yang et al., 1998) polymorfonukleárních buňkách (Muzio et al., 2000), dendritických buňkách (Muzio et al., 2000) a endotelových (Zhang et al., 1999) a epitelových buňkách (Cario et al., 2000).

TLR2 je také exprimován na M2 buňkách střeva, které zajišťují transcytózu. Ta začíná na apikální membráně a pomocí vezikul transportuje molekuly a částice přes cytoplasmu k bazolaterální straně buňky, kde jsou uvolněny exocytózou. Zde jsou lymfocyty a antigen-prezentující buňky, které transportované částice uvolněné z M2 buněk pohltí a zpracují. Touto cestou se mohou přenášet i některé bakterie. (Neutra et al., 1999; Tohno et al., 2005).

Aktivace TLR2 indukuje tvorbu cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-6, a to především v makrofázích (Muzio et al., 2000). Mikrobiální lipopeptidy indukují maturaci dendritických buněk a produkci IL-12 (Hertz et al., 2001). Další TLR2 ligandy jako peptidoglykany a lipoteichoová kyselina jsou schopné rovněž indukovat maturaci dendritických buněk a produkci prozánětlivých cytokinů IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  (Mansell and Jenkins, 2013).

IL-2 vyvolává proliferaci T-buněk a působí na B-buňky jako růstový faktor a stimuluje produkci protilátek (Cerretti et al., 1986; Mott et al., 1992; Yokota et al., 1985). IL-6 aktivuje B-lymfocyty, zvyšuje sekreci protilátek a stimuluje produkci proteinů akutní fáze (Hirano et al., 1986; Lütticken et al., 1991). IL-12 působí na aktivované T-lymfocyty a indukuje tvorbu IFN- $\gamma$  (Gately et al., 1998; Hertz et al., 2001; Michelsen et al., 2001; Park and Scott, 2001; Thoma-Uszynski et al., 2000).

TNF- $\alpha$  má široké spektrum působení jako je indukce buněčné proliferace, diferenciaci, apoptózy, lipidový metabolismus a koagulace.

### **2.2.2 TLR4**

TLR4 po aktivaci NF- $\kappa$ B vede k syntéze a uvolnění řady prozánětlivých cytokinů jako IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$  (Medzhitov et al., 1997; Schletter et al., 1995; West et al., 2006). IL-1 $\beta$  hraje důležitou roli v zánětlivé odpovědi, je endogenní pyrogen a aktivuje imunitní buňky (Van Damme et al., 1985). TLR4 nevyvolává pouze produkci prozánětlivých cytokinů, ale také IL-10 (v monocytech), což je protizánětlivý cytokin (Calvano et al., 2005).

### **2.2.3 TLR5**

TLR5 je exprimován monocyty, nezralými dendritickými buňkami a na bazolaterální straně epiteliálních buněk (Kinnebrew et al., 2010). Geny aktivované přes

TLR5 indukují látky s antibakteriální funkcí (defenziny), chemoatraktanty imunitních buněk a geny s antiapoptickou funkcí.

Flagelin aktivuje TLR5 a vyvolá přes NF- $\kappa$ B produkci cytokinů jako TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 a IL-1 $\beta$  (Hayashi et al., 2001). Interleukin 8 je chemoatraktant pro neutrofile a další granulocyty a indukuje fagocytózu.

#### **2.2.4 TLR9**

TLR9 je zástupcem intracelulárních TLRs a rozpoznává nemetylované CpG motivy v bakteriální DNA (Krieg, 2000; Krieg, 2002). CpG oligodeoxynukleotidy obsahující fosfodiesterovou kostru aktivují NK buňky a indukují produkci IFN- $\alpha$  v plazmocyturních dendritických buňkách. Aktivované plazmocyturní dendritické buňky produkují cytokiny IL-6, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$  a chemokin IL-8 (Bauer et al., 2001; Hartmann et al., 1999).

CpG s fosforotioát indukují aktivaci B-lymfocytů, je pro ně silným mitogenem a vyvolává jejich vstup do G1 fáze buněčného cyklu a sekreci IL-6 a IL-10 (26,27). Exprese IL-6 je důležitá pro sekreci IgM protilátek (Bauer et al., 2001; Hartmann et al., 1999).

Pokud ligand vstoupí endocytózou do epiteliální buňky na bazolaterální straně, spouští se reakce vedoucí k zánětlivé odpovědi (IFN- $\gamma$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ). Pokud ale ligand vstoupí na apikální straně, je produkován IFN- $\gamma$  and IL-10 (de Kivit et al., 2011).

Po kolonizaci probiotickými bakteriemi *Lactobacillus rhamnosus* GG a *Bifidobacterium longum* BB536 dochází k zvýšení exprese TLR9 (Zhong et al., 2012).

## 2.3 Bakteriální kmeny

### 2.3.1 *Escherichia coli* Nissle 1917

*Escherichia coli* kmen Nissle 1917 (EcN) byl poprvé izolován německým lékařem Alfredem Nisslem. Jedná se o nepatogenní a neinvazivní gram-negativní bakterii. Součástí její vnější membrány je LPS (Grozdanov et al., 2004; Grozdanov et al., 2002).

EcN se osvědčila při léčbě ulcerózní kolitidy (Kruis et al., 2004; Kruis et al., 1997; Rembacken et al., 1999), brání adherenci a inhibuje invazi různých patogenních kmenů (Altenhoefer et al., 2004; Boudeau et al., 2003). Přesný mechanismus není znám. Jednou z teorií je indukce  $\beta$ -defenzinu 2 přes NF- $\kappa$ B (Wehkamp et al., 2004). Jeho produkci je schopný vyvolat flagelin izolovaný z EcN (Schlee et al., 2007).

### 2.3.2 *Escherichia coli* O55

Kmen *E.coli* O55 (O55) patří mezi nekrotoxigenní sérotyp *E.coli*. Je původcem průjmových onemocnění novorozenců především v rozvojových zemích (Orskov and Orskov, 1992).

O55 využívá II. typ sekrece, při které se účastníci proteiny musí nejprve translokovat přes cytoplazmatickou membránu a v periplazmě se zformovat do struktury schopné sekrece za účasti ATP. Tento typ sekrece je charakteristický pro extracelulární patogeny (Sandkvist, 2001; Zhou et al., 2010)

### 2.3.3 *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium

Česká republika měla v roce 2012 nejvyšší počet nahlášených případů salmonelóz v EU (97 potvrzených případů na 100 000 obyvatel). Druhým nejčastěji izolovaným sérovarem byla *Salmonella* Typhimurium (European Food Safety Authority, 2014).

Po kolonizaci tenkého střeva tato bakterie penetruje střevní epitel a vstupuje do Peyerových plaků podél střeva (Carter and Collins, 1974; Collins, 1972). Odtud se přesunuje do mezenterálních lymfatických uzlin, kde se lymfou dostává do oběhového systému (Mitrucker and Kaufmann, 2000).

Komponenty bakteriální stěny jako LPS a některé lipoproteiny vyvolávají zánětlivou odpověď a expresi prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Jung et al., 1995; McCormick et al., 1998).

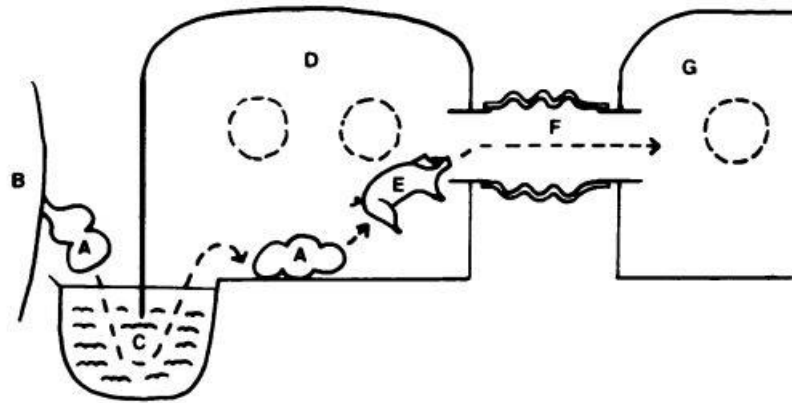
Kmen LT2 ve svém genomu obsahuje geny fljB and fliC kódující flagelin (McClelland et al., 2001). Flagelin stimuluje přes NF- $\kappa$ B produkci prozánětlivých cytokinů (Hayashi et al., 2001).

Tato bakterie využívá sekreci III. typu, při kterém se sekrece aktivuje kontaktem s eukaryotní cytoplasmatickou membránou a umožňuje bakteriím injikovat své proteiny do napadené buňky. Tento typ sekrece patří k virulentním faktorům (McClelland et al., 2001; Sandkvist, 2001).

## 2.4 Prasečí gnotobiotický model

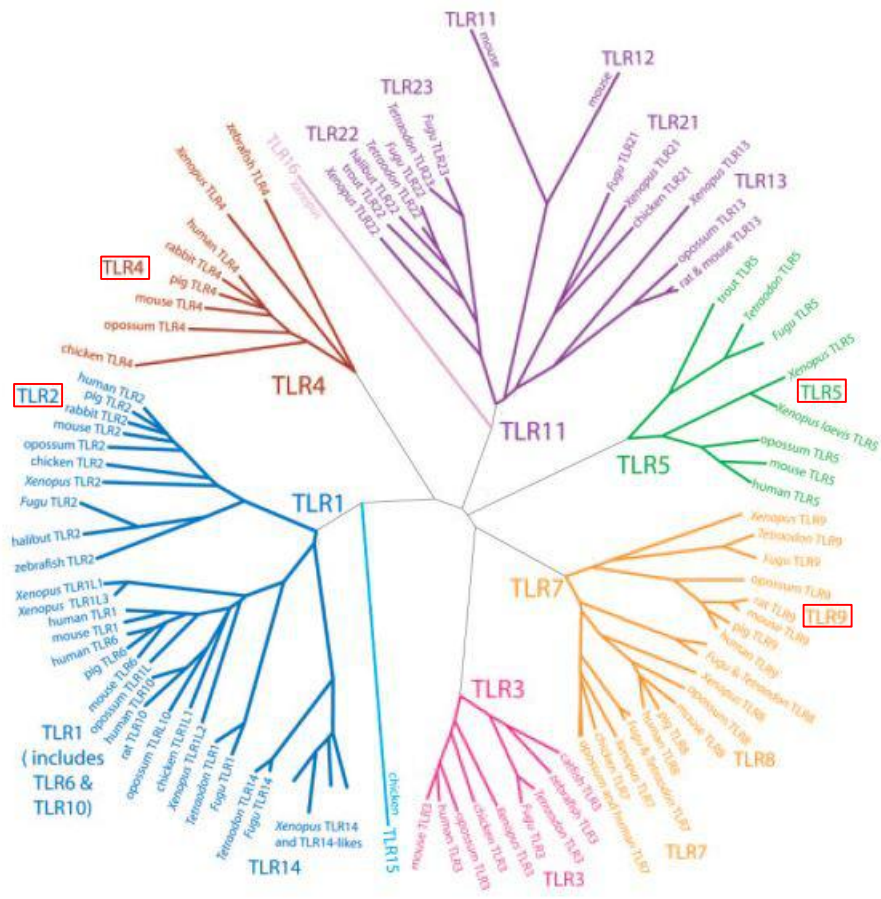
Prase má epiteliochoriální typ placenty, který zabraňuje prostupu imunoglobulinů matky do fetálního krevního oběhu a tím i pasivní imunizaci (Sterzl and Silverstein, 1967). Selata získaná chirurgicky a chovaná v mikrobiologicky definovaných a řízených podmínkách jsou vhodná pro studium interakcí hostitele a vybraných mikroorganismů (Mandel and Travnicek, 1987).

V této práci pracujeme s gnotobiotickými selaty, která jsou získána hysterektomií. Děloha je přes prokládací vanu s dezinfekcí přenesena do prvního oddílu, kde jsou selata rychle vyjmuta z dělohy a přes prokládací tunel jsou přenesena do chovného izolátoru (obrázek 13).



**Obrázek 13: Hysterektomie.** Děloha se selaty (A) vyjmutá z břišní dutiny prasnice (B) je přes prokládací vanu s dezinfekcí (C) přenesena do prvního oddílu (D), kde jsou selata rychle vyjmuta z dělohy (E) a přenesena prokládacím tunelem (F) do sterilního chovného izolátoru (G) (Miniats and Jol, 1978).

Lidské TLRs jsou více podobné prasečím proteinům než myším viz. Obrázek 14 (Roach et al., 2005).



**Obrázek 14: Molekulární strom TLRs obratlovců.** Prasečí TLR2, 4 a 9 jsou více podobné lidským proteinům než myší TLRs. Upraveno (Roach et al., 2005).



### **3 ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE**

Základem diplomové práce je zpracování literární rešerše o Toll-like receptorech (TLRs) 2, 4, 5 a 9 při bakteriálních infekcích. Selecí gnotobiotický model, střevní patogeny (*E. coli* nebo *S. Typhimurium*) a vybrané probiotické nebo komenzální bakterie budou použity pro studium aktivace a exprese TLRs reverzní transkripcí s polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase (RT-qPCR) a Western blottingem (WB). Řešitelka se pokusí nově zavést stanovení TLRs WB u prasete na pracovišti Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Novém Hrádku.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Odchov gnotobiotických selat

Bezmikrobní selata byla získaná hysterektomií 112. den březosti miniaturní prasnice z chovu kontrolovaného na transplacentárně přenosné onemocnění (parvoviry, prasečí cirkoviry 2, Aujeszského virus, prasečí respirační a reprodukční virus, leptospiry, brucelózu a toxoplazmu) z Výzkumného ústavu živočišné výroby v Kostelci nad Orlicí. Selata po hysterektomii dostala injekčně vitamín K, vitamíny skupiny B a komplex železa s dextranem, byla chována ve sklolaminátovém izolátoru a krmena mléčnou dietou (Mandel and Travnicek, 1987). Jednotýdenní selata byla kolonizována/infikována probiotickou *E. coli* Nissle 1917 (EcN), nekrotoxigenní *E. coli* O55 (O55) nebo bakterií *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, kmen LT2 (LT2). Kontrolní skupina selat zůstala bezmikrobní (GF). Po 24 hodinách byla selata eutanizována v anestezii (isofluran) vykrvením kardiální punkcí. Následně byly odebrány vzorky tkání.

## 4.2 Western blotting

Pro western blotting (WB) analýzu jsme použili vzorky připravené z tkáně v mrazícím médiu Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek Europe B. V., Alphen aan den Rijn, Netherlands), buněčnou linii prasečích střevních epitelálních buněk IPEC-J2 a hlubokozmrazené tkáně.

### 4.2.1 Extrakce proteinů

Proteiny jsme extrahovali pomocí lyzačních pufrů CytoBuster™ Protein Extraction Reagent (EMD Millipore, Billerica, USA), Tissue Extraction Reagent I (Novex, San Diego, USA) nebo T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce Biotechnology). Do lyzačního pufru byl přidáván inhibitor proteáz Complete (Roche Diagnostics, Mannheim, SRN). Centrifugace jsme prováděli v centrifuze Universal R32 s rotorem 1614 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, SRN).

#### 4.2.1.1 Tkáň v mrazícím médiu TissueTek

Použili jsme plicní tkáň (lung - LG) a tkáně ileum (IL), colon (CO) uchované v mrazícím médiu Tissue-Tek při -70 °C.

1. NA kryomikrotomu jsme nakrájeli 12 řezů o tloušťce 20 μm, přenesli je do 2 ml zkumavky a uložili na led.
2. Přidali jsme 90 μl lyzačního roztoku a 10 μl inhibitoru proteáz.
3. Inkubovali jsme 30 minut na ledu s občasným protřepáním.
4. Centrifugovali jsme vzorky 30 minut při 10 000 rpm při 4 °C.
5. Odebrali jsme supernatant do nové zkumavky.

#### 4.2.1.2 Buňky IPEC-J2

Buňky jsme kultivovali v médiu Advanced DMEM/F12 s přidavkem 5 % fetálního telecího séra a 50 μg/ml gentamicinu.

1. Do kultivační lahve s povrchem 25 cm<sup>2</sup> jsme přidali 950 μl lyzačního roztoku a 50 μl inhibitoru proteáz.
2. Inkubovali jsme 10 minut při 4 °C za současného třepání.
3. Odsáli jsme lyzační roztok spolu s proteiny a přemístili do 2 ml zkumavky.
4. Centrifugovali jsme vzorky 10 minut při 10 000 rpm při 4 °C.
5. Odebrali jsme supernatant do nové zkumavky.

#### 4.2.1.3 Hlubokozmrazená tkáň

Použili jsme vzorky tkání IL, CO, thymus (TH), sleziny (spleen – SPL), mezenteriální lymfatické uzliny (mesenteric lymph nodes – MLN) a distální jejunum (dJE). Tkáň jsme odebrali do 1,5 ml kryptuby a ponořili do tekutého dusíku. Poté jsme ji uchovávali při -70 °C.

1. 0,1 g zmrzlé tkáně jsme nastříhali do 2 ml zkumavky.
2. Přidali jsme 5 silikon-karbidových střepek (BioSpec Products, Bartlesville, USA) 950 µl lyzačního roztoku a 50 µl inhibitoru proteáz.
3. Inkubovali jsme 10 minut při 4 °C za občasného protřepání.
4. Centrifugovali jsme vzorky 10 minut při 10 000 rpm při 4 °C.
5. Odebrali jsme supernatant do nové zkumavky.

#### 4.2.2 Měření koncentrace proteinů

Kolorimetrickou detekci a kvantifikaci extrahovaných proteinů jsme provedli pomocí BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology). Inkubace byla provedena v termostatu Sanyo Incubator MIR-162 (Panasonic, Tokyo, Japonsko). Absorbanci jsme měřili pomocí spektrofotometru pro mikrotitrační destičky Infinite M200 (Tecan Schweiz, Männersdorf, Švýcarsko).

1. Do odpovídajícího počtu jamek 96 – jamkové destičky jsme dali 25 µl fosforečnaný pufovaného fyziologického roztoku (Phosphate buffer saline - PBS).
2. Do první jamky sloupce určeného pro standard jsme napipetovali 25 µl 2 mg/ml bovinního sérového albuminu (BSA), promíchali a přenesli 25 µl do další jamky. Takto jsme pokračovali v ředění 1 : 2 až k poslední jamce, ze které jsme 25 µl odstranili.
3. Do dalších sloupců jsme napipetovali vždy 25 µl vzorku o neznámé koncentraci a dále ředili vzorek 1 : 2.
4. Do každé jamky jsme přidali 200 µl BCA pracovního roztoku (50 dílů reagensie A a 1 díl reagensie B).
5. Inkubovali jsme destičku 30 minut při 37 °C.
6. Destičku jsme nechali zchladit na pokojovou teplotu.
7. Měřili jsme absorbanci při 590 nm.

8. Vytvořili jsme kalibrační křivku.
9. Vypočítali jsme koncentraci vzorků.

#### **4.2.3 Příprava vzorků pro elektroforézu**

K přípravě vzorků jsme použili 4X Bolt™ LDS Sample Buffer (Novex).

1. Podle výsledků měření proteinů jsme vzorek naředili PBS na koncentraci 1 mg/ml nebo v případě nižší koncentrace ponechali v původní koncentraci.
2. Do zkumavky jsme dali 5 µl LDS Sample Buffer, 1 µl DTT a 6 µl naředěného vzorku.
3. Vzorky jsme protřepali a zahřáli 5 minut při 95 °C.

#### **4.2.4 Elektroforéza**

Použili jsme gely NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Protein Gels nebo NuPAGE® 3-8% Tris-Acetate Protein Gels, (Novex) o tloušťce 1.0 mm s 15 jamkami. Jako proteinový standard (ST) jsme použili Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard (Novex). Elektroforéza probíhala v Bolt® Mini Gel Tank v Bolt™ MOPS SDS Running Buffer (Novex).

1. Zahřáté vzorky jsme nechali zchladnout na pokojovou teplotu, protřepali je a mírně centrifugovali.
2. Do jamek jsme dali 5 µl proteinového standardu nebo 10 µl vzorku.
3. Pustili jsme elektroforézu při konstantním napětí 200 V.
4. Zastavili jsme elektroforézu, když bromfenolová modř dosáhla spodního okraje gelu.

#### **4.2.5 Western blotting**

Pro WB jsme použili přístroj iBlot® Gel Transfer Device a polyvinylidenfluoridovou membránu (PVDF) v iBlot® Transfer Stack PVDF mini (Novex) nebo nitrocelulózovou membránu v iBlot® Transfer Stack nitrocellulose mini (Novex). Po proběhnutí WB byl gel obarven Bio-Safe™ Coomassie Stain (Bio-Rad, Hercules, USA).

1. Gel se separovanými proteiny jsme přiložili na PVDF nebo nitrocelulózovou membránu umístěnou v spodní anodové části sendvičového systému iBlot® Transfer Stack.
2. Gel jsme překryli navlhčeným filtračním papírem.
3. Přiložili jsme vrchní katodový díl sendvičového systému.

4. Spustili jsme přístroj na 7 minut.
5. Vyjmuli jsme gel a obarvili ho Bio-Safe Coomassie Stain pro detekci zbylých proteinů.
6. Ostříhali jsme nepotřebné části membrány a rozstříhli ji v místě proteinového standardu.

#### 4.2.6 Imunodetekce proteinů

Pro detekci proteinů jsme použili primární protilátky  $\beta$ -aktin (Cell Signaling Technology, Danvers, USA), TLR2 (Bioss, Woburn, USA a Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan), TLR4 (IMGENEX, San Diego, USA a Bioss), TLR5 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) a TLR9 (Cosmo Bio Co a Bioss). Jako sekundární protilátku jsme použili anti-Rabbit/HRP (Invitrogen, Carlsbad, USA) Pro vizualizaci proteinů jsme použili Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) a přístroj C-DiGit® Blot Scanner se software Image Studio Digits Ver 3.1 (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA).

Doporučené ředění protilátek a molekulové hmotnosti očekávaných bandů ukazuje **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.:**

	Firma	Doporučené ředění	MW
$\beta$ -aktin	Cell Signaling Technology	1:1 000	45 kDa
TLR2	Cosmo Bio Co.	1:500 – 1:1 000	87 kDa
TLR2	Bioss	1:100 – 1:500	84 kDa
TLR4	IMGENEX	2-6 $\mu$ l/ml	90 kDa
TLR4	Bioss	1:100-1:500	90 kDa
TR5	Santa Cruz Biotechnology	1:100 – 1:1 000	110-120 kDa
TLR9	Cosmo Bio Co.	1:500 – 1:1 000	113 kDa
TLR9	Bioss	1:100-1:500	neuvedeno

**Tabulka 1: Tabulka použitých primárních protilátek.** Doporučené ředění a očekávaná molekulová hmotnost bandu.

Imunodetekci jsme prováděli dle následujícího postupu:

1. Membránu jsme blokovali 1 hodinu 5 % nebo 2,5 % odstředěným mlékem (Difco, Franklin Lakes, USA) – skim milk (SM) nebo 5 % BSA (EMD Millipore) v TBS/T (Tris-buffered saline, trisem pufovaný fyziologický roztok).
2. Následně jsme membránu 3 x opláchli po 5 minutách v TBS/T.
3. Membránu nechali inkubovat s primární protilátkou v 5 % BSA nebo 1 % SM při 4 °C přes noc za stálého mírného třepání.
4. Druhý den jsme membránu 3 x opláchli po 10 minutách TBS/T.
5. Inkubovali jsme membránu 1 hodinu při pokojové teplotě se sekundární protilátkou za stálého mírného třepání.
6. Promyli jsme membránu 3 x 10 minut v TBS/T.
7. Inkubovali jsme ji 1 minutu s chemiluminiscenčním substrátem.
8. Oskenovali jsme membránu.

### 4.3 Real-time kvantitativní PCR

#### 4.3.1 Izolace celkové RNA

Tkáň pro izolaci RNA byla uchována v 1 ml RNAlater™ (Qiagen, Hilden, SRN) při teplotě -20 °C. Pro izolaci celkové RNA z MLN jsme použili kit RNeasy® Plus Mini (Qiagen). Centrifugace jsme prováděli v centrifuze Hettich Mikro 200R s úhlovým rotorem 2424A (Hettich Zentrifugen). Vlastní izolace probíhala dle následujícího postupu:

1. Do popsané 2 ml zkumavky SafeSeal (Sarstedt, Nümbrecht, SRN) jsme vložili sterilní zirkoniové kuličky I a II (Stratec molecular, Berlín, SRN) v poměru 2:1.
2. Do zkumavky jsme přidali 600 µl RLT Plus pufru a 24 µl 2M dithiotreitolu (DTT).
3. Z RNAlater jsme vyjmuli kus tkáně o velikosti 2 × 2 mm, kterou jsme nastříhali sterilními nůžkami do připravené zkumavky.
4. Tkáň jsme homogenizovali pomocí přístroje Tissue Lyser LT (Qiagen) při frekvenci 50 Hz po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Pokud po 5 minutách nebyla tkáň zhomogenizována, opakovali jsme tento krok.
5. Zhomogenizovaný vzorek jsme centrifugovali 3 minuty při 15 000 rpm.
6. Supernatant jsme přemístili do gDNA eliminátorové spin kolonky umístěné v 2 ml sběrné zkumavce a centrifugovali 30 vteřin při 12 000 rpm.
7. K obsahu sběrné zkumavky jsme přidali 600 µl 70 % etanolu a promíchali pipetováním.
8. 700 µl vzorku včetně možného precipitátu jsme přenesli do RNeasy spin kolonky umístěné v 2 ml sběrné zkumavce a centrifugovali 15 vteřin při 12 000 rpm.
9. Obsah sběrné zkumavky jsme vylili.
10. Na kolonku jsme přidali 700 µl RW1 pufru a centrifugovali jsme 15 vteřin při 12 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky jsme vylili.
11. Přidali jsme 500 µl RPE a centrifugovali 15 vteřin při 12 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky jsme vylili.
12. Přidali jsme dalších 500 µl RPE a centrifugovali tentokrát 2 minuty při 12 000 rpm.



13. RNeasy spin kolonku jsme přemístili do nové 2 ml sběrné zkumavky a centrifugovali 1 minutu při 14 000 rpm.
14. RNeasy spin kolonku jsme přemístili do 1,5 ml zkumavky.
15. Přidali jsme 40  $\mu$ l RNase-free vody přímo na membránu kolonky a centrifugovali 1 minutu při 12 000 rpm.
16. Získanou RNA jsme přenesli do 0,5 ml sterilní RNase-free zkumavky a umístili na led.

K izolaci celkové RNA z ilea byl použit InviTrap® Spin Tissue RNA Mini Kit (Strattec molecular) následujícím postupem:

1. Do připravené 2 ml zkumavky SafeSeal (Sarstedt) jsme vložili sterilní zirkoniové kuličky I a II v poměru 2:1.
2. Do zkumavky jsme dali 600  $\mu$ l Lysis Solution TR a 6  $\mu$ l DTT.
3. Sterilními nástroji jsme vyjmuli z RNAlater kus tkáně o velikosti 2 x 2 mm a nastříhali ji do připravené zkumavky.
4. Tkáň jsme homogenizovali v Tissue Lyser LT (Qiagen) při frekvenci 50 Hz po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Pokud po skončení nebyla tkáň zhomogenizována, opakovali jsme tento krok.
5. Homogenát jsme centrifugovali 2 minuty při 15 000 rpm.
6. 450  $\mu$ l supernatantu jsme přemístili do 2 ml sběrné zkumavky, přidali 300  $\mu$ l absolutního etanolu a dobře promíchali pipetováním.
7. Celou směs jsme přenesli do RTA Spin Filter Set kolonky, 1 minutu inkubovali a centrifugovali 1 minutu při 10 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky jsme vylili.
8. Přidali jsme 500  $\mu$ l Wash Buffer R1 a centrifugovali 30 vteřin při 10 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky jsme vylili.
9. Na kolonku jsme přidali 700  $\mu$ l Wash Buffer R2 a centrifugovali 30 vteřin při 10 000 rpm. Obsah sběrné zkumavky jsme vylili.
10. Opakovali jsme předchozí krok.
11. Centrifugovali jsme vzorek 5 minut při 12 000 rpm.
12. Přemístili jsme Spin Filter Set kolonku do RNase-free Elution zkumavky.

13. Přidali jsme 40  $\mu\text{l}$  Elution Buffer na membránu kolonky, inkubovali 2 minuty a centrifugovali 1 minutu při 10 000 rpm.
14. Získanou RNA jsme přenesli do 0,5 ml sterilní RNase-free zkumavky a umístili na led.

#### 4.3.2 Měření čistoty a koncentrace RNA

Měření koncentrace jsme provedli na UV/VIS spektrofotometru Ultrospec pro (Pharmacia, Upsala, Švédsko).

1. Do popsané zkumavky jsme dali 180  $\mu\text{l}$  (MLN) nebo 190  $\mu\text{l}$  (IL) 10 mM TRIS pH 7,5.
2. Přidali jsme 20  $\mu\text{l}$  (MLN) nebo 10  $\mu\text{l}$  (IL) izolované RNA a dobře promíchali.
3. Změřili jsme koncentraci v kyvetě z křemenného skla o šířce 10 mm.
4. Vypočetli jsme koncentraci celkové RNA dle vzorců:

$$C_{\text{RNA-MLN}} = (A_{260} - A_{320}) \times 0,040 \times 10 \text{ [ } \mu\text{g/}\mu\text{l} \text{ ]}$$

$$C_{\text{RNA-IL}} = (A_{260} - A_{320}) \times 0,040 \times 20 \text{ [ } \mu\text{g/}\mu\text{l} \text{ ]}$$

5. Čistotu jsme hodnotili pomocí poměru absorbancí při 260 nm (absorbční maximum nukleových kyselin) a 280 nm (absorbční maximum bílkovin) s odečtenými hodnotami pozadí (absorbance při 320 nm):

$$A_{260/280} = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$$

#### 4.3.3 Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA jsme použili QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription Kit (Qiagen) a termocykler iQ5 (Bio-Rad). Použitá PCR voda byla od firmy Life Technologies (Carlsbad, USA). Postup byl následující:

1. Do popsané 200  $\mu\text{l}$  tenkostěnné zkumavky pro PCR jsme napipetovali následující reagenty:
  - gDNA Wipeout Buffer (7 x)      2  $\mu\text{l}$
  - PCR voda                              2  $\mu\text{l}$
  - RNA templát (0,5 g)              10  $\mu\text{l}$
2. Směs jsme jemně zamíchali a krátce centrifugovali.
3. Směs jsme inkubovali v termálním cykleru 2 minuty při 42 °C.
4. Zkumavku jsme umístili na led a přidali následující reagenty:

- Quantiscript RT 1  $\mu$ l
- Quantiscript RT Buffer (5 x) 4  $\mu$ l
- RT Primer Mix 1  $\mu$ l

5. Směs jsme promíchali, krátce centrifugovali.
6. Nechali jsme inkubovat 20 minut při 42 °C, poté 3 minuty při 95 °C a následně umístili zkumavku na led.
7. K nasyntetizované cDNA jsme přidali 180  $\mu$ l PCR vody a uložili ji při -20 °C pro použití pro real-time PCR.

#### 4.3.4 Real-time qPCR

Pro Real-time PCR jsme použili master mix složený z FastStart Universal Probe Master (Roche Diagnostics), primerů (Generi-Biotech, Hradec Králové, ČR), LNA sondy (Roche Diagnostics) a PCR vodu (Life Technologies). K vlastní real-time PCR jsme použili termocykler iQ5 s iQ5 Optical System Software, verze 1.0 (Bio-Rad). Pomocí tohoto software bylo provedeno i vyhodnocení amplifikační reakce.

1. Do připravené DNA-free zkumavky jsme připravili master mix pro všechny vzorky se stejným master mixem (celkový objem pro jeden vzorek je 18  $\mu$ l):
  - FastStart Universal Probe Master (2 x) 10  $\mu$ l
  - Forward primer (100  $\mu$ M) 0,1  $\mu$ l
  - Reverse primer (100  $\mu$ M) 0,1  $\mu$ l
  - LNA sonda (10  $\mu$ M) 0,2  $\mu$ l
  - PCR voda 7,6  $\mu$ l
2. Tuto reakční směs jsme rozpipetovali po 18  $\mu$ l do jamek 96-jamkové destičky pro PCR.
3. Do každé jamky jsme přidali 2  $\mu$ l cDNA.
4. Destičku jsme přelepili fólií, centrifugovali 20 vteřin při 1 000 rpm v centrifuze Hettich Universal 30 RF s rotorem 1422 (Hettich Zentrifugen).
5. Destičku jsme protřepali a centrifugovali 2 minuty při 2 500 rpm.
6. Umístili jsme destičku do termocykleru a nastavili přístroj:
  1. 1. cyklus – 1 x
    - 10 minut 95 °C
  2. 2. cyklus – 45 x

- 15 vteřin 95 °C
  - 1 minuta 60 °C
3. 3. cyklus – 1 x
- ∞ 4 °C

7. V případě nutnosti bylo přidáno u 2. cyklu 5 opakování.

#### **4.4 Statistická analýza**

Hodnoty uvedené v grafu ve výsledcích jsou vyjádřeny jako průměry ze zjištěných hodnot  $\pm$  SEM (standardní chyba průměru). Rozsah výběru je pro skupiny FG a LT2 5 selat, pro skupiny O55 a EcN 4 selata. K porovnání rozdílů mezi kontrolní skupinou (GF) a ostatními skupinami jsme použili test one-way ANOVA provedený v softwaru GraphPad Prism6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, U.S.A.), kde jsme také vytvořili grafy. Výsledný rozdíl by brán jako statisticky významný, pokud  $p \leq 0,05$ , kde  $p$  je hladina významnosti.

#### **4.5 Další přístroje, pomůcky a software**

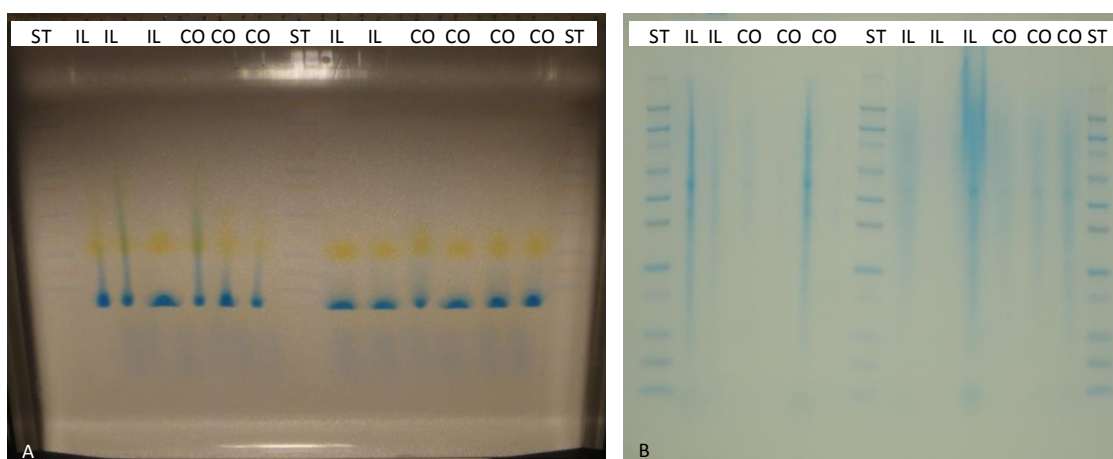
Při práci jsme používali jednokanálové pipety Digital (ThermoLabsystems, Helsinki, Finsko), Pipetus Aku (Hirschmann, Eberstadt, SRN), vortex a třepačky (Labnet, Edison, USA). Literární reference byly zpracovány v EndNote X6 (Thomson Reuters, New York, USA). Úpravy obrázků jsme provedli v programu GIMP verze 2.6.6.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Western blotting

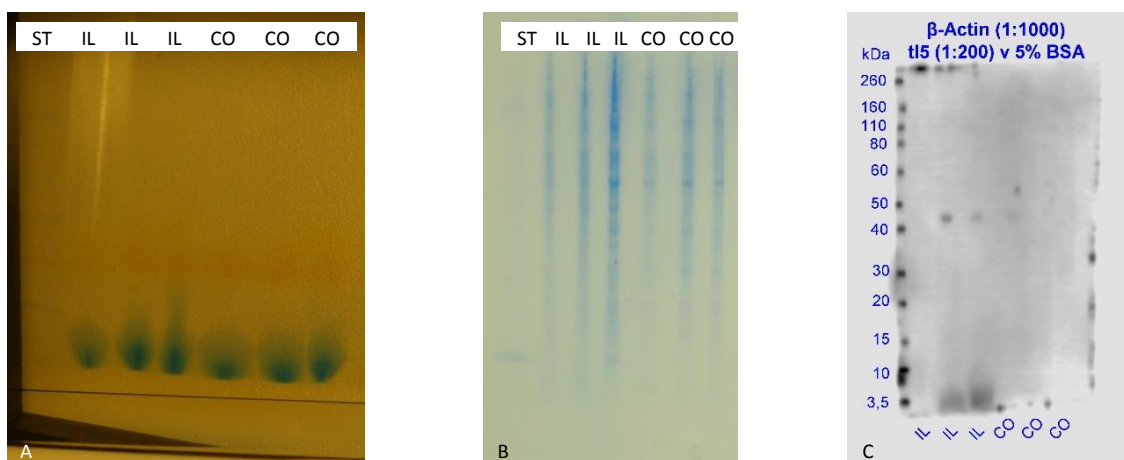
#### 5.1.1 Extrakce proteinů z kryožezů

Analyzovali jsme 12 proteinových vzorků izolovaných z kryožezů tkání IL a CO pomocí extrakčního činidla Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce Biotechnology). Použili jsme 4-12 % Bis-Tris Protein gel a po proběhnutí elektroforézy jsme gel pouze obarvili na přítomnost proteinů.



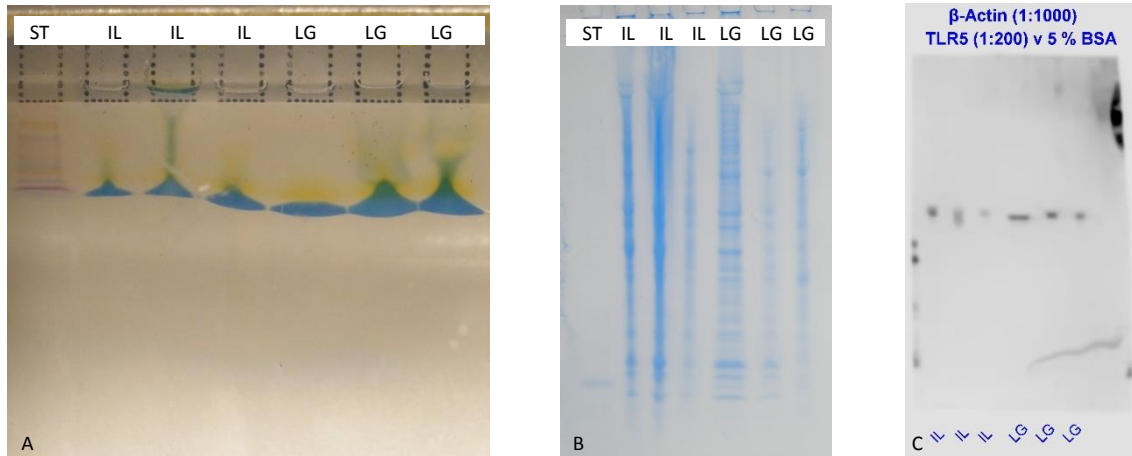
**Obrázek 15: Elektroforéza a obarvený gel.** A) Průběh elektroforézy vzorků připravených ze tkání zamražených v médiu Tissue-Tek. B) Gel obarvený pro vizualizaci proteinů.

Znovu jsme analyzovali stejné vzorky. Použili jsme 4–12 % Bis-Tris Protein gel. Následně byl proveden WB. Membrána byla blokována v 5 % SM a inkubována s primárními protilátkami  $\beta$ -aktin (1:1 000) a TLR5 (1:200) v 5% BSA.



**Obrázek 46: Elektroforéza a WB vzorků z kryožezů.** A) Konec elektroforézy. B) Gel obarvený na proteiny po WB. C) PVDF membrána blokována v 5 % SM a inkubována s primárními protilátkami  $\beta$ -Actin (1:1 000) a TLR5 (1:200) v 5% BSA.

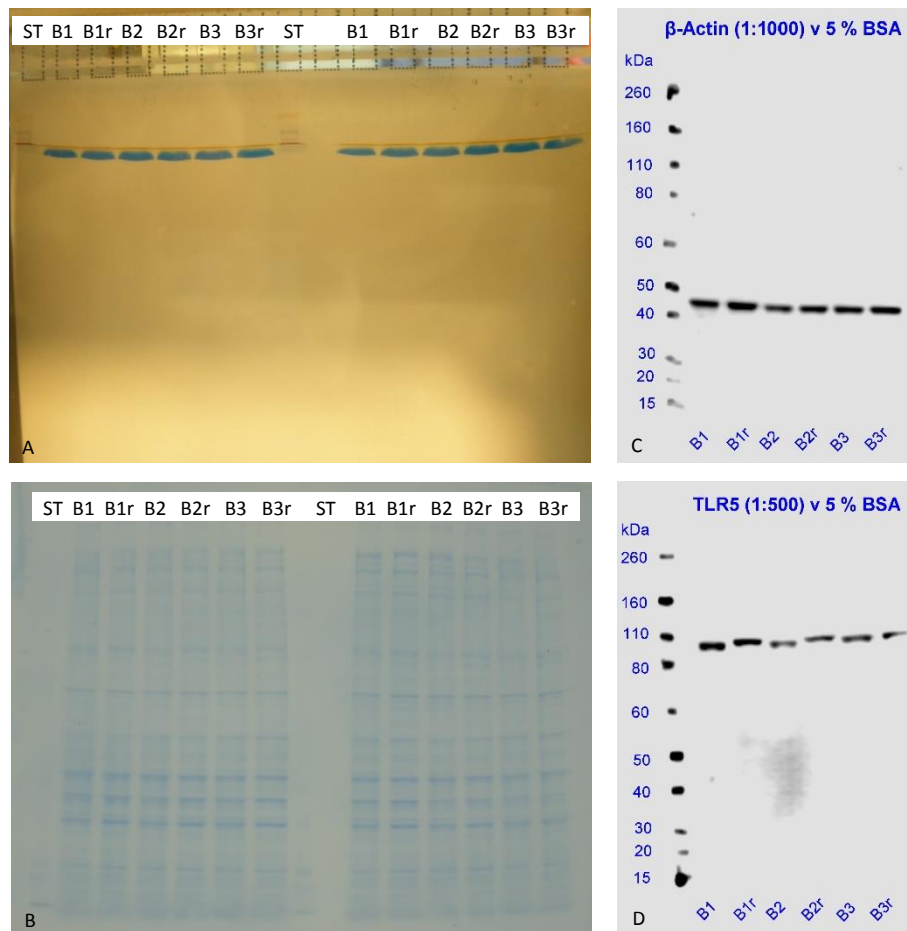
Extrahovali jsme proteiny extrakčním činidlem Tissue Extraction Reagent I (Novex) z LG a IL. Použili jsme 4–12 % Bis-Tris Protein gel. Membrána byla blokována v 5 % SM a inkubována s primárními protilátkami  $\beta$ -aktin (1:1 000) a TLR5 (1:200) v 5% BSA.



**Obrázek 17: Elektroforéza a Western blotting vzorků z kryořezů.** A) Začátek elektroforézy v 4-12 % Protein gelu. B) Gel obarvený na přítomnost proteinů po Western blottingu. C) PVDF membrána blokována v 5 % SM a inkubována s primárními protilátkami  $\beta$ -Actin (1:10 000) a TLR5 (1:200) v 5% BSA.

### 5.1.2 Extrakce proteinů z IPEC-J2 buněk

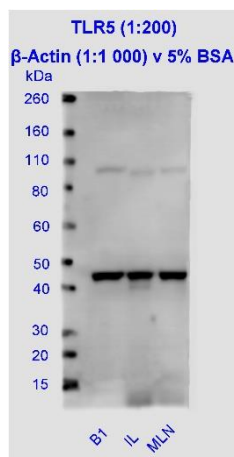
Extrahovali jsme proteiny z IPEC-J2 pomocí extrakčního činidla Cytobuster. Použili jsme 3 kultivační lahve, z každé jsme vytvořili 2 vzorky pro elektroforézu – neredukovaný (B1-3) a redukovaný (B1r-B3r). Použili jsme 4–12 % Bis-Tris Protein gel. Obě membrány byly blokovány v 5 % SM. Membrána M1 byla inkubována s primární protilátkou  $\beta$ -aktin (1:1 000) a membrána M2 s primární protilátkou tlr5 (1:500) v 5 % BSA.



**Obrázek 18: Elektroforéza a Western blotting IPEC-J2.** A) Začátek elektroforézy v 4-12 % Protein gelu. B) Gel obarvený na přítomnost proteinů po Western blottingu. C) PVDF membrána blokována v 5 % SM a inkubována s primární protilátkou  $\beta$ -Actin (1:1 000). D) PVDF membrána blokována v 5 % SM a inkubována s primární protilátkou TLR5 (1:200) v 5% BSA.

### 5.1.3 Extrakce proteinů z hlubokozmražených tkání

Extrahovali jsme proteiny z hlubokozmražených tkání IL a MLN pomocí extrakčního činidla Cytobuster. Jako kontrolu jsme použili i vzorek z IPEC-J2 (B1). Použili jsme 4–12 % Bis-Tris Protein gel. Obě membrány byly blokovány v 5 % SM. Membrána byla inkubována s primárními protilátkami  $\beta$ -aktin (1:1 000) a TLR5 (1:200) v 5 % BSA.



**Obrázek 19: Western blotting hlubokozmražených tkání a IPEC-J2.** PVDF membrána inkubované s primárními protilátkami  $\beta$ -Actin (1:10 000) a TLR5 (1:200) v 5 % BSA.

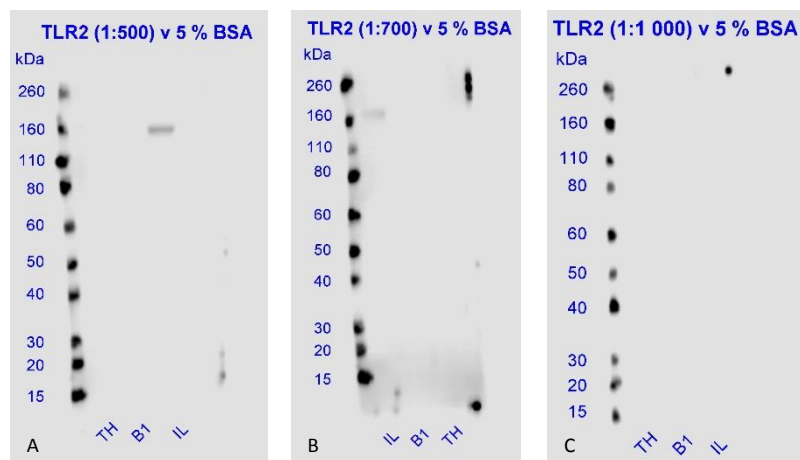


## Optimalizace podmínek WB pro TLR2, TLR4 a TLR9

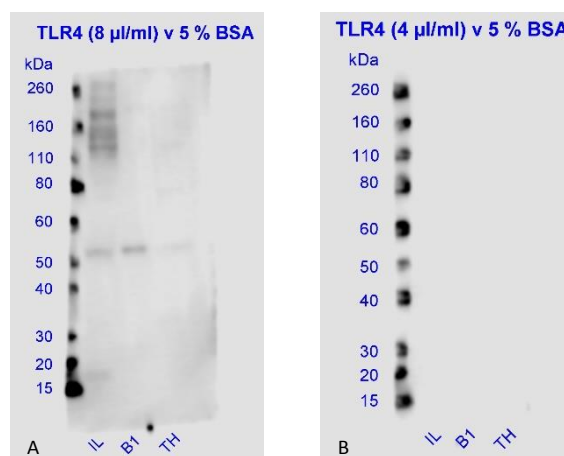
### 5.1.3.1 Různé koncentrace primárních protilátek

Provedli jsme WB analýzu vzorků z IPEC-J2 (B) a z tkání *ileum* a *thymus*. Pro elektroforézu jsme použili 4–12 % Bis-Tris Protein gel. Membrána byla blokována v 5 % SM a inkubována s primárními protilátkami TLR2 od firmy Cosmo Bio Co. (1:500, 1:700 a 1:1 000), TLR4 od firmy IMGENEX (4  $\mu$ l/ml a 8  $\mu$ l/ml) a TLR9 od firmy Cosmo Bio Co. (1:500, 1:700 a 1:1 000). Všechny primární protilátky jsme ředili v 5% BSA.

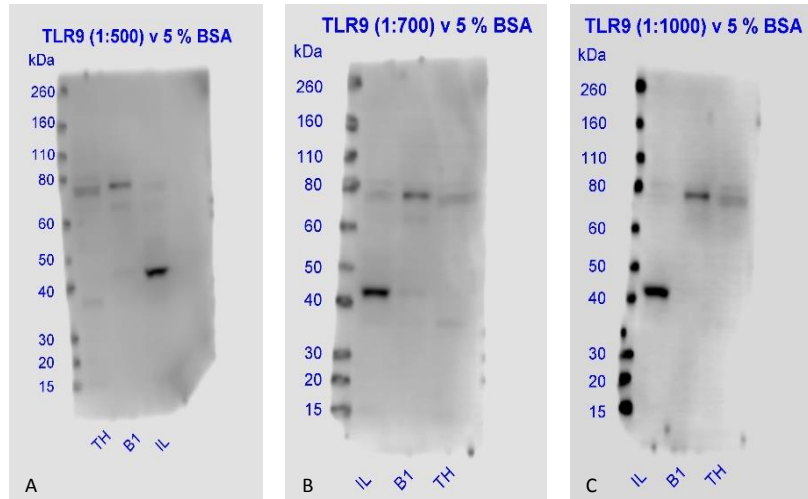
Hledané molekulové hmotnosti jsou: TLR2 – 87 kDa, TLR4 – 90 kDa, TLR9 – 113 kDa.



**Obrázek 20:** PVDF membrány inkubované s primární protilátkou TLR2 v 5% BSA. A) ředění 1:500. B) ředění 1:700. C) ředění 1:1000.



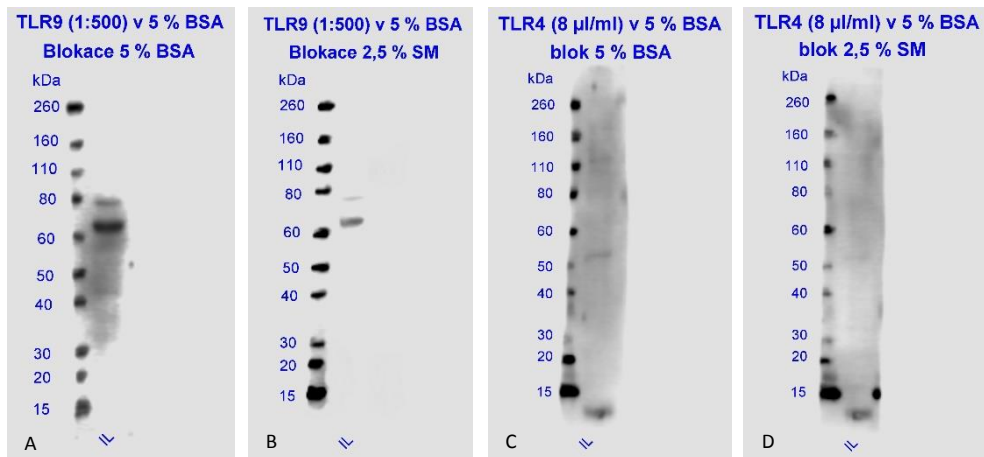
**Obrázek 21:** PVDF membrány inkubované s primární protilátkou TLR4 ředěné v 5 % BSA. A) 8  $\mu$ l/ml. B) 4  $\mu$ l/ml.



**Obrázek 22: PVDF membrány inkubované s primární protilátkou TLR9 ředěné v 5 % BSA. A) ředění 1:500. B) ředění 1:700. C) ředění 1:1 000.**

### 5.1.3.2 Různé blokační podmínky

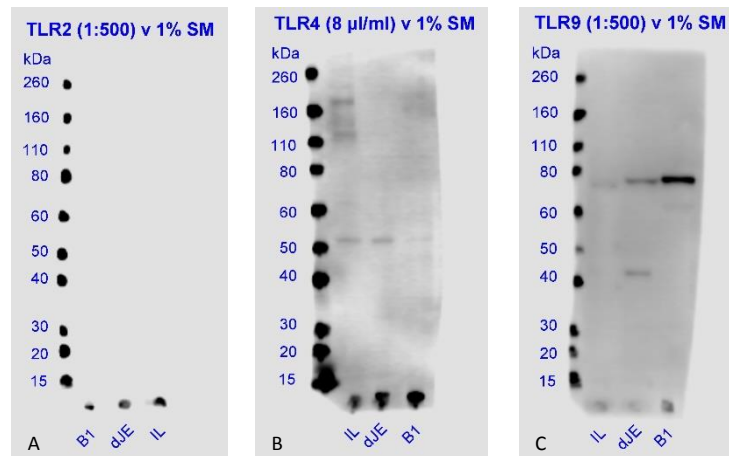
Provedli jsme WB analýzu vzorku z *ilea*. Pro elektroforézu jsme použili 4–12 % Bis-Tris Protein gel. Membrána byla blokována v 5 % BSA nebo 2,5 % SM a inkubována s primárními protilátkami TLR9 (1:500) a TLR4 (8  $\mu$ l/ml). Všechny primární protilátky jsme ředili v 5% BSA.



**Obrázek 23: Různé blokační podmínky PVDF membrán. A) membrána blokována v 5% BSA a inkubována s primární protilátkou TLR9 (1:500). B) membrána blokována v 2,5% SM a inkubována s primární protilátkou TLR9 (1:500). C) membrána blokována v 5% BSA a inkubována s primární protilátkou TLR4 (8  $\mu$ l/ml). D) membrána blokována v 2,5% SM a inkubována s primární protilátkou TLR4 (8  $\mu$ l/ml).**

### 5.1.3.3 Změna ředícího roztoku primárních protilátek

Provedli jsme WB analýzu vzorků z IPEC-J2 (B1) a hlubokozmrazených tkání distálního jejunum (dJE) a ilea (IL). Pro elektroforézu jsme použili 4–12 % Bis-Tris Protein gel. Membrána byla blokována v 5 % SM a inkubována s primárními protilátkami TLR2 (1:500), TLR4 (8  $\mu$ l/ml) a TLR9 (1:500). Všechny primární protilátky jsme ředili v 1 % SM.

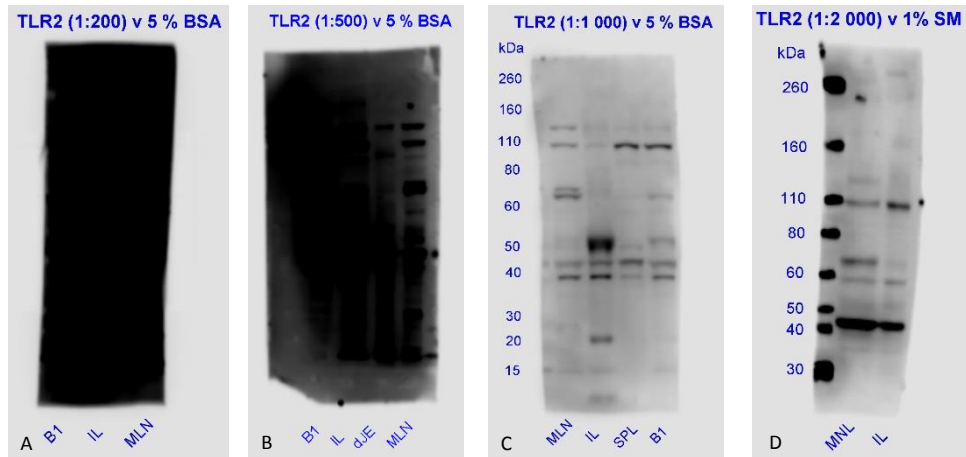


**Obrázek 24: PVDF membrány - primární protilátky naředěné v 1% SM.** Všechny membrány blokovány v 5 % SM. A) TLR2 (1:500). B) TLR4 (8  $\mu$ l/ml). C) TLR9 (1:500).

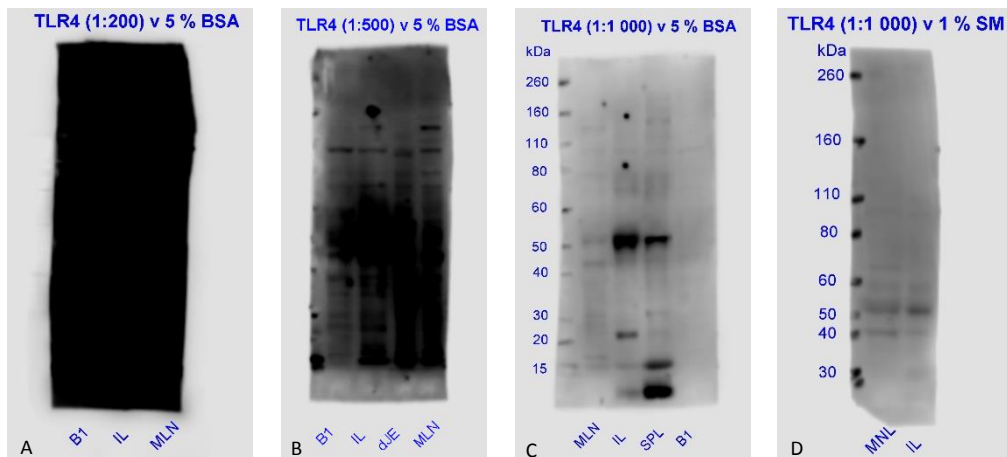
### 5.1.3.4 Změna primárních protilátek

Provedli jsme WB analýzu vzorků z IPEC-J2 (B1) a hlubokozmrazených tkání: IL, MLN, SPL a dJE. Pro elektroforézu jsme použili 4–12 % Bis-Tris Protein gel a 3-8% Tris-Acetate Protein gel. Pro WB byla použita PVDF nebo nitrocelulózová membrána. Membrány byly blokovány v 5 % SM a inkubovány s primárními protilátkami:

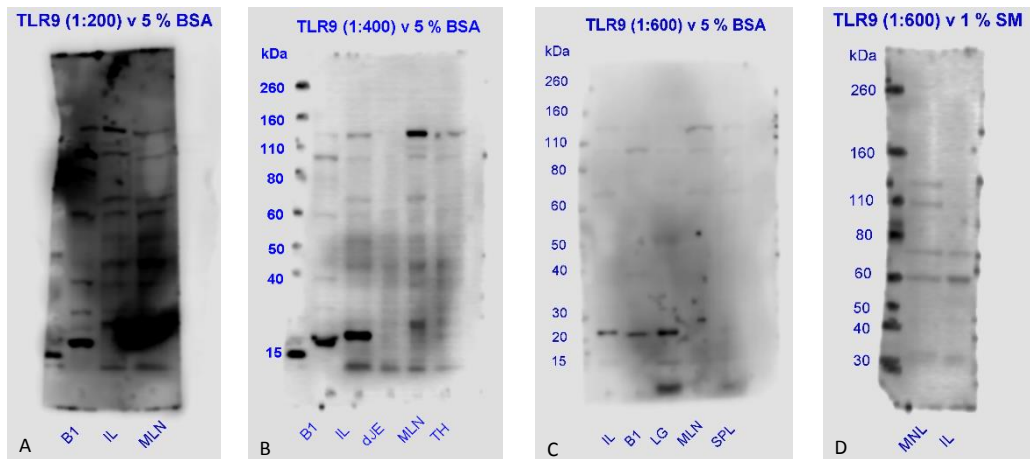
- TLR2 od firmy Bioss
  - 1:200, 1:500 a 1:1 000 – vše naředěné v 5% BSA a 1:2 000 v 1% SM
- TLR4 od firmy Bioss
  - 1:200, 1:500 a 1:1 000 – vše naředěné v 5% BSA a 1:1 000 v 1% SM
- TLR9 od firmy Bioss
  - 1:200, 1:400 a 1:600 – vše naředěné v 5% BSA a 1:600 v 1% SM



**Obrázek 25: Imunodetekce TLR2.** Všechny membrány byly blokovány 5 % SM. A) WB provedený z 4-12% Bis-Tris protein gelu na PVDF membránu s primární protilátkou v ředění 1:200 v 5% BSA. B) WB provedený z 4-12 % Bis-Tris protein gelu na PVDF membránu s primární protilátkou v ředění 1:500 v 5 % BSA. C) WB provedený z 4-12 % Bis-Tris protein gelu na PVDF membránu s primární protilátkou v ředění 1:1 000 v 5 % BSA. D) WB provedený 3-8% Tris-Acetate Protein gelu na nitrocelulózovou membránu s primární protilátkou v ředění 1: 2 000 v 1% SM.



**Obrázek 26: Imunodetekce TLR4.** Všechny membrány byly blokovány 5 % SM. A) WB provedený z 4-12% Bis-Tris protein gelu na PVDF membránu s primární protilátkou v ředění 1:200 v 5% BSA. B) WB provedený z 4-12% Bis-Tris protein gelu na PVDF membránu s primární protilátkou v ředění 1:500 v 5% BSA. C) WB provedený z 4-12% Bis-Tris protein gelu na PVDF membránu s primární protilátkou v ředění 1:1 000 v 5% BSA. D) WB provedený z 3-8% Tris-Acetate Protein gelu na nitrocelulózovou membránu s primární protilátkou v ředění 1: 1 000 v 1% SM.



**Obrázek 27: Imunodetekce TLR9.** Všechny membrány byly blokovány 5 % SM. A) WB provedený z 4-12% Bis-Tris protein gelu na PVDF membránu s primární protilátkou v ředění 1:200 v 5% BSA. B) WB provedený z 4-12% Bis-Tris protein gelu na PVDF membránu s primární protilátkou v ředění 1:400 v 5% BSA. C) WB provedený z 4-12% Bis-Tris protein gelu na PVDF membránu s primární protilátkou v ředění 1:600 v 5% BSA. D) WB provedený z 3-8% Tris-Acetate Protein gelu na nitrocelulóзовou membránu s primární protilátkou v ředění 1: 600 v 1% SM.

## 5.2 RT - qPCR

### 5.2.1 Izolace celkové RNA a syntéza cDNA

Popis a označení vzorků			Izolace celkové RNA							Syntéza cDNA	
			Absorbance				Poměry		Konc.	H2O	0,5 mg RNA
Číslo	Orgán	Infekce	A230	A260	A280	A320	A260/A280	A260/A230	[mg/mL]	[mL]	[mL]
1	MLN	LT2	0,117	0,236	0,117	0,001	2,03	2,03	0,0940	4,7	5,3
2	MLN	LT2	0,199	0,458	0,225	0,004	2,05	2,33	0,1816	7,2	2,8
3	MLN	LT2	0,529	1,037	0,511	0,006	2,04	1,97	0,4124	8,8	1,2
4	MLN	LT2	0,206	0,380	0,187	0,005	2,06	1,87	0,1500	6,7	3,3
5	MLN	LT2	0,117	0,279	0,140	0,004	2,02	2,43	0,1100	5,5	4,5
6	MLN	EcN	0,058	0,157	0,082	0,007	2,00	2,94	0,0600	1,7	8,3
7	MLN	EcN	0,214	0,398	0,195	0,006	2,07	1,88	0,1568	6,8	3,2
8	MLN	EcN	0,178	0,409	0,201	0,001	2,04	2,31	0,1632	6,9	3,1
9	MLN	EcN	0,271	0,608	0,294	0,002	2,08	2,25	0,2424	7,9	2,1
10	MLN	GF	0,155	0,291	0,147	0,004	2,01	1,90	0,1148	5,6	4,4
11	MLN	GF	0,068	0,180	0,090	0,003	2,03	2,72	0,0708	2,9	7,1
12	MLN	GF	0,135	0,305	0,149	0,003	2,07	2,29	0,1208	5,9	4,1
13	MLN	GF	0,111	0,172	0,087	0,002	2,00	1,56	0,0680	2,6	7,4
14	MLN	GF	0,120	0,239	0,119	0,003	2,03	2,02	0,0944	4,7	5,3
15	MLN	O55	0,358	0,584	0,286	0,008	2,07	1,65	0,2304	7,8	2,2
16	MLN	O55	0,272	0,541	0,263	0,009	2,09	2,02	0,2128	7,7	2,3
17	MLN	O55	0,170	0,202	0,104	0,007	2,01	1,20	0,0780	3,6	6,4
18	MLN	O55	0,312	0,555	0,270	0,006	2,08	1,79	0,2196	7,7	2,3

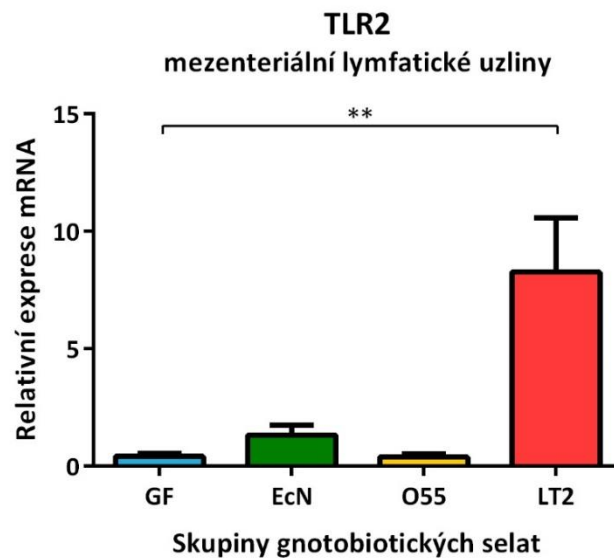
**Tabulka 3: Izolace celkové RNA z MLN.** Výpočet koncentrace RNA, její čistoty a ředění pro syntézu cDNA. Čistota se pohybovala v požadovaném rozmezí 1,9-2,1.

Popis a označení vzorků			Izolace celkové RNA							Syntéza cDNA	
			Absorbance				Poměry		Konc.	H2O	0,5 mg RNA
Číslo	Orgán	Infekce	A230	A260	A280	A320	A260/A280	A260/A230	[mg/mL]	[mL]	[mL]
1	IL	LT2	0,253	0,561	0,271	0,003	2,08	2,22	0,4488	8,9	1,1
2	IL	LT2	0,052	0,090	0,046	0,001	1,96	1,73	0,0720	3,1	6,9
3	IL	LT2	0,250	0,548	0,267	0,005	2,05	2,19	0,4384	8,9	1,1
4	IL	LT2	0,080	0,200	0,097	0,002	2,06	2,50	0,1600	6,9	3,1
5	IL	LT2	0,112	0,253	0,123	0,007	2,06	2,26	0,2024	7,5	2,5
6	IL	EcN	0,063	0,126	0,062	0,004	2,03	2,00	0,1008	5,0	5,0
7	IL	EcN	0,176	0,352	0,175	0,002	2,01	2,00	0,2816	8,2	1,8
8	IL	EcN	0,325	0,407	0,204	0,002	2,00	1,25	0,3256	8,5	1,5
9	IL	EcN	0,189	0,406	0,200	0,006	2,03	2,15	0,3248	8,5	1,5
10	IL	GF	0,245	0,184	0,091	0,004	2,02	0,75	0,1472	6,6	3,4
11	IL	GF	0,153	0,278	0,138	0,006	2,02	1,82	0,2226	7,8	2,2
12	IL	GF	0,040	0,065	0,032	0,005	2,03	1,63	0,0520	0,4	9,6
13	IL	GF	0,093	0,187	0,096	0,004	1,95	2,01	0,1496	6,7	3,3
14	IL	GF	0,269	0,420	0,206	0,005	2,04	1,56	0,3360	8,5	1,5
15	IL	O55	0,234	0,352	0,169	0,002	2,08	1,50	0,2816	8,2	1,8
16	IL	O55	0,208	0,223	0,112	0,003	1,99	1,07	0,1784	7,2	2,8
17	IL	O55	0,191	0,202	0,104	0,004	2,03	2,13	0,3248	8,5	1,5
18	IL	O55	0,294	0,555	0,270	0,001	2,02	0,64	0,1504	6,7	3,3

**Tabulka 2: Izolace celkové RNA z IL.** Výpočet koncentrace RNA, její čistoty a ředění pro syntézu cDNA. Čistota se pohybovala v požadovaném rozmezí 1,9-2,1.

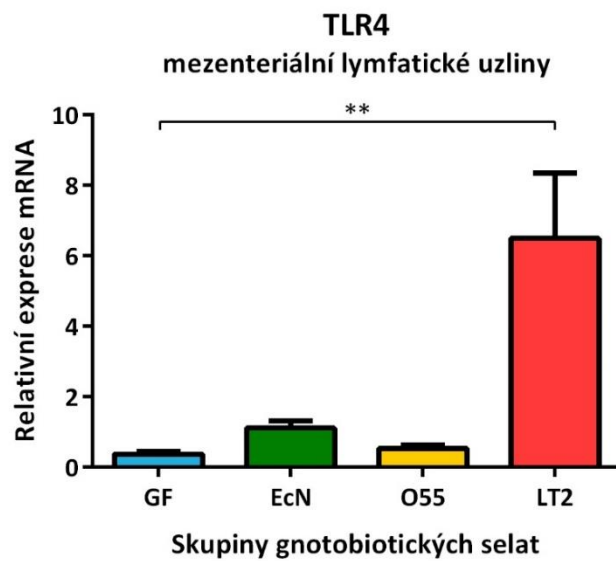
Pro syntézu cDNA jsme použili 0,5 mg RNA. cDNA jsme použili jako templát pro real-time PCR.

### 5.2.2 Real-time PCR



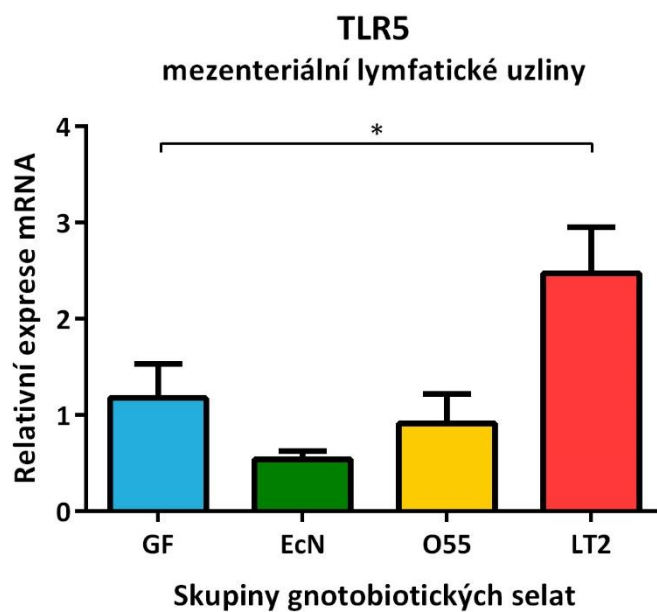
**Obrázek 28: Relativní exprese mRNA TLR2 v mezenteriálních lymfatických uzlinách.**

Expresi TLR2 byla srovnatelná mezi skupinami bezmikrobních selat a selaty infikovanými *E. coli* O55. Vyšší expresi jsme pozorovali u selat kolonizovaných probiotickou *E. coli* Nissle 1917, avšak rozdíly nebyly statisticky významné. Naopak v případě infekce *S. Typhimurium* došlo k výraznému zvýšení hodnot, které byly statisticky vysoce průkazné (\*\* $P < 0,01$ ).

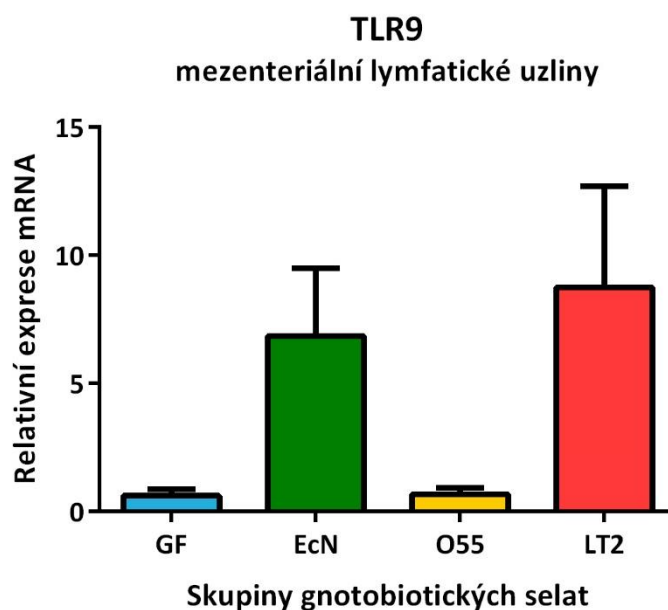


**Obrázek 29: Relativní exprese mRNA TLR4 v mezenteriálních lymfatických uzlin.** Exprese TLR4 byla srovnatelná mezi skupinami bezmikrobních selat a selaty infikovanými *E. coli* O55. Zvýšenou expresi jsme pozorovali u selat kolonizovaných probiotickou *E. coli* Nissle 1917, ale rozdíly nebyly statisticky významné. V případě infekce *S. Typhimurium* došlo k statisticky velmi výraznému zvýšení hodnot (\*\* $P < 0,01$ ).

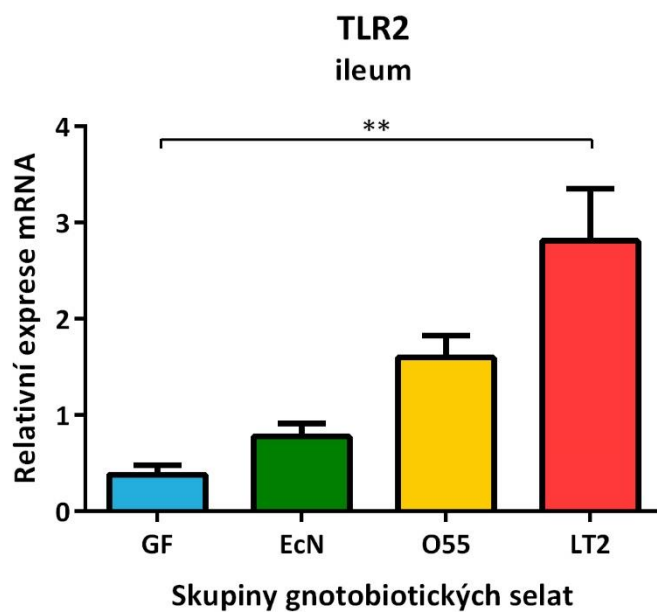




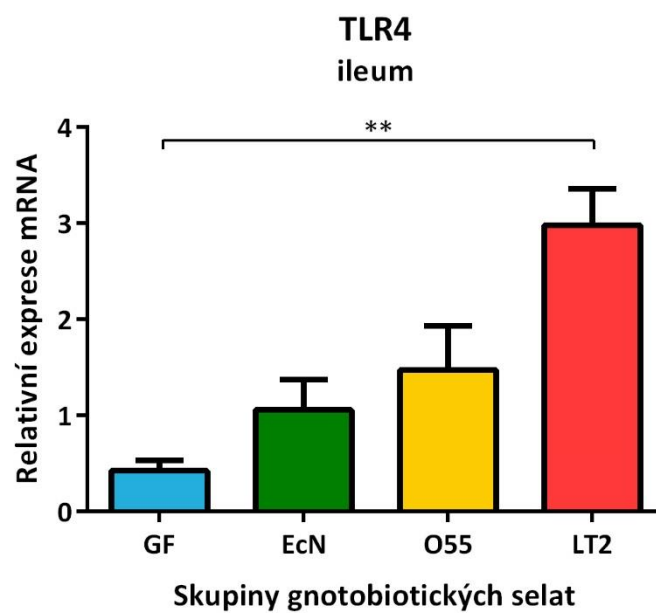
**Obrázek 30: Relativní exprese mRNA TLR5 v mezenterálních lymfatických uzlinách.** Exprese TLR5 byla vyšší u skupiny bezmikrobních selat než u skupiny selat kolonizovaných probiotickou *E. coli* Nissle 1917 a skupiny infikované *E. coli* O55, avšak rozdíly nebyly statisticky významné. Vyšší expresi jsme pozorovali u selat infikovaných *S. Typhimurium*, tento rozdíl byl statisticky průkazný (\* $P < 0,05$ ).



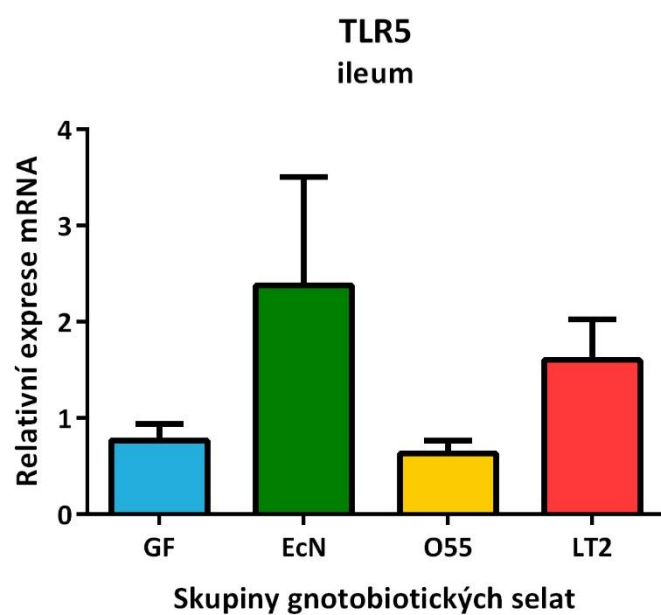
**Obrázek 31: Relativní exprese mRNA TLR9 v mezenteriálních lymfatických uzlinách.** Exprese TLR9 byla srovnatelná u skupiny bezmikrobních selat a skupiny infikované *E.coli* O55. Exprese u skupiny kolonizované *E.coli* Nissle 1917 a skupiny infikované *S. Typhimurium* byla zvýšena, avšak rozdíl oproti bezmikrobní skupině nebyl statisticky významný.



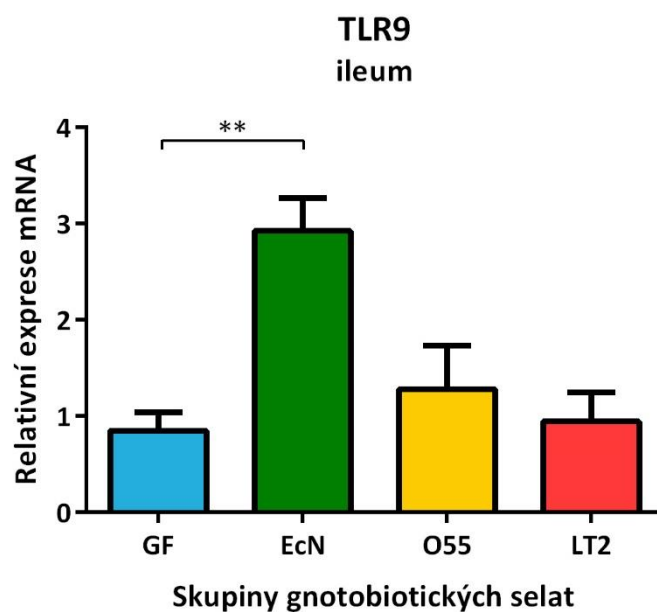
**Obrázek 32: Relativní exprese mRNA TLR2 v ileu.** Exprese TLR2 v ileu byla oproti bezmikrobním selatům zvýšena u všech ostatních skupin. Exprese u skupiny infikované *E.coli* O55 byla vyšší než u skupiny kolonizované probiotickou *E.coli* Nissle 1917, avšak ani v jednom případě se nejedná o statisticky významné zvýšení exprese. Po infekci *S. Typhimurium* došlo k výraznému zvýšení hodnot, které byly statisticky vysoce průkazné (\*\* $P < 0,01$ ).



**Obrázek 33: Relativní exprese mRNA TLR4 v ileu.** Exprese TLR4 byla oproti skupině bezmikrobních selat zvýšena u všech ostatních skupin. Exprese po infekci *E.coli* O55 byla vyšší než u skupiny kolonizované probiotickou *E.coli* Nissle 1917, ale nejednalo se o statisticky průkazné zvýšení exprese. Po infekci *S. Typhimurium* došlo k statisticky vysoce významnému zvýšení hodnot (\*\* $P < 0,01$ ).



**Obrázek 34: Relativní exprese mRNA TLR5 v ileu.** Exprese TLR5 byla zvýšena u skupiny selat kolonizované *E.coli* Nissle 1917 a skupiny infikované *S. Typhimurium*, avšak zvýšení exprese není statisticky významný.



**Obrázek 35: Relativní exprese mRNA TLR9 v ileu.** Mezi skupinami infikovanými *E.coli* O55 a *S. Typhimurium* v porovnání se skupinou bezmikrobních selat nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v expresi. Exprese TLR9 ve skupině kolonizované *E.coli* Nissle 1917 byla oproti bezmikrobní skupině statisticky velmi významně zvýšena (\*\* $p < 0,01$ ).

## 6 DISKUSE

Toll-like receptory patří do skupiny receptorů rozpoznávajících molekulární vzory. Jsou evolučně velmi konzervativní (Leulier and Lemaitre, 2008). Jejich molekula je složena z extracelulární části s doménou bohatou na leucinové repetice a intracelulární částí s Toll/IL-1 receptorovou doménou (Medzhitov et al., 1997). TLRs mají dvě hlavní signalizační dráhy, jejichž aktivace vede k expresi genů důležitých pro správné fungování imunitního systému. Ligandů vyvolávajících tuto aktivaci je velká škála a jsou charakteristické mnohdy pro celé skupiny mikroorganismů (Hemmi et al., 2000; Medzhitov et al., 1997).

TLRs jsou exprimovány ve střevních epiteliálních buňkách a dalších buňkách imunitního systému v *lamina propria* a aktivují zánětlivou imunitní odpověď charakterizovanou NF- $\kappa$ B aktivací a produkcí cytokinů (Santaolalla and Abreu, 2012).

Jedním z cílů této práce bylo zavést metodu western blotting prasečích TLR2, 4, 5 a 9 na pracovišti Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Novém Hrádku. Nejprve jsme se snažili optimalizovat WB analýzu proteinů  $\beta$ -aktin a TLR5. Začali jsme vzorky určenými primárně pro imunohistologii – tkáň uložená v Tissue Teku. Naším záměrem bylo využít stávající vzorky, abychom se přiblížili zásadám 3R (replacement, reduction and refinement). Takto uložená tkáň se zdála být vhodná i vzhledem k narušení tkáně nařezáním na tenké řezy, což umožní následnou snadnější extrakci proteinů. Ukázalo se, že již během elektroforézy nevypadají vzorky v pořádku a obarvení gelu na přítomnost proteinů potvrdilo, že nedošlo ke správné separaci proteinů. Přesto jsme pokus opakovali a tentokrát provedli i WB, při kterém jsme detekovali  $\beta$ -aktin pouze u některých vzorků (převážně ilea). Domnívali jsme se, že se může jednat o špatnou extrakci, proto jsme změnili lyzační činidlo na Tissue Extraction Reagent I (Novex) a extrahovali proteiny z ilea a plicní tkáně. Průběh elektroforézy i separované proteiny v obarveném gelu ale stále nevypadaly dle našich představ. Po dokončení WB jsme ale detekovali  $\beta$ -aktin u všech vzorků.

Rozhodli jsme se vyzkoušet jiný zdroj proteinů. Lyzovali jsme buněčnou linii IPEC-J2 pomocí činidla Cytobuster Protein Extraction Reagent (EMD Millipore). Z každé kultivační láhve jsme vytvořili dva vzorky – u prvního jsme redukovali disulfidické můstky proteinů dithiotreitem a druhý jsme ponechali bez redukce. Průběh elektroforézy i gel

byly naprosto v pořádku. Potvrdilo to naší domněnku, že tkáň uložená v mrazícím médiu Tissue-Tek není vhodná pro WB. Na membránách jsme detekovali  $\beta$ -aktin i TLR5. Redukované vzorky měly intenzivnější bandy, proto jsme se rozhodli všechny vzorky připravované pro elektroforézu redukovat.

Získali jsme vzorek tkáně zmražené v tekutém dusíku, kterou jsme lyzovali činidlem Cytobuster, který se osvědčil pro buněčnou linii. Na elektroforézu jsme pro kontrolu nanесли také vzorek z buněčné linie. Na membráně jsme pozorovali silné bandy  $\beta$ -aktinu a bandy TLR5 u všech vzorků.

Rozhodli jsme se používat hlubokozmazenou tkáň jako vhodný materiál pro WB a extrakční činidlo Cytobuster a přistoupili k optimalizaci WB pro zbývající TLRs. Použili jsme protilátky TLR2 (Cosmo Bio Co.), TLR4 (IMGENEX) a TLR9 (Cosmo Bio Co.). Na úvod jsme vyzkoušeli stejné podmínky, které se ukázaly být vhodné pro  $\beta$ -aktin a TLR5 a různé koncentrace primárních protilátek. Ani při nejnižším ředění jsme nedetekovali bandy o molekulových hmotnostech odpovídajících hledaným TLRs, pouze několik nespecifických bandů, a to především u protilátky TLR9. Vyzkoušeli jsme tedy slabší blokování membrány – 5 % BSA a 2,5 % SM. Ani za těchto podmínek jsme ale nenalezli hledané bandy. Pouze jsme zjistili, že 2,5 % SM blokuje membránu lépe než 5% BSA. V dalším pokusu jsme protilátky naředili v 1 % SM místo 5 % BSA, což ale opět nevedlo k vizualizaci hledaných TLRs. Protilátka TLR4 je výrobcem deklarována na reaktivitu proti lidskému a myším TLR4. Možná právě proto se nám nepodařilo najít TLR4 u prasečí tkáně, ačkoliv ji van Haver et al. ve své práci použili na imunohistochemické stanovení TLR4 u selat a protilátka má výrobcem deklarované použití na WB (Van Haver et al., 2009). Protilátky TLR2 a TLR9 by měly být specifické proti prasečím receptorům. Avšak v referenční publikaci výrobku pro TLR2 neukazuje ostrý band v hledané oblasti (Tohno et al., 2005). Článek z publikace pro TLR9 je WB provedený po imunoprecipitaci proteinů (Shimosato et al., 2005). Optimalizaci WB jsme řešili komunikací s technickou podporou firmy Cosmobio. Bohužel, ani s jejich pomocí jsme se nedostali k jednoznačnému průkazu vhodnosti použitých protilátek.

Rozhodli jsme se změnit primární protilátky a vyzkoušet protilátky od firmy Bioss. Stejně jako v předchozím případě jsme nejprve vyzkoušeli různá ředění. U těchto protilátek jsme naopak museli koncentraci velmi snižovat a i při nejvyšším doporučeném



ředění se na membráně vyskytovalo velké množství nespecifických bandů, ale v oblasti molekulové hmotnosti odpovídající TLR2 a TLR4 žádný band nebyl. U TLR9 ve vzorku z mezenterálních lymfatických uzlin byl sice detekován band odpovídající molekulové hmotnosti TLR9, ale také velké množství nespecifických bandů. Vyzkoušeli jsme tedy 3-8 % Tris-acetátový gel a nitrocelulózovou membránu spolu s nejvyšším ředěním protilátky namíchané v 1 % SM. U TLR2 a TLR4 nedošlo k detekci požadovaných bandů. U TLR9 přetrval výskyt nespecifit.

Na zkušenosti s protilátkami proti TLRs jsme se ptali ve veterinárním diskuzním fóru organizovaném prof. Cynthií Baldwin (University of Massachusetts, Amherst, USA). Na náš dotaz reagoval prof. Dirk Werling (Royal Veterinary College - University Of London, Hatfield, UK) s tím, že vyzkoušeli velké množství protilátek, které měly reagovat s bovinními TLRs, avšak buď nereagovaly nebo reagovaly nespecificky. Prof. Derling nám doslova radil, abychom velmi zvažovali, než některou protilátku koupíme („So, based on our knowledge...don't waste any money“). Tímto vyhraněným názorem se vlastně potvrzuje naše domněnka, že je velmi obtížné získat kvalitní protilátky se specifickou reakcí a že mnohé komerční protilátky nejsou příliš vhodné pro použití. Western blotting je metoda, která je založená na zdánlivě jednoduché reakci antigen-protilátka. Je však často třeba extrémně optimalizovat reakční podmínky, aby došlo k získání požadovaného výsledku, že je otázka, jestli se jedná o specifickou reakci. Doposud však zůstává Western blotting referenční metodou pro průkaz specifity protilátek, ačkoliv skýtá mnohá úskalí. Je mnohem jednodušší označit protilátkou buněčné receptory pro použití metod jako je imunohistochemie nebo průtoková cytometrie, než zdánlivě jednoduchou maticí jakou je PVDF nebo nitrocelulózová membrána. Otázkou zůstává, jaká je specifita protilátky, která nedává při Western blotting analýze specifickou reakci, ale je používána pro průkaz antigenu na buňkách.

Snahy o semikvantitativní stanovení TLRs u prasečího gnotobiotického modelu se nevzdáváme. Jen je třeba přistupovat k nákupu drahých protilátek s větší rozvahou a vyměňovat si zkušenosti s kolegy zabývajícími se obdobnou problematikou. Z tohoto důvodu jsme si začali vyměňovat poznatky s Dr. Isabelle Oswald (Institut National de la Recherche Agronomique, Toulouse, Francie), která se problematikou TLR u prasete také zabývá a rovněž se jí doposud nedaří najít vhodné protilátky. Další možností je připravit

si vhodné protilátky sami, což však není náš hlavní cíl a při předpokládané časové náročnosti by nás mohl svést k přípravě reagensů jako cíle místo jejich použití jako prostředku. Při možné přípravě vlastních protilátek by se jednalo především o vhodný antigen. Rekombinantní nebo nativní protein by znamenal další vynaložení času a finančních prostředků na přípravu reagensů. Pokud bychom se tedy v budoucnu rozhodli jít touto cestou, pravděpodobně bychom se rozhodli pro komerčně připravené syntetické peptidy navázané na vhodné nosiče (KLH, BSA).

V druhé části práce jsme izolovali celkovou RNA z ilea a mezenterálních lymfatických uzlin. Pro izolaci stále mnoho laboratoří používá klasickou metodu fenol-chloroformové precipitace (Chomczynski and Sacchi, 1987). V laboratoři gnotobiologie se však snaží vyloučit práci s toxickými látkami, které jednak mohou poškozovat lidské zdraví a jednak představují problém s likvidací toxického odpadu. To byl, přestože se jedná o uznávanou metodu, hlavní důvod pro používání metod a vyloučením toxických látek (komerční kity RNeasy® Plus Mini (Qiagen) a InviTrap® Spin Tissue RNA Mini Kit (Strattec molecular)).

Při izolaci celkové RNA bylo nutné zabránit degradaci RNA RNázami, což bylo zajištěno přítomností inaktivačních složek v lizačním pufru. Při práci se vzorkem jsme používali sterilní materiál, rukavice a použité reagentie byly bez RNáz.

Dále bylo nutné eliminovat kontaminující genomovou DNA (gDNA). To jsme provedli ve dvou krocích. Během izolace celkové RNA z ilea je gDNA navázána na částice v Lysis solution DCT (Strattec molecular) a následně odstraněna centrifugací. Při izolaci z mezenterálních lymfatických uzlin jsme použili gDNA eliminátorovou spin kolonku. Druhým krokem bylo použití pufru gDNA Wipeout Buffer (Quiagen) před syntézou cDNA.

Expresí mRNA pro TLR2, 4, 5 a 9 byla sledována u 4 skupin gnotobiotických selat: kontrolní bezmikrobní skupina, skupina infikovaná kmenem *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium kmen LT2, skupina infikovaná kmenem *Escherichia coli* O55 a skupina kolonizovaná probiotickou bakterií *Escherichia coli* Nissle 1917.

Mezi hodnotami exprese mRNA pro kontrolní bezmikrobní skupinu selat a selat kolonizovaných *E.coli* Nissle 1917 jsme našli zvýšenou expresi TLR9 v ileu i mezenterálních lymfatických uzlinách, ale pouze v ileu se jednalo o statisticky významný rozdíl. Tato zvýšená exprese může být následek spuštění signální kaskády přes

apikální stranu endoteliálních buněk, která vede k produkci IL-10, který je protizánětlivým cytokinem (de Kivit et al., 2011). V ileu byla také zvýšena exprese TLR5. Může se jednat o aktivaci vyvolanou flagelinem vedoucí k indukci antimikrobiálního peptidu  $\beta$ -defenzinu 2 přes NF- $\kappa$ B (Schlee et al., 2007; Wehkamp et al., 2004), a proto může být jedním z mechanismů prospěšného působení probiotické *E.coli* Nissle 1917.

U skupiny selat infikovaných *E.coli* O55 nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v expresi oproti bezmikrobní skupině v ileu ani mezenterálních lymfatických uzlinách. Zvýšená exprese TLR2, 4 a 5 v mezenterálních lymfatických uzlinách byla zaznamenána po infekci bakterií *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium kmen LT2. Tato bakterie obsahuje ve své stěně LPS (ligand pro TLR4) a lipoproteiny (ligandy pro TLR2) (Jung et al., 1995; McCormick et al., 1998) a v jejím genomu se nacházejí geny pro flagelin (ligand pro TLR5) (Hayashi et al., 2001), proto se domníváme, že zvýšená exprese TLR2, 4 a 5 je vyvolána právě těmito ligandy. Spuštěné signalizační kaskády poté vyvolají aktivaci genů vedoucích k produkci zánětlivých cytokinů.

Většina experimentálních studií je prováděna na laboratorních hlodavcích, především myších. Z toho důvodu je k dispozici velké množství osvědčených reagensů, kitů a dalších nástrojů pro studium imunitního systému právě myšího modelu. V posledních letech je stále větší pozornost věnována prasečímu modelu, a to s ohledem na vyšší fyziologickou, anatomickou a genetickou podobnost člověku. Paradoxně v oblasti imunologie je cenná jeho výrazná odlišnost od člověka, co se týká typu placentace. Epliochoriální typ placenty prasete umožňuje asepticky získat selata, která jsou, při zabránění příjmu kolostra, prostá mateřských protilátek a tudíž imunitní reakce není ovlivněna pasivní imunizací. Nevýhodou prasečího modelu, ve srovnání s podstatně levnějšími hlodavci, je také nižší výběr vhodných reagensů. Proto považujeme za vhodné sdílet informace mezi výzkumnými skupinami pracujícími s prasečím modelem.

## 7 ZÁVĚR

Toll-like receptory hrají důležitou roli v rozpoznání patogenních mikroorganismů imunitním systémem, jejich studium umožnilo lepší pochopení molekulární podstaty imunitní odpovědi. Signalizační kaskády TLRs mohou být cílem terapeutického zásahu při léčbě lokálních nebo systémových zánětlivých procesů. Inhibitory signálních drah by mohly být užitečné při léčbě zánětu, prevenci septického šoku a léčbě infekčních onemocnění. TLRs na úrovni genového přepisu a na úrovni proteinu nám mohou umožnit získat lepší představu o regulaci a funkci TLRs.

Ve výsledcích, které jsme dosáhli, můžeme kladně hodnotit:

1) Zhodnocení různých způsobů přípravy tkáňových homogenátů pro přípravu supernatantu obsahující protein našeho zájmu (inhibice elektroforézy Tissue-Tek apod.).

2) Vypracování semikvantitativní detekce TLR5 v tkáňových homogenátech ilea a mezenterálních lymfatických uzlin.

3) Otestování protilátek proti prasečím TLR2, 4 a 9 a obeznámení se s možnými úskalími při stanovení proteinu metodou WB.

4) Navázání kontaktů pro sdílení informací o vhodných reagentech pro stanovení TLRs u prasete.

5) Stanovení exprese TLR2, 4, 5 a 9 na úrovni mRNA, kdy jsme v imunologicky exponovaném ileu a mezenterálních lymfatických uzlinách dokumentovali změny v expresi těchto TLRs po kolonizaci/infekci bezmikrobních selat probiotickou bakterií nebo střevními patogeny.

Domníváme se, že námi získané poznatky jsou dobrým základem pro další studium TLRs u prasečího gnotobiotického modelu a je možné naši práci považovat za přínosnou pro pochopení mechanismů regulace TLRs při bakteriálních infekcích, kterému se chceme věnovat v budoucnu.

## SEZNAM ZKRATEK

CpG	<i>cytidine-phosphate-guanosine</i> , cytidin-fosfát-guanosin
B	Vzorek proteinů z buněčné linie IPEC-J2
BSA	Bovinní sérový albumin
CO	colon
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i> , molekulární vzory signalizující poškození
DD	<i>Death domain</i>
DTT	dithiotreitol
EcN	<i>Escherichia coli</i> kmen Nissle 1917
GF	<i>Germ-free pigs</i> , bezmikrobní selata
GPI	glykosylfosfatidylinositolová kotva
HLH	<i>helix-loop-helix</i> , helix-otáčka-helix
ID	Intermediální doména
IFN	interferon
IKK	<i>Inhibitor-kappaB-kinase</i> , inhibitor-kappa-B kináza
IL	ileum
IL-1	Interleukin 1
IRAKs	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinases</i>
IRFs	interferon regulační faktory
I $\kappa$ B	inhibiční proteiny NF- $\kappa$ B
LBP	<i>LPS binding protein</i> , LPS vázající protein
LG	<i>Lung</i> , plicní tkáň
LPS	lipopolysacharid
LRR	<i>leucine-rich repeat</i> , repetitivní doména bohatá na leucin
LT2	<i>Salmonella enterica</i> , sérovar Typhimurium, kmen LT2
LZ	leucin-ziper doména
MAL	<i>MyD88-adaptor-like</i>
MD2	<i>myeloid differentiation protein</i>
MLN	<i>Mesenteric lymph nodes</i> , mezenteriální lymfatické uzliny

MyD88	<i>myeloid differentiation primary response protein</i> , myeloidní diferenciační faktor 88
NBD	<i>NEMO binding-domain</i> , doména vázající NEMO
NEMO	NF- $\kappa$ B essential modifier
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-B</i> , nukleární faktor kappa-B
O55	<i>Escherichia coli</i> kmen O55
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> , molekulární vzory spojené s patogenitou
PBS	Phosphate buffer saline, fosforečnany pufovaný fyziologický roztok
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PRRs	<i>pattern-recognition receptors</i> , receptory rozpoznávající molekulární vzory
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RHIM	<i>RIP homotypic interaction motif</i>
RING	<i>really Interesting new gene</i>
RIP	<i>receptor-interacting protein</i>
RSV	respirační syncytiální virus
SM	<i>Skim milk</i> , odstředěné mléko
SPL	<i>Spleen</i> , slezina
ST	Proteinový standard
T6BM	<i>TRAF6-binding motif</i>
TABs	<i>TAK1-binding proteins</i>
TAK1	<i>TGF-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TANK	<i>TRAF-family member-associated NF-<math>\kappa</math>B activator</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TBS/T	<i>Tris-buffered saline</i> , Trisem pufovaný fyziologický roztok
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TH	thymus
TICAM1	<i>TIR domain-containing adapter molecule 1</i>
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TIRAP	<i>Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein</i>

TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
Ub	ubikvitin
Ubc13	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N</i> , ubikvitin-konjugující enzym E2 N
Uev1A	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1</i> , ubikvitin-konjugující enzym E2 varianta 1

## 8 LITERATURA

1. Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R.M. Vabulas, and H. Wagner. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *European journal of immunology* 32:1958-1968.
2. Akashi-Takamura, S., and K. Miyake. 2006. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 12:233-240.
3. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 4:499-511.
4. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology* 2:675-680.
5. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
6. Altenhoefer, A., S. Oswald, U. Sonnenborn, C. Enders, J. Schulze, J. Hacker, and T.A. Oelschlaeger. 2004. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS immunology and medical microbiology* 40:223-229.
7. Anonym 1. 2007. Agonistic and Antagonistic Effects of LPS on TLR4 Review. In Invivogen, San Diego.
8. Au, W.C., P.A. Moore, W. Lowther, Y.T. Juang, and P.M. Pitha. 1995. Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:11657-11661.
9. Ayabe, T., D.P. Satchell, C.L. Wilson, W.C. Parks, M.E. Selsted, and A.J. Ouellette. 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature immunology* 1:113-118.
10. Baker, B.S., J.M. Ovigne, A.V. Powles, S. Corcoran, and L. Fry. 2003. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR



- expression in chronic plaque psoriasis. *The British journal of dermatology* 148:670-679.
11. Baud, V., Z.G. Liu, B. Bennett, N. Suzuki, Y. Xia, and M. Karin. 1999. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes & development* 13:1297-1308.
  12. Bauer, S., C.J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, and G.B. Lipford. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:9237-9242.
  13. Becker, S., M.J. Fenton, and J.M. Soukup. 2002. Involvement of microbial components and toll-like receptors 2 and 4 in cytokine responses to air pollution particles. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 27:611-618.
  14. Bell, J.K., G.E. Mullen, C.A. Leifer, A. Mazzone, D.R. Davies, and D.M. Segal. 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in immunology* 24:528-533.
  15. Ben-Neriah, Y. 2002. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nature immunology* 3:20-26.
  16. Bonnert, T.P., K.E. Garka, P. Parnet, G. Sonoda, J.R. Testa, and J.E. Sims. 1997. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS letters* 402:81-84.
  17. Borden, K.L., and P.S. Freemont. 1996. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Current opinion in structural biology* 6:395-401.
  18. Boudeau, J., A.L. Glasser, S. Julien, J.F. Colombel, and A. Darfeuille-Michaud. 2003. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 18:45-56.
  19. Bradley, J.R., and J.S. Pober. 2001. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20:6482-6491.

20. Brown, K., S.C. Vial, N. Dedi, J.M. Long, N.J. Dunster, and G.M. Cheetham. 2005. Structural basis for the interaction of TAK1 kinase with its activating protein TAB1. *Journal of molecular biology* 354:1013-1020.
21. Burns, K., S. Janssens, B. Brissoni, N. Olivos, R. Beyaert, and J. Tschopp. 2003. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *The Journal of experimental medicine* 197:263-268.
22. Burns, K., F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J.L. Bodmer, F. Di Marco, L. French, and J. Tschopp. 1998. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *The Journal of biological chemistry* 273:12203-12209.
23. Calvano, S.E., W. Xiao, D.R. Richards, R.M. Felciano, H.V. Baker, R.J. Cho, R.O. Chen, B.H. Brownstein, J.P. Cobb, S.K. Tschoeke, C. Miller-Graziano, L.L. Moldawer, M.N. Mindrinos, R.W. Davis, R.G. Tompkins, and S.F. Lowry. 2005. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 437:1032-1037.
24. Campos, M.A., I.C. Almeida, O. Takeuchi, S. Akira, E.P. Valente, D.O. Procopio, L.R. Travassos, J.A. Smith, D.T. Golenbock, and R.T. Gazzinelli. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167:416-423.
25. Cario, E., G. Gerken, and D.K. Podolsky. 2004. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 127:224-238.
26. Cario, E., I.M. Rosenberg, S.L. Brandwein, P.L. Beck, H.C. Reinecker, and D.K. Podolsky. 2000. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164:966-972.
27. Carter, P.B., and F.M. Collins. 1974. The route of enteric infection in normal mice. *The Journal of experimental medicine* 139:1189-1203.
28. Cash, H.L., C.V. Whitham, C.L. Behrendt, and L.V. Hooper. 2006. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313:1126-1130.
29. Cerretti, D.P., K. McKereghan, A. Larsen, M.A. Cantrell, D. Anderson, S. Gillis, D. Cosman, and P.E. Baker. 1986. Cloning, sequence, and expression of bovine

- interleukin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:3223-3227.
30. Collins, F.M. 1972. Salmonellosis in orally infected specific pathogen-free C57B1 mice. *Infection and immunity* 5:191-198.
  31. de Kivit, S., E. van Hoffen, N. Korthagen, J. Garssen, and L.E. Willemsen. 2011. Apical TLR ligation of intestinal epithelial cells drives a Th1-polarized regulatory or inflammatory type effector response in vitro. *Immunobiology* 216:518-527.
  32. Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z.J. Chen. 2000. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-361.
  33. Dybdahl, B., A. Wahba, E. Lien, T.H. Flo, A. Waage, N. Qureshi, O.F. Sellevold, T. Espevik, and A. Sundan. 2002. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation* 105:685-690.
  34. Elovitz, M.A., Z. Wang, E.K. Chien, D.F. Rychlik, and M. Phillippe. 2003. A new model for inflammation-induced preterm birth: the role of platelet-activating factor and Toll-like receptor-4. *The American journal of pathology* 163:2103-2111.
  35. European Food Safety Authority. 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12:14-22.
  36. Faure, E., L. Thomas, H. Xu, A. Medvedev, O. Equils, and M. Ardit. 2001. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166:2018-2024.
  37. Fazeli, A., C. Bruce, and D.O. Anumba. 2005. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Human reproduction (Oxford, England)* 20:1372-1378.
  38. Fitzgerald, K.A., S.M. McWhirter, K.L. Faia, D.C. Rowe, E. Latz, D.T. Golenbock, A.J. Coyle, S.M. Liao, and T. Maniatis. 2003a. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology* 4:491-496.

39. Fitzgerald, K.A., D.C. Rowe, B.J. Barnes, D.R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P.M. Pitha, and D.T. Golenbock. 2003b. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *The Journal of experimental medicine* 198:1043-1055.
40. Flo, T.H., O. Halaas, E. Lien, L. Ryan, G. Teti, D.T. Golenbock, A. Sundan, and T. Espevik. 2000. Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164:2064-2069.
41. Flo, T.H., O. Halaas, S. Torp, L. Ryan, E. Lien, B. Dybdahl, A. Sundan, and T. Espevik. 2001. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *Journal of leukocyte biology* 69:474-481.
42. Franchimont, D., S. Vermeire, H. El Housni, M. Pierik, K. Van Steen, T. Gustot, E. Quertinmont, M. Abramowicz, A. Van Gossum, J. Deviere, and P. Rutgeerts. 2004. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53:987-992.
43. Fukata, M., Y. Hernandez, D. Conduah, J. Cohen, A. Chen, K. Breglio, T. Goo, D. Hsu, R. Xu, and M.T. Abreu. 2009. Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflammatory bowel diseases* 15:997-1006.
44. Fukata, M., A. Chen, A. Klepper, S. Krishnareddy, A.S. Vamadevan, L.S. Thomas, R. Xu, H. Inoue, M. Arditi, A.J. Dannenberg, and M.T. Abreu. 2006. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 131:862-877.
45. Gately, M.K., L.M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D.H. Presky. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annual review of immunology* 16:495-521.
46. Gilmore, T.D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684.

47. Girard, R., T. Pedron, S. Uematsu, V. Balloy, M. Chignard, S. Akira, and R. Chaby. 2003. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *Journal of cell science* 116:293-302.
48. Gohda, J., T. Matsumura, and J. Inoue. 2004. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173:2913-2917.
49. Goldstein, D.R., B.M. Tesar, S. Akira, and F.G. Lakkis. 2003. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *The Journal of clinical investigation* 111:1571-1578.
50. Grozdanov, L., C. Raasch, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker, and U. Dobrindt. 2004. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Journal of bacteriology* 186:5432-5441.
51. Grozdanov, L., U. Zahringer, G. Blum-Oehler, L. Brade, A. Henne, Y.A. Knirel, U. Schombel, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker, E.T. Rietschel, and U. Dobrindt. 2002. A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Journal of bacteriology* 184:5912-5925.
52. Hacker, H., and M. Karin. 2006. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2006:re13.
53. Hacker, H., V. Redecke, B. Blagoev, I. Kratchmarova, L.C. Hsu, G.G. Wang, M.P. Kamps, E. Raz, H. Wagner, G. Hacker, M. Mann, and M. Karin. 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439:204-207.
54. Hartmann, G., G.J. Weiner, and A.M. Krieg. 1999. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:9305-9310.
55. Hayashi, F., K.D. Smith, A. Ozinsky, T.R. Hawn, E.C. Yi, D.R. Goodlett, J.K. Eng, S. Akira, D.M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.

56. Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes & development* 18:2195-2224.
57. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh. 2006. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25:6758-6780.
58. Heine, H., C.J. Kirschning, E. Lien, B.G. Monks, M. Rothe, and D.T. Golenbock. 1999. Cutting edge: cells that carry A null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162:6971-6975.
59. Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
60. Hertz, C.J., S.M. Kiertscher, P.J. Godowski, D.A. Bouis, M.V. Norgard, M.D. Roth, and R.L. Modlin. 2001. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166:2444-2450.
61. Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, and A. Iwamatsu. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324:73-76.
62. Hirschfeld, M., Y. Ma, J.H. Weis, S.N. Vogel, and J.J. Weis. 2000. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165:618-622.
63. Hirschfeld, M., J.J. Weis, V. Toshchakov, C.A. Salkowski, M.J. Cody, D.C. Ward, N. Qureshi, S.M. Michalek, and S.N. Vogel. 2001. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and immunity* 69:1477-1482.
64. Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi. 2006. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25:349-360.

65. Hooper, L.V., and A.J. Macpherson. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews. Immunology* 10:159-169.
66. Horng, T., G.M. Barton, R.A. Flavell, and R. Medzhitov. 2002. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420:329-333.
67. Horng, T., G.M. Barton, and R. Medzhitov. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nature immunology* 2:835-841.
68. Chau, V., J.W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D.J. Ecker, D.K. Gonda, and A. Varshavsky. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243:1576-1583.
69. Chen, F., V. Castranova, X. Shi, and L.M. Demers. 1999. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical chemistry* 45:7-17.
70. Chen, G., and D.V. Goeddel. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296:1634-1635.
71. Chen, G., O. Zhuchenko, and A. Kuspa. 2007. Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science* 317:678-681.
72. Cheung, P.C., D.G. Campbell, A.R. Nebreda, and P. Cohen. 2003. Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *The EMBO journal* 22:5793-5805.
73. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162:156-159.
74. Imler, J.L., and J.A. Hoffmann. 2001. Toll receptors in innate immunity. *Trends in cell biology* 11:304-311.
75. Ip, Y.T., and R.J. Davis. 1998. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Current opinion in cell biology* 10:205-219.
76. Ishitani, T., G. Takaesu, J. Ninomiya-Tsuji, H. Shibuya, R.B. Gaynor, and K. Matsumoto. 2003. Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. *The EMBO journal* 22:6277-6288.

77. Janssens, S., and R. Beyaert. 2003. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Molecular cell* 11:293-302.
78. Johnson, L.N., M.E. Noble, and D.J. Owen. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85:149-158.
79. Jung, H.C., L. Eckmann, S.K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M.F. Kagnoff. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *The Journal of clinical investigation* 95:55-65.
80. Kagan, J.C., and R. Medzhitov. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125:943-955.
81. Karin, M., and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annual review of immunology* 18:621-663.
82. Karin, M., and F.R. Greten. 2005. NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews. Immunology* 5:749-759.
83. Kataoka, K., T. Muta, S. Yamazaki, and K. Takeshige. 2002. Activation of macrophages by linear (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *The Journal of biological chemistry* 277:36825-36831.
84. Kawai, T., and S. Akira. 2007. Signaling to NF- $\kappa$ B by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine* 13:460-469.
85. Kikuchi, T., T. Matsuguchi, N. Tsuboi, A. Mitani, S. Tanaka, M. Matsuoka, G. Yamamoto, T. Hishikawa, T. Noguchi, and Y. Yoshikai. 2001. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166:3574-3579.
86. Kim, B.S., S.W. Lim, C. Li, J.S. Kim, B.K. Sun, K.O. Ahn, S.W. Han, J. Kim, and C.W. Yang. 2005. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation* 79:1370-1377.
87. Kinnebrew, M.A., C. Ubeda, L.A. Zenewicz, N. Smith, R.A. Flavell, and E.G. Pamer. 2010. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against



- vancomycin-resistant Enterococcus infection. *The Journal of infectious diseases* 201:534-543.
88. Kirschning, C.J., H. Wesche, T. Merrill Ayres, and M. Rothe. 1998. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* 188:2091-2097.
  89. Kishimoto, K., K. Matsumoto, and J. Ninomiya-Tsuji. 2000. TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *The Journal of biological chemistry* 275:7359-7364.
  90. Kollwe, C., A.C. Mackensen, D. Neumann, J. Knop, P. Cao, S. Li, H. Wesche, and M.U. Martin. 2004. Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *The Journal of biological chemistry* 279:5227-5236.
  91. Krieg, A.M. 2000. The role of CpG motifs in innate immunity. *Current opinion in immunology* 12:35-43.
  92. Krieg, A.M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual review of immunology* 20:709-760.
  93. Kruis, W., P. Fric, J. Pokrotnieks, M. Lukas, B. Fixa, M. Kascak, M.A. Kamm, J. Weismueller, C. Beglinger, M. Stolte, C. Wolff, and J. Schulze. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53:1617-1623.
  94. Kruis, W., E. Schutz, P. Fric, B. Fixa, G. Judmaier, and M. Stolte. 1997. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 11:853-858.
  95. Kurt-Jones, E.A., L. Popova, L. Kwinn, L.M. Haynes, L.P. Jones, R.A. Tripp, E.E. Walsh, M.W. Freeman, D.T. Golenbock, L.J. Anderson, and R.W. Finberg. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature immunology* 1:398-401.
  96. Lakatos, P.L., L. Lakatos, F. Szalay, C. Willheim-Polli, C. Osterreicher, Z. Tulassay, T. Molnar, W. Reinisch, J. Papp, G. Mozsik, and P. Ferenci. 2005. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease:

- phenotype-genotype correlations. *World journal of gastroenterology : WJG* 11:1489-1495.
97. Laney, J.D., and M. Hochstrasser. 1999. Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* 97:427-430.
  98. Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K.A. Fitzgerald, B.G. Monks, C.F. Knetter, E. Lien, N.J. Nilsen, T. Espevik, and D.T. Golenbock. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature immunology* 5:190-198.
  99. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
  100. Leulier, F., and B. Lemaitre. 2008. Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nature reviews. Genetics* 9:165-178.
  101. Li, S., A. Strelow, E.J. Fontana, and H. Wesche. 2002. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:5567-5572.
  102. Lien, E., T.K. Means, H. Heine, A. Yoshimura, S. Kusumoto, K. Fukase, M.J. Fenton, M. Oikawa, N. Qureshi, B. Monks, R.W. Finberg, R.R. Ingalls, and D.T. Golenbock. 2000. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of clinical investigation* 105:497-504.
  103. Lund, J., A. Sato, S. Akira, R. Medzhitov, and A. Iwasaki. 2003. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 198:513-520.
  104. Lütticken, C., A. Krüttgen, C. Möller, P.C. Heinrich, and S. Rose-John. 1991. Evidence for the importance of a positive charge and an alpha-helical structure of the C-terminus for biological activity of human IL-6. *FEBS letters* 282:265-267.
  105. Mandel, L., and J. Travnicek. 1987. The minipig as a model in gnotobiology. *Die Nahrung* 31:613-618.
  106. Mansell, A., and B.J. Jenkins. 2013. Dangerous liaisons between interleukin-6 cytokine and toll-like receptor families: a potent combination in inflammation and cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 24:249-256.

107. Mason, J.M., and K.M. Arndt. 2004. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 5:170-176.
108. Massari, P., P. Henneke, Y. Ho, E. Latz, D.T. Golenbock, and L.M. Wetzler. 2002. Cutting Edge: Immune Stimulation by Neisserial Porins Is Toll-Like Receptor 2 and MyD88 Dependent. *The Journal of Immunology* 168:1533-1537.
109. McClelland, M., K.E. Sanderson, J. Spieth, S.W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R.K. Wilson. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413:852-856.
110. McCormick, B.A., C.A. Parkos, S.P. Colgan, D.K. Carnes, and J.L. Madara. 1998. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160:455-466.
111. McGettrick, A.F., E.K. Brint, E.M. Palsson-McDermott, D.C. Rowe, D.T. Golenbock, N.J. Gay, K.A. Fitzgerald, and L.A. O'Neill. 2006. Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC $\epsilon$  during Toll-like receptor 4 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:9196-9201.
112. McLaughlin, S., J. Wang, A. Gambhir, and D. Murray. 2002. PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 31:151-175.
113. McWhirter, S.M., K.A. Fitzgerald, J. Rosains, D.C. Rowe, D.T. Golenbock, and T. Maniatis. 2004. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:233-238.
114. Means, T.K., E. Lien, A. Yoshimura, S. Wang, D.T. Golenbock, and M.J. Fenton. 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163:6748-6755.

115. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews Immunology* 1:135-145.
116. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
117. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C.A. Janeway, Jr. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular cell* 2:253-258.
118. Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp. 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nature immunology* 5:503-507.
119. Michelsen, K.S., A. Aicher, M. Mohaupt, T. Hartung, S. Dimmeler, C.J. Kirschning, and R.R. Schumann. 2001. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *The Journal of biological chemistry* 276:25680-25686.
120. Miniats, O.P., and D. Jol. 1978. Gnotobiotic pigs-derivation and rearing. *Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de medecine comparee* 42:428-437.
121. Mittrucker, H.W., and S.H. Kaufmann. 2000. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *Journal of leukocyte biology* 67:457-463.
122. Mosavi, L.K., T.J. Cammett, D.C. Desrosiers, and Z.Y. Peng. 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13:1435-1448.
123. Mott, H.R., P.C. Driscoll, J. Boyd, R.M. Cooke, M.P. Weir, and I.D. Campbell. 1992. Secondary structure of human interleukin 2 from 3D heteronuclear NMR experiments. *Biochemistry* 31:7741-7744.
124. Moustakas, A., and C.H. Heldin. 2003. The nuts and bolts of IRF structure. *Nature structural biology* 10:874-876.
125. Mukhopadhyay, D., and H. Riezman. 2007. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315:201-205.

126. Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L.P. Ruco, P. Allavena, and A. Mantovani. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164:5998-6004.
127. Muzio, M., J. Ni, P. Feng, and V.M. Dixit. 1997. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278:1612-1615.
128. Nagpal, K., T.S. Plantinga, J. Wong, B.G. Monks, N.J. Gay, M.G. Netea, K.A. Fitzgerald, and D.T. Golenbock. 2009. A TIR domain variant of MyD88 adapter-like (Mal)/TIRAP results in loss of MyD88 binding and reduced TLR2/TLR4 signaling. *The Journal of biological chemistry* 284:25742-25748.
129. Nemoto, S., J.G. Vallejo, P. Knuefermann, A. Misra, G. Defreitas, B.A. Carabello, and D.L. Mann. 2002. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 282:H2316-2323.
130. Neutra, M.R., N.J. Mantis, A. Frey, and P.J. Giannasca. 1999. The composition and function of M cell apical membranes: implications for microbial pathogenesis. *Seminars in immunology* 11:171-181.
131. Nguyen, H., J. Hiscott, and P.M. Pitha. 1997. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine & growth factor reviews* 8:293-312.
132. O'Neill, L.A., and A.G. Bowie. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* 7:353-364.
133. Oganessian, G., S.K. Saha, B. Guo, J.Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng. 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439:208-211.
134. Ono, K., T. Ohtomo, S. Sato, Y. Sugamata, M. Suzuki, N. Hisamoto, J. Ninomiya-Tsuji, M. Tsuchiya, and K. Matsumoto. 2001. An Evolutionarily Conserved Motif in the TAB1 C-terminal Region is Necessary for Interaction with and Activation of TAK1 MAPKKK. *Journal of Biological Chemistry* 276:24396-24400.
135. Orskov, F., and I. Orskov. 1992. Escherichia coli serotyping and disease in man and animals. *Canadian journal of microbiology* 38:699-704.

136. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003a. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nature immunology* 4:161-167.
137. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003b. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *The Journal of biological chemistry* 278:49751-49762.
138. Ozinsky, A., D.M. Underhill, J.D. Fontenot, A.M. Hajjar, K.D. Smith, C.B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13766-13771.
139. Park, A.Y., and P. Scott. 2001. IL-12: keeping cell-mediated immunity alive. *Scandinavian journal of immunology* 53:529-532.
140. Paun, A., and P.M. Pitha. 2007. The IRF family, revisited. *Biochimie* 89:744-753.
141. Perera, P.Y., T.N. Mayadas, O. Takeuchi, S. Akira, M. Zaks-Zilberman, S.M. Goyert, and S.N. Vogel. 2001. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166:574-581.
142. Pierer, M., J. Rethage, R. Seibl, R. Lauener, F. Brentano, U. Wagner, H. Hantzschel, B.A. Michel, R.E. Gay, S. Gay, and D. Kyburz. 2004. Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172:1256-1265.
143. Pinhal-Enfield, G., M. Ramanathan, G. Hasko, S.N. Vogel, A.L. Salzman, G.J. Boons, and S.J. Leibovich. 2003. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *The American journal of pathology* 163:711-721.
144. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.

145. Ramirez Cruz, N.E., C. Maldonado Bernal, M.L. Cuevas Uriostegui, J. Castanon, C. Lopez Macias, and A. Isibasi. 2004. Toll-like receptors: dysregulation in vivo in patients with acute respiratory distress syndrome. *Revista alergologia Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico : 1993)* 51:210-217.
146. Redecke, V., H. Hacker, S.K. Datta, A. Fermin, P.M. Pitha, D.H. Broide, and E. Raz. 2004. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172:2739-2743.
147. Reichhart, J.M. 2003. TLR5 takes aim at bacterial propeller. *Nature immunology* 4:1159-1160.
148. Rembacken, B.J., A.M. Snelling, P.M. Hawkey, D.M. Chalmers, and A.T. Axon. 1999. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354:635-639.
149. Roach, J.C., G. Glusman, L. Rowen, A. Kaur, M.K. Purcell, K.D. Smith, L.E. Hood, and A. Aderem. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:9577-9582.
150. Rowe, D.C., A.F. McGettrick, E. Latz, B.G. Monks, N.J. Gay, M. Yamamoto, S. Akira, L.A. O'Neill, K.A. Fitzgerald, and D.T. Golenbock. 2006. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6299-6304.
151. Rumio, C., D. Besusso, M. Palazzo, S. Selleri, L. Sfondrini, F. Dubini, S. Menard, and A. Balsari. 2004. Degranulation of paneth cells via toll-like receptor 9. *The American journal of pathology* 165:373-381.
152. Sakurai, H., H. Miyoshi, J. Mizukami, and T. Sugita. 2000. Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase by TAB1. *FEBS letters* 474:141-145.
153. Samatey, F.A., K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, and K. Namba. 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* 410:331-337.

154. Sandkvist, M. 2001. Type II secretion and pathogenesis. *Infection and immunity* 69:3523-3535.
155. Santaolalla, R., and M.T. Abreu. 2012. Innate immunity in the small intestine. *Current opinion in gastroenterology* 28:124-129.
156. Seki, E., H. Tsutsui, Y. Imuro, T. Naka, G. Son, S. Akira, T. Kishimoto, K. Nakanishi, and J. Fujimoto. 2005. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41:443-450.
157. Shang, L., M. Fukata, N. Thirunarayanan, A.P. Martin, P. Arnaboldi, D. Maussang, C. Berin, J.C. Unkeless, L. Mayer, M.T. Abreu, and S.A. Lira. 2008. Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology* 135:529-538.
158. Sharma, S., B.R. tenOever, N. Grandvaux, G.P. Zhou, R. Lin, and J. Hiscott. 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300:1148-1151.
159. Shibuya, H., K. Yamaguchi, K. Shirakabe, A. Tonegawa, Y. Gotoh, N. Ueno, K. Irie, E. Nishida, and K. Matsumoto. 1996. TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* 272:1179-1182.
160. Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *The Journal of experimental medicine* 189:1777-1782.
161. Shimosato, T., M. Tohno, H. Kitazawa, S. Katoh, K. Watanabe, Y. Kawai, H. Aso, T. Yamaguchi, and T. Saito. 2005. Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. *Immunology letters* 98:83-89.
162. Shishido, T., N. Nozaki, S. Yamaguchi, Y. Shibata, J. Nitobe, T. Miyamoto, H. Takahashi, T. Arimoto, K. Maeda, M. Yamakawa, O. Takeuchi, S. Akira, Y. Takeishi, and I. Kubota. 2003. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 108:2905-2910.
163. Shoham, S., C. Huang, J.M. Chen, D.T. Golenbock, and S.M. Levitz. 2001. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response



- to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166:4620-4626.
164. Schlee, M., J. Wehkamp, A. Altenhoefer, T.A. Oelschlaeger, E.F. Stange, and K. Fellermann. 2007. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infection and immunity* 75:2399-2407.
  165. Schletter, J., H. Heine, A.J. Ulmer, and E.T. Rietschel. 1995. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Archives of microbiology* 164:383-389.
  166. Schoenemeyer, A., B.J. Barnes, M.E. Mancl, E. Latz, N. Goutagny, P.M. Pitha, K.A. Fitzgerald, and D.T. Golenbock. 2005. The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *The Journal of biological chemistry* 280:17005-17012.
  167. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C.J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of biological chemistry* 274:17406-17409.
  168. Smith, K.D., E. Andersen-Nissen, F. Hayashi, K. Strobe, M.A. Bergman, S.L. Barrett, B.T. Cookson, and A. Aderem. 2003. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature immunology* 4:1247-1253.
  169. Sterzl, J., and A.M. Silverstein. 1967. Developmental aspects of immunity. *Advances in immunology* 6:337-459.
  170. Sun, L., L. Deng, C.K. Ea, Z.P. Xia, and Z.J. Chen. 2004. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Molecular cell* 14:289-301.
  171. Sun, L., and Z.J. Chen. 2004. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Current opinion in cell biology* 16:119-126.
  172. Suzuki, N., S. Suzuki, G.S. Duncan, D.G. Millar, T. Wada, C. Mirtsos, H. Takada, A. Wakeham, A. Itie, S. Li, J.M. Penninger, H. Wesche, P.S. Ohashi, T.W. Mak, and W.C. Yeh. 2002. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416:750-756.

173. Takaesu, G., S. Kishida, A. Hiyama, K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto. 2000. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Molecular cell* 5:649-658.
174. Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T.W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434:243-249.
175. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* 17:1-14.
176. Takeuchi, O., T. Kawai, P.F. Muhlradt, M. Morr, J.D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International immunology* 13:933-940.
177. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R.L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169:10-14.
178. Tanner, D.E., W. Ma, Z. Chen, and K. Schulten. 2011. Theoretical and computational investigation of flagellin translocation and bacterial flagellum growth. *Biophysical journal* 100:2548-2556.
179. Teghanemt, A., D. Zhang, E.N. Levis, J.P. Weiss, and T.L. Gioannini. 2005. Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175:4669-4676.
180. Tesar, B.M., J. Zhang, Q. Li, and D.R. Goldstein. 2004. TH1 immune responses to fully MHC mismatched allografts are diminished in the absence of MyD88, a toll-like receptor signal adaptor protein. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 4:1429-1439.
181. Thoma-Uszynski, S., S.M. Kiertscher, M.T. Ochoa, D.A. Bouis, M.V. Norgard, K. Miyake, P.J. Godowski, M.D. Roth, and R.L. Modlin. 2000. Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165:3804-3810.

182. Tohno, M., T. Shimosato, H. Kitazawa, S. Katoh, I.D. Iliev, T. Kimura, Y. Kawai, K. Watanabe, H. Aso, T. Yamaguchi, and T. Saito. 2005. Toll-like receptor 2 is expressed on the intestinal M cells in swine. *Biochemical and biophysical research communications* 330:547-554.
183. Ulevitch, R.J., and P.S. Tobias. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annual review of immunology* 13:437-457.
184. Underhill, D.M., A. Ozinsky, A.M. Hajjar, A. Stevens, C.B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815.
185. Vabulas, R.M., P. Ahmad-Nejad, C. da Costa, T. Miethke, C.J. Kirschning, H. Hacker, and H. Wagner. 2001. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *The Journal of biological chemistry* 276:31332-31339.
186. Van Damme, J., M. De Ley, G. Opdenakker, A. Billiau, P. De Somer, and J. Van Beeumen. 1985. Homogeneous interferon-inducing 22K factor is related to endogenous pyrogen and interleukin-1. *Nature* 314:266-268.
187. Van Haver, E.R., P.T. Sangild, M. Oste, J.L. Siggers, A.L. Weyns, and C.J. Van Ginneken. 2009. Diet-dependent mucosal colonization and interleukin-1beta responses in preterm pigs susceptible to necrotizing enterocolitis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 49:90-98.
188. Wang, C., L. Deng, M. Hong, G.R. Akkaraju, J. Inoue, and Z.J. Chen. 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351.
189. Wehkamp, J., J. Harder, K. Wehkamp, B. Wehkamp-von Meissner, M. Schlee, C. Enders, U. Sonnenborn, S. Nuding, S. Bengmark, K. Fellermann, J.M. Schroder, and E.F. Stange. 2004. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infection and immunity* 72:5750-5758.
190. Werts, C., R.I. Tapping, J.C. Mathison, T.H. Chuang, V. Kravchenko, I. Saint Girons, D.A. Haake, P.J. Godowski, F. Hayashi, A. Ozinsky, D.M. Underhill, C.J. Kirschning, H. Wagner, A. Aderem, P.S. Tobias, and R.J. Ulevitch. 2001. Leptospiral

- lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nature immunology* 2:346-352.
191. Wesche, H., X. Gao, X. Li, C.J. Kirschning, G.R. Stark, and Z. Cao. 1999. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *The Journal of biological chemistry* 274:19403-19410.
  192. West, A.P., A.A. Koblansky, and S. Ghosh. 2006. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annual review of cell and developmental biology* 22:409-437.
  193. Wetzler, L.M. 2003. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine* 21 Suppl 2:S55-60.
  194. Wong, B.R., R. Josien, S.Y. Lee, M. Vologodskaya, R.M. Steinman, and Y. Choi. 1998. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *The Journal of biological chemistry* 273:28355-28359.
  195. Wyllie, D.H., E. Kiss-Toth, A. Visintin, S.C. Smith, S. Boussouf, D.M. Segal, G.W. Duff, and S.K. Dower. 2000. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165:7125-7132.
  196. Yamaguchi, K., K. Shirakabe, H. Shibuya, K. Irie, I. Oishi, N. Ueno, T. Taniguchi, E. Nishida, and K. Matsumoto. 1995. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270:2008-2011.
  197. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
  198. Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169:6668-6672.
  199. Yang, K., J. Zhu, S. Sun, Y. Tang, B. Zhang, L. Diao, and C. Wang. 2004. The coiled-coil domain of TRAF6 is essential for its auto-ubiquitination. *Biochemical and biophysical research communications* 324:432-439.

200. Yang, R.B., M.R. Mark, A. Gray, A. Huang, M.H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W.I. Wood, A.L. Gurney, and P.J. Godowski. 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395:284-288.
201. Ye, H., J.R. Arron, B. Lamothe, M. Cirilli, T. Kobayashi, N.K. Shevde, D. Segal, O.K. Dzivenu, M. Vologodskaya, M. Yim, K. Du, S. Singh, J.W. Pike, B.G. Darnay, Y. Choi, and H. Wu. 2002. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 418:443-447.
202. Yokota, T., N. Arai, F. Lee, D. Rennick, T. Mosmann, and K. Arai. 1985. Use of a cDNA expression vector for isolation of mouse interleukin 2 cDNA clones: expression of T-cell growth-factor activity after transfection of monkey cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:68-72.
203. Yonekura, K., S. Maki-Yonekura, and K. Namba. 2003. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 424:643-650.
204. Yoon, S.I., O. Kurnasov, V. Natarajan, M. Hong, A.V. Gudkov, A.L. Osterman, and I.A. Wilson. 2012. Structural basis of TLR5-flagellin recognition and signaling. *Science* 335:859-864.
205. Zarembek, K.A., and P.J. Godowski. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168:554-561.
206. Zhang, F.X., C.J. Kirschning, R. Mancinelli, X.P. Xu, Y. Jin, E. Faure, A. Mantovani, M. Rothe, M. Muzio, and M. Arditi. 1999. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *The Journal of biological chemistry* 274:7611-7614.
207. Zhong, Y., J. Huang, W. Tang, B. Chen, and W. Cai. 2012. Effects of probiotics, probiotic DNA and the CpG oligodeoxynucleotides on ovalbumin-sensitized Brown-Norway rats via TLR9/NF-kappaB pathway. *FEMS immunology and medical microbiology* 66:71-82.

208. Zhou, Z., X. Li, B. Liu, L. Beutin, J. Xu, Y. Ren, L. Feng, R. Lan, P.R. Reeves, and L. Wang. 2010. Derivation of Escherichia coli O157:H7 from its O55:H7 precursor. *PloS one* 5:e8700.
209. Zuo, G., J. Gong, C. Liu, C. Wu, S. Li, and L. Dai. 2003. Synthesis of Toll-like receptor 4 in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. *Chinese medical journal* 116:297-300.