



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper

Kloning av hästens TLR-4 som verktyg för  
att se betydelsen av hästens medfödda  
immunitet vid Recurrent Airway Obstruction

Cloning of horse TLR-4 as a tool to evaluate  
the innate immunity in horses with Recurrent  
Airway Obstruction

Hanna Arosenius

*Uppsala*

*2010*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697*

*Examensarbete 2011:3*



Kloning av hästens TLR-4 som verktyg för  
att se betydelsen av hästens medfödda  
immunitet vid Recurrent Airway Obstruction

Cloning of horse TLR-4 as a tool to evaluate  
the innate immunity in horses with Recurrent  
Airway Obstruction

Hanna Arosenius

*Handledare: Karin Ellencrona, Institutionen för kliniska vetenskaper  
Biträdande handledare: John Pringle, Institutionen för kliniska vetenskaper  
samt Anna Rosander, Institutionen för bakteriologi och livsmedelssäkerhet*

*Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010*

*Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap*

*Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: RAO, TLR-4, plasmidkloning, medfödda immuniteten*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>*

*ISSN 1652-8697*

*Examensarbete 2011:3*



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

|   |    |
|---|----|
| SAMMANFATTNING .....  | 1  |
| SUMMARY .....   | 1  |
| FÖRKORTNINGAR .....   | 2  |
| INLEDNING .....   | 3  |
| LITTERATURÖVERSIKT .....  | 4  |
| Recurrent airway obstruction - RAO .....                              | 4  |
| Patogenes .....   | 4  |
| Kliniska symptom .....  | 5  |
| Diagnos .....   | 5  |
| Behandling .....  | 6  |
| Medfödda immuniteten .....  | 6  |
| Makrofager och neutrofiler .....                                      | 6  |
| Receptorer i den medfödda immuniteten .....                           | 7  |
| Pro- inflammatoriska cytokiner .....                                  | 7  |
| TLR-4 .....   | 8  |
| Signalering genom TLR-4 .....   | 8  |
| Klinisk relevans TLR-4 .....  | 9  |
| Kloning och PCR .....   | 10 |
| Kloning .....   | 10 |
| PCR .....   | 11 |
| Reverse transkriptas PCR .....  | 12 |
| qPCR .....  | 12 |
| MATERIAL OCH METODER .....  | 14 |
| Framtagning av segment inför kloning .....                            | 14 |
| Primerdesign .....  | 14 |
| Isolering och stimulering av lymfocyter .....                         | 14 |
| RNA-extraktion .....  | 15 |
| Syntes av komplementärt DNA (cDNA) .....                              | 15 |
| PCR för att få fram segment för kloning .....                         | 16 |
| Kloning i en plasmid .....  | 17 |
| Odlingsmedium och ampicillinplattor .....                             | 17 |
| Transformerering och kloning .....                                    | 18 |
| Plasmidrening .....   | 19 |
| Visualisering av positiv kontroll med primrar för kvantifiering ..... | 19 |
| Testomgång för att se hur plasmiderna fungerar i en qPCR .....        | 20 |

|  |    |
|--|----|
| Frysning av bakteriekultur .....                                     | 22 |
| RESULTAT .....   | 22 |
| Isolering av och stimulering av lymfocyter .....                     | 22 |
| RNA-extraktion och PCR .....   | 22 |
| Kloning .....  | 23 |
| Framrening av klonad plasmid .....                                   | 23 |
| Visualisering av positiv kontroll med primrar för kvantifiering..... | 24 |
| Kvantifiering av prov med okänd mängd TLR-4 mRNA.....                | 24 |
| DISKUSSION.....  | 25 |
| TACK.....  | 28 |
| LITTERATURFÖRTECKNING.....   | 29 |

## **SAMMANFATTNING**

Recurrent Airway Obstruction, RAO, är en icke infektiös luftvägssjukdom hos häst. Sjukdomen karaktäriseras av perioder med reversibel luftvägsobstruktion och inflammation orsakad av bronkospasm och ansamling av mucus och neutrofiler i luftvägarna. Sjukdomsorsaken anses vara multifaktoriell med ett samspel mellan dålig miljö och en viss genetisk predisposition. Den immunologiska bakgrunden till sjukdomen är fortfarande oklar men både den förvärvade och medfödda immuniteten anses delta i luftvägsinflammationen. Toll-likareceptorer, TLR, hör till de viktigaste receptorerna i den medfödda immuniteten. Det finns ca 14 olika TLRs som var och en verkar som receptor för en eller flera specifika mikrobiella molekyler. TLR-4 är receptor för lipopolysackarider - endotoxinet hos Gramnegativa bakterier - men även för viralt protein, fibrinogen och heatshockproteiner. Då liganden binder till TLR-4 går en signal in i cellen som genom nukleär faktor  $\kappa$ B börjar bilda cytokiner. Det finns en stark koppling mellan exponering för endotoxin och RAO. I det här arbetet har en positiv kontroll för hästens TLR-4 mRNA tagits fram genom plasmidkloning. Plasmiden kan användas för att kvantifiera uttrycket av TLR-4 mRNA med kvantitativ-PCR från valda prover från häst, bland annat för att kunna utvärdera uttrycket av TLR-4 mRNA, och på så sätt den medfödda immuniteten, vid RAO.

## **SUMMARY**

RAO, Recurrent airway obstruction, is a non-infectious airway disease of horses. The disease is characterized by periods of reversible obstruction and inflammation of the small airways caused by bronchospasm and accumulation of mucus and neutrophils in the airways. The etiology of the disease is considered to be multifactorial with cooperation between dusty environment and a genetic predisposition. The immunological background of the disease is still ambiguous and both innate and acquired immunity have been implicated as contributing to airway inflammation. Toll-like receptors, TLRs, are among the most important receptors of the innate immunity. There are 14 different known TLRs, each of which is receptor to one or more specific microbial molecules. TLR-4 is a receptor to LPS, the endotoxin of gram-negative bacteria, but also a receptor to viral protein, fibrinogen and heat-shock-proteins. When the receptor is bound to its ligand, it will signal the cell to produce different cytokines through the NF $\kappa$ B pathway. There is a correlation between clinical manifestation of RAO and exposure of airways to endotoxins. In this work, a positive control of the TLR-4 mRNA of the horse has been produced by plasmid cloning. This plasmid can subsequently be used to quantify the expression of TLR-4 mRNA by using qPCR on samples from horses. The analysis can be used to more accurately measure the expression of TLR-4 mRNA in equine samples and thereby enhance the ability to evaluate contribution of the innate immunity to triggering airway inflammation in horses with RAO.

## FÖRKORTNINGAR

BAL = Bronkoalveolärt lavage  
Bp = Baspar  
CD-14 = Cluster of differentiation factor 14  
cDNA = Komplementärt DNA  
dsDNA = dubbelsträngat DNA  
E-värde = effektivitet av amplifiering vid qPCR  
GAPDH = Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
IAD = Inflammatory airway disease  
Ig = Immunoglobulin  
IL = Interleukin  
IFN = Interferon  
LPS = Lipopolysackarid  
MD-2 = Myeloid differentiation factor 2  
mRNA = Messenger ribonukleinsyra  
NFκB = Nukleär faktor κB  
PAMP = Pathogen associated molecular patterns  
PCR = Polymerase chain reaction  
qPCR = Quantitative polymerase chain reaction  
RAO = Recurrent airway obstruction  
RNA = Ribonukleinsyra  
RSV = Respiratoriskt syncytialt virus  
Th-cell = T-hjälparcell  
TIR = Toll-interleukin-receptor  
TLR = Toll lik receptor  
TNF = Tumor-nekrosis-factor



## INLEDNING

Recurrent Airway Obstruction (RAO) är en icke infektiös luftvägssjukdom hos häst. Sjukdomen karaktäriseras av perioder med reversibel luftvägsobstruktion och inflammation orsakad av spasm i bronkerna och ansamling av mucus och neutrofiler i luftvägarna (Reed et al 2010). Sjukdomsorsaken anses vara multifaktoriell med ett samspel mellan dålig miljö och en viss genetisk predisposition (Jost et al 2007). Den immunologiska bakgrunden till sjukdomen är fortfarande oklar men både den förvärvade och medfödda immuniteten anses bidra till luftvägsinflammationen.

Toll-likareceptorer (TLR) är huvudkomponenter för att initiera aktivitet av den medfödda immuniteten. Det finns ca 14 olika TLRs som verkar som receptorer för specifika mikrobiella molekyler, så kallade pathogen associated molecular patterns, (PAMPs). TLR-4 är receptor för lipopolysackarider (LPS) från Gramnegativa bakterier men även för viralt protein, fibrinogen och heatshockproteiner. Då PAMPs binder till TLR-4 går en signal in i cellen som genom nukleär faktor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) börjar bilda cytokiner (Tizard 2009).

Man vet idag inte så mycket om TLR-signalering hos hästar (Berndt et al 2006). TLR-4 mRNA kan hittas i lungvävnaden hos friska hästar (Singh Suri et al 2006). Uttrycket av TLR-4 hos hästar med RAO har dels visat sig vara oförändrat (Ainsworth et al 2006) och dels varit ökat (Berndt et al 2006, Ainsworth et al 2006) under olika tider i sjukdomsförloppet. Vid RAO finns en stark koppling mellan ökad inflammation och exponering av endotoxin i luftvägarna (Pirie et al 2003a, Pirie et al 2003b). Det är därför troligt att TLR kan ha en del i luftvägsinflammationen vid RAO, som tidigare ansetts ha en allergisk bakgrund.

Syftet med arbetet var att ta fram en positiv kontroll för uttrycket av TLR-4 mRNA genom att klonera in genen i en plasmid. De tidigare studier som är gjorda på uttryck av TLR-4 mRNA hos häst är inte utförda med en positiv kontroll. Med en positiv kontroll kan man kvantifiera uttrycket av TLR-4 mRNA genom att ha olika spädningar av plasmiden och därmed öka precisionen när man undersöker genuttryck av mekanismen för hästens luftvägsinflammation.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Recurrent airway obstruction - RAO

RAO, obstruktiv lungsjukdom eller kvickdrag som sjukdomen även kallas, är en icke infektiös luftvägssjukdom hos häst. Sjukdomen karakteriseras av perioder med reversibel obstruktion och inflammation av nedre luftvägarna orsakad av ansamling av mucus och neutrofiler samt spasm av den glatta muskulaturen som leder till att luftrören får mindre och mindre diameter (Reed et al 2010, Léguillette 2003). Sjukdomen drabbar medelålders till äldre hästar och förekommer i hela världen men med högst prevalens bland hästar som är uppstallade och fodras med hö (Reed et al 2010). Det finns ingen raspre disposition för sjukdomen men det tros finnas en viss genetisk predisposition (Reed et al 2010, Jost et al 2007).

### Patogenes

De bakomliggande orsakerna till sjukdomen är omdebatterade och inte helt klarlagda men orsaken tros vara multifaktoriell. Flera anser att det är en hypersensitivitetsreaktion på organiskt damm eller svampar som finns i dåligt lagrat hö (Reed et al 2010). Det finns en klar koppling mellan ökad inflammation i luftvägarna och exponering av endotoxin (Pirie et al 2003a, Pirie et al 2003b). Pirie et al (2003a) visade dock att endotoxin inte är hela orsaken till att sjukdomen utvecklas men att det har en betydande del i att framkalla den inflammationsbild som finns i luftvägarna vid sjukdom. Andra teorier som finns är att sjukdomen orsakas av ett onormalt immunsvår mot antigen som andats in, modulerat av T-lymfocyter via frisättning av proinflammatoriska cytokiner (Kleiber et al 2005).

Det finns flertalet studier där man tittat på T-lymfocytens roll i patogenesen vid RAO och huruvida sjukdomen karakteriseras av ett Th1 eller Th2 lymfocyt svar (Reed et al 2010). Th1 och Th2 celler är undergrupper till T-hjälparceller som är CD4-positiva. Dessa skiljs åt genom vilken blandning av cytokiner de utsöndrar. Th1 celler utsöndrar IL-2, IFN- $\gamma$  och TNF- $\beta$  vilket ger ett cellmedierat immunsvår. Th2 celler utsöndrar IL-4, IL-5, IL-10 och IL-13 och stimulerar proliferation av B-celler och antikroppssvar (Tizard 2009). Det som stödjer att RAO skulle vara karakteriserat av ett Th2 svar är ett ökat uttryck av IL-5 och IL-4 mRNA i lymfocyter från bronkoalveolärt lavage (BAL) med ett samtidigt minskat uttryck av IFN- $\gamma$  (Cordeau et al 2003, Lavoie et al 2001). Det finns olika resultat angående IgE och IgG-förekomst mot svampar i serum och BAL-vätska från hästar med RAO. Schmallenbach et al (1998) visade att det finns ett signifikant ökat IgG- och IgE-svar mot *Aspergillus fumigatus* i BAL-vätska men inte i serum hos hästar med RAO jämfört med kontrollhästar. Künzle et al (2007) såg däremot en signifikant ökad mängd IgE och IgG mot *Aspergillus fumigatus* i serum hos RAO-hästar. Höga nivåer av specifika immunoglobuliner talar för ett Th2-svar vid RAO (Künzle et al 2007, Schmallenbach et al 1998). Enligt workshoppen om allergiska sjukdomar på häst som hölls på Island 2007, är immunoglobulinernas roll i patogenesen för RAO kontroversiell och fler studier krävs för att kunna avgöra om det finns någon koppling mellan specifika IgE-nivåer och sjukdom (Marti et al 2008). Vad som tyder på att RAO skulle karakteriseras av ett Th1 svar är att Ainsworth et al (2003) fick en signifikant ökning av IFN- $\gamma$  uttryck i BAL-lymfocyter från kroniskt affekterade hästar med RAO samtidigt som de inte såg någon ökning av IL-4 och IL-13 uttryck.

Hos hästar med RAO har man sett en ökad koncentration av IL-8 mRNA i BAL-vätska. Denna ökning ses inte i det akuta stadiet av sjukdomen utan mer i kroniska stadier (Ainsworth et al 2003). Uttrycket av IL-8 i epitelceller i luftvägarna sågs signifikant ökat hos RAO-hästar 14 dagar efter att de utsatts för dammig hö jämfört med kontrollhästar (Ainsworth et al 2006). Cytokinet IL-8 kan komma från makrofager, neutrofiler eller epitelceller i luftvägarna. IL-8 är ett av de cytokin som har bäst effekt på att dra till sig neutrofiler och kan vara en av orsakerna till migration av neutrofiler till luftvägarna vid RAO (Reed et al 2010). I BAL-vätska har studier även visat ett signifikant ökat uttryck av både IL-17 och ett ökat uttryck av TLR-4 hos RAO-hästar jämfört med kontrollhästar (Ainsworth et al 2006). Ett ökat uttryck av IL-17 har också observerats hos RAO-hästar vid ett mer kroniskt stadium och kan vara en av orsakerna till det fortsatta inträdet av neutrofiler till luftvägarna (Reed et al 2010). Det ökade uttrycket av TLR-4 hos RAO-hästar har setts i studier både av Ainsworth et al (2006) och Berndt et al (2007). Andra studier som kan stödja det ökade uttrycket av TLR-4 är att Giguère et al (2002) såg ett ökat uttryck av IL-1 $\beta$  och TNF- $\alpha$ , vilka båda är cytokin som aktiveras genom signalering genom TLR-4. Man har även sett en uppreglering av transkriptionsfaktorn NF $\kappa$ B, vilken uppreglerar uttrycket av flera proinflammatoriska cytokiner exempelvis TNF- $\alpha$ , IL-1 och IL-8. Aktiviteten av NF $\kappa$ B i celler från bronkerna korrelerade med sjukdomsgraden och sjukdomsutvecklingen hos hästar med RAO. Dessutom kvarstod en ökad aktivitet av NF $\kappa$ B hos de flesta RAO-hästarna 21 dagar efter att hästarna utsatts för antigen (Bureau et al 2000).

### ***Kliniska symptom***

Hästar med RAO uppvisar kronisk spontan hosta, mucopurulent näsflöde och svårigheter att andas. Feber är ovanligt vid RAO. Vid kroniska fall kan hästen få hypertrofi av bukmuskulaturen (*m. abdominus obliquus*) på grund av ökad bukandning (Reed et al 2010, Léguillette 2003). Symptomen varierar från milda till kraftiga (Léguillette 2003). Andningsfrekvensen kan vara normal till ökad och man kan se träningsintolerans, nedsatt prestation, viktnedgång och fladdrande nosvingar (Reed et al 2010). Hästar med RAO ändrar andningsmönstret och får ofta en snabb inandning och en forcerad och förlängd utandning. Vid auskultation av lungorna hörs ibland visslande biljud över hela lungfälten, dessa blir tydligare om man använder en återandningspåse. Den bronkokonstriktion som ses vid RAO är inte lokal utan drabbar hela lungparenkymet vilket man måste ha i åtanke vid diagnos och behandling. Ett karaktäristiskt tecken för hästar med RAO är att symptomen förbättras om hästen flyttas till en bättre stallmiljö eller släpps ut på bete. Symptomen brukar förbättras inom en vecka efter miljöbyte (Léguillette 2003).

### ***Diagnos***

Diagnosen bygger på anamnes och kliniska symptom (Reed et al 2010, Léguillette 2003). Baserat endast på kliniska symptom kan det vara svårt att skilja RAO från kronisk pneumoni. Sjukdomarna kan skiljas åt genom att hästar med pneumoni oftast har feber samt växt av bakterier vid odling från de nedre luftvägarna. Tidiga symptom på RAO kan vara svårt att skilja från IAD, inflammatory airway disease, och andra luftvägsorsaker till nedsatt prestation. För att definitivt skilja RAO från IAD krävs BAL, bronkoalveolärt lavage (Léguillette 2003). BAL-undersökning

ger vid RAO en ospecifik bild med ökad mucus och procentuellt ökat antal intakta neutrofiler. Eosinofiler och mastceller ses oftast inte i ökat antal vid RAO (Reed et al 2010).

### **Behandling**

Den viktigaste behandlingen vid RAO är miljöombyte eller att minska på damm i hästens miljö. Det bästa är om hästen kan hållas ute så mycket som möjligt. Hästen bör inte utfodras med hö utan med pelleterat grovfoder alternativt bör grovfodret blötläggas innan utfodring. Ensilage kan också vara ett alternativ till hö. Om hästen hålls uppstallad bör den stå på tidningspapper eller spån för att minska på damm och svampar. Även andra hästar i stallet bör utfodras och stallas på likande sätt. Medicinsk behandling rekommenderas till hästar med kliniska symptom på RAO då miljöförändringar kan ta flera veckor att åtgärda. Den medicinska behandlingen utgörs av kortikosteroider för att minska inflammationen i lungorna. För att minimera de biverkningar som kan ses vid systemisk behandling rekommenderas inhalationssteroider med exempelvis en Aeromask<sup>TM</sup>. Terapeutisk effekt nås först efter 24 till 72 timmar. Även bronkodilaterande medel, exempelvis clenbuterol, rekommenderas som behandling vid RAO (Reed et al 2010).

### **Medfödda immuniteten**

Den medfödda immuniteten är kroppens första försvar mot invaderande mikroorganismer. Den första delen i kroppens försvar utgörs av de yttre och inre epitel som verkar som skyddande barriärer. Om mikroorganismer tar sig igenom dessa barriärer kommer den medfödda immuniteten att aktiveras inom några minuter för att bekämpa invasionen. Detta försvar utförs av fagocyterande celler som dels har möjlighet att fagocytera de invaderade organismerna och dels aktivera nästa steg i den medfödda immuniteten nämligen inflammationen. Det är endast då det medfödda försvaret inte klarar av att bekämpa invasionen av mikroorganismer som den adaptiva immuniteten aktiveras (Janeway et al 2005). Den medfödda immuniteten ger ett snabbt svar vid en infektion men bidrar inte till lika starkt skydd som den förvärvade immuniteten gör. Den medfödda immuniteten saknar även minne vilket medför att den akuta inflammationen kommer vara lika oavsett hur ofta en specifik patogen invaderar värdjuret (Tizard 2009).

### **Makrofager och neutrofiler**

Makrofager och neutrofiler är de celler som anses vara en del av den medfödda immuniteten. Dessa celltyper har en nyckelroll i den medfödda immuniteten då de kan känna igen, fagocytera och förstöra många patogener utan hjälp av den adaptiva immuniteten. Makrofagerna härstammar från cirkulerande monocyter som har lämnat blodbanan för att migrera ut i vävnader runt om i kroppen. Makrofager förekommer i stora mängder i bindväv, i submucosan i magtarmkanalen, i lungorna, längs blodkärlen i levern samt i mjälten. Makrofager är den första cellen som invaderande mikroorganismer stöter på (Janeway et al 2005). I lungorna är makrofagens fagocyterande förmåga nödvändig för att upprätthålla en steril miljö och ett effektivt gasutbyte (Zhang et al 2000).

Neutrofiler finns normalt i blodbanan och attraheras till platsen för infektion genom de cytokiner som en aktiverad makrofag sänder ut (Janeway et al 2005, Tizard 2009). Neutrofiler bildas från stamceller i benmärgen och migrerar ut i blodbanan där de stannar i ungefär 12 timmar innan de tar sig ut i vävnaden där de dör efter några dagar. TLRs finns uttryckta på de myeloida stamcellerna. När PAMPs binder till dessa receptorer stimuleras stamcellerna att bilda fler neutrofiler. TLRs kan på så sätt se till att cellerna i den medfödda immuniteten snabbt ersätts av nya celler som svar på infektion (Tizard 2009).

Neutrofiler och makrofager känner igen patogener genom cellytereceptorer som kan skilja på kroppsegna och invaderande strukturer. Exempel på sådana receptorer är CD14 och TLR-4. Då bakterier eller bakteriekomponenter binder till makrofagen eller neutrofilen stimuleras dessa till fagocytos samt produktion av proinflammatoriska cytokiner. (Janeway et al 2005)

### ***Receptorer i den medfödda immuniteten***

Inflammationen aktiveras då kroppen känner av signaler från invaderande mikroorganismer eller från döda och döende celler. Makrofager, dendritiska celler och mastceller, som finns ute i vävnaden, kan känna igen invaderande mikroorganismer genom att de har receptorer som känner igen strukturer som associeras med invasion, PAMPs (Tizard 2009). När en mikroorganism binder till receptorn kan det stimulera cellen till fagocytos. Andra receptorer är kemotaktiska och kan attrahera celler till platsen för infektion. En tredje funktion som receptorer kan ha är att inducera produktion av effektormolekyler som bidrar till en utökad medfödd immunitet samt till initiering av det förvärvade immunsvaret (Janeway et al 2005). TLRs är de viktigaste receptorerna för att känna igen PAMPs. Dessa beskrevs första gången hos en fruktfluga, *Drosophila*. Det finns 14 olika TLRs och varje TLR är receptor för ett eller flera mikrobiella proteiner. Receptorerna finns uttryckta på cellytor, men även inne i celler för att kunna känna igen mikroorganismer som tar sig in intracellulärt. När en cellyte-TLR binder en mikrobiell PAMP går en signal in i cellen som resulterar i aktivering av transkriptionsfaktorer som gör att gener för proinflammatoriska cytokiner uttrycks (Tizard 2009).

### ***Pro- inflammatoriska cytokiner***

Cytokiner är små proteiner som utsöndras från olika celler i kroppen, vanligen som svar på stimuli, och utövar effekt genom att binda specifika receptorer antingen på den egna cellen, på celler i närheten eller på celler långt borta. Några av de cytokiner som utsöndras från makrofager är IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  samt IL-8 (numer CXCL-8) (tabell 1) (Janeway et al 2005). LPS, en cellväggskomponent hos Gramnegativa bakterier, ger en potent stimulering för att alveolarmakrofagerna ska bilda TNF- $\alpha$  (Zhang et al 2000).

Tabell 1. Olika cytokiners effekt

| Cytokin       | Effekt   | Systemisk effekt  |
|---------------|--|---|
| IL-1 $\beta$  | Aktiverar endotelet  | Feber   |
|               | Aktiverar lymfocyter   | Produktion av IL-6  |
|               | Bryter ner lokal vävnad  | Inflammation  |
|               | Ökar tillgången på effektorceller  |   |
| TNF- $\alpha$ | Aktiverar endotel och ökar vaskulära permeabiliteten, vilket leder till ökat antal IgG, komplement och celler samt ökad genomströmning till lymfknutor | Feber<br>Mobilisering av metaboliter<br>Chock<br>Inflammation |
|               |  |   |
| IL-6          | Aktiverar lymfocyter   | Feber   |
|               | Ökar antikropsproduktionen   | Inducerar produktion av akutfasproteiner                      |
| CXCL-8 (IL-8) | Drar till sig neutrofiler, basofiler och T-celler genom kemotaxi   |   |
| IL-12         | Aktiverar NK-celler  |   |
|               | Inducerar differentiering av CD4 T-celler till TH1 celler  |   |

#### TLR-4

TLR har en nyckelroll i att känna igen invaderande mikroorganismer och aktivera inflammation. TLR-4 är receptor för LPS men även för viralt protein, fibrinogen och heat-shock-proteiner (proteiner som syntetiseras av celler vid olika typer av fysiologisk stress, de verkar som chaperoner och hjälper till att flytta proteiner mellan olika delar av cellen) (Tizard 2009). LPS utgör bakteriers endotoxin vilket frisätts då bakterierna lyseras (Quinn et al 2002).

Genen för TLR-4 hos häst sitter på kromosom 25. Genen har tre exoner och två introner (GenBank nr NC 009168 region: 21966163..21976508). Exonerna utgör den sekvens som kodar för proteiner medan intronerna klipps bort vid mRNA-syntesen (Griffiths et al 2005). Studier har visat att det finns en polymorfism i nukleotidsekvensen för TLR-4 hos häst (Werners et al 2006). Werners et al (2006) visade på åtta olika genotyper av TLR-4 som ger ändrad aminosyrasekvens i fyra positioner. Ingen av mutationerna har dock korreleras till ändrat LPS-svar mätt i helblod.

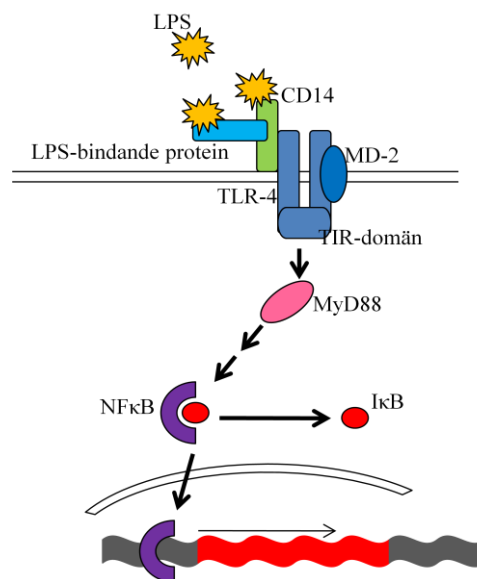
#### Signalering genom TLR-4

För att TLR-4 ska kunna känna igen LPS krävs hjälp från co-receptorerna MD-2 och CD-14 (Chaudhuri et al 2007, Fitzgerald et al 2004). LPS binder till CD-14 genom ett LPS-bindande protein. CD-14 binder i sin tur in till TLR-4 vilket ger en fortsatt signal in i cellen (figur 1). CD-14 finns bland annat i löslig form i blodet för att öka på LPS-svaret i celler som saknar uttryck av CD-14 (Fitzgerald et al 2004).

Då PAMPs binder till TLR-4 signalerar den in i cellen som genom NF $\kappa$ B börjar bilda cytokiner. NF $\kappa$ B hör till en familj av fem transkriptionsfaktorer som har en central roll i inflammation och immunitet. NF $\kappa$ B förekommer i cellens cytoplasma som en inaktiv form bunden till I $\kappa$ B. Det finns mer än 150 olika stimuli som kan aktivera NF $\kappa$ B där TLR och inflammatoriska cytokiner hör till de

klassiska vägarna för aktivering. Signalerna som induceras av dessa gör att I $\kappa$ B släpper NF $\kappa$ B vilket leder till att NF $\kappa$ B kan ta sig in i cellkärnan och aktivera olika gener, exempelvis generna för cytokinerna IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, IL-33, TNF- $\alpha$ , och IL-4 (figur 1) (Tizard 2009, Janeway et al 2005).

Den cytoplasmatiske delen av en TLR känns igen som en TIR-domän då den även återfinns i den cytoplasmatiske delen av till IL-1 receptorn. Då en ligand binder till TLR kommer TIR-domänen att aktivera MyD88 som initierar en signal-kaskad in i cellen (figur 1). Detta resulterar i en aktivering av NF $\kappa$ B (Janeway et al 2005). TIR-domänen medför att IL-1 och TLR har samma signaleringsväg för aktivering av NF $\kappa$ B (Tizard 2009, Janeway et al 2005, Chaudhuri et al 2007).



*Figur 1. Illustration av aktivering och signalering genom TLR-4. TLR-4 aktiveras då LPS binder till TLR-4 via LPS-bindande protein och CD-14. Den cytoplasmatiske delen av TLR är en TIR-domän som signalerar vidare in i cellen att aktivera transkriptionsfaktorn NF $\kappa$ B via MyD88. NF $\kappa$ B åter då in i cellkärnan och aktiverar gener för olika cytokiner (modifierad från Tizard 2009, Janeway et al 2005).*

#### **Klinisk relevans TLR-4**

Man vet idag inte så mycket om TLR-signalering hos hästar (Berndt et al 2006). TLR4 mRNA kan hittas i lungvävnaden hos friska hästar (Singh Suri et al 2006). Hos hästar med RAO däremot har uttrycket av TLR-4 dels visat sig vara oförändrat (Ainsworth et al 2006) och dels varit ökat (Berndt et al 2006, Ainsworth et al 2006) under olika tider i sjukdomsutvecklingen. Det signifikant ökade uttrycket av TLR-4 hos RAO-hästar sågs endast i det akuta stadiet av sjukdomen (Berndt et al 2006). Man har även sett att friska hästar som stimulerats med LPS intravenöst har ett högre uttryck av TLR-4 i lungvävnaden jämfört med kontroller (Singh Suri et al 2006). Vid RAO finns det en stark koppling mellan ökad inflammation och exponering av endotoxin i luftvägarna (Pirie et al 2003a, Pirie et al 2003b). Det ökade uttrycket av TLR-4 i lungvävnaden hos hästar med RAO kan bidra till ökad produktion av IL-8 vilket ger en överdriven inflammation

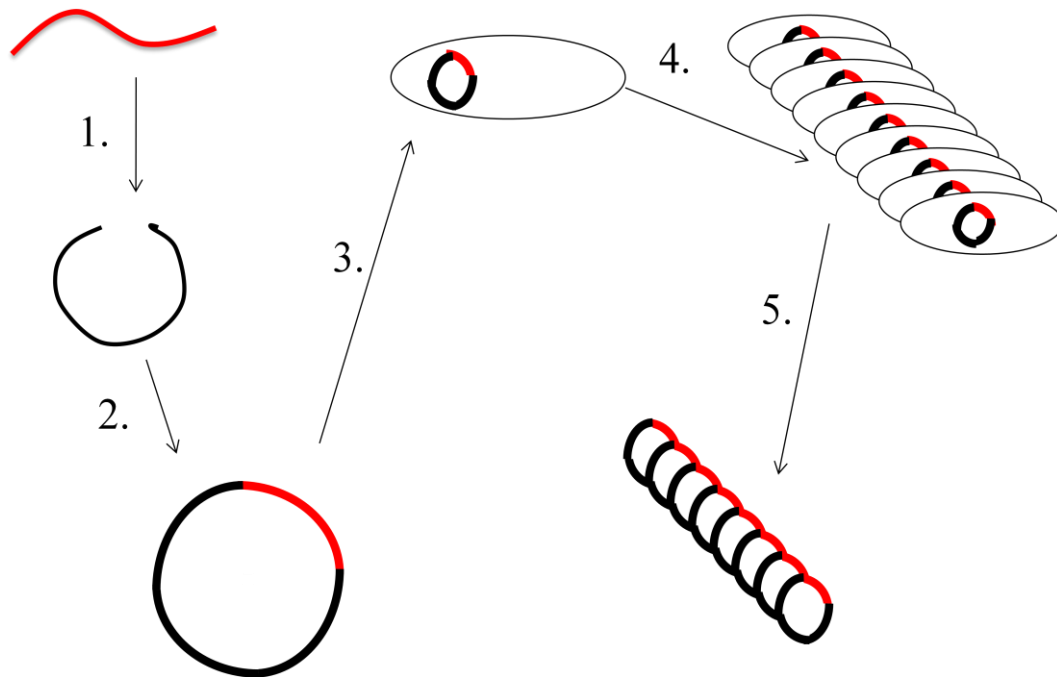
med neutrofiler som svar vid inandning av stalluft innehållande mycket endotoxin (Berndt et al 2006). Man har sett att hästar som behandlats med glukokortikoider fått ett minskat uttryck av TLR-4 i lungvävnaden (Singh Suri et al 2006). På humansidan har man sett att vissa luftvägspatogener, exempelvis respiratoriskt syncytialt virus (RSV), kan uppreglera uttrycket av TLR-4 i epitelet och på så sätt göra luftvägarna mer känsliga för endotoxin. Man har även kunnat koppla RSV till varför astma utvecklas (Monick et al 2003). På humansidan har man också sett att patienter med sepsis och samtidig peritonit har haft ökat uttryck av TLR-4 på perifera cirkulerande monocyter och vävnadsmakrofager (Tsujimoto et al 2005). Hos neonatala septiska föl har man sett en fem gånger så stort uttryck av TLR-4 jämfört med kontrollföl (Gold et al 2007). Endotoxinstudier har utförts på marsvin och möss där man tillfört ett nytt ämne, TAK-242, som inhiberar signalering via TLR-4 och på så sätt stoppar frisättning av inflammatoriska mediatorer. Både marsvin och möss har i dessa studier visat mindre symptom på endotoxemi samt haft större överlevnad (Kuno et al 2009, Sha et al 2007). Då TAK-242 testades på människor med sepsis kunde man dock inte se någon signifikant skillnad mellan grupperna avseende överlevnad (Rice et al 2010).

## **Kloning och PCR**

### ***Kloning***

Plasmider är små DNA-molekyler som kan replikera DNAt oberoende av bakteriens kromosom (Griffiths et al 2005). De flesta plasmider är dubbelsträngade cirkulära molekyler men det finns även plasmider som är linjära (Primrose & Twyman 2006). Grunden i genkloning bygger på att man har ett DNA-fragment av genen man vill klonas och för in det i en cirkulär DNA-molekyl, en vektor, och bildar en rekombinant DNA-molekyl. Vektorn förs sedan in i en värdcell, oftast en bakterie. När bakterien växer till kommer även den rekombinanta DNA-molekylen att kopieras upp vilket leder till att man får ett stort antal kopior av klonen (figur 2) (Brown 2001).

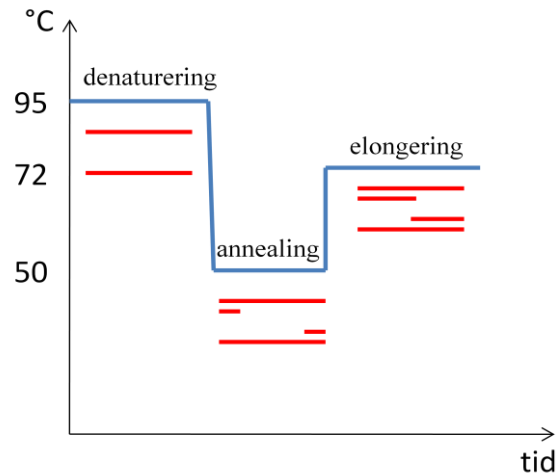




Figur 2. Schematisk bild över strategin vid kloning. 1-2. En vald DNA-sekvens ligeras in i en vektor som innehåller en gen för antibiotikaresistens. 3. Vektorn förs in i *Escherichia coli*-celler vilket även kallas transformering. 4. Bakterierna odlas på antibiotikamedium. 5. Plasmiderna renas fram från bakterierna (modifierad från Brown 2001).

### PCR

Segmentet man vill klonas tas enklast fram genom en PCR-reaktion. PCR är en teknik för att amplifiera upp ett visst DNA-segment genom en reaktion i olika temperaturcyklar (figur 3). Till reaktionen behöver man ha en buffert som håller pH jämnt under reaktionens gång, fria nukleotider (dNTP) till att bygga nya DNA-strängar med, polymeras som bygger de nya DNA-strängarna samt utvalda primrar till det segment man vill amplifiera. Primrar är korta syntetiserade nukleotidsekvenser som är komplementär till ytterändan av sekvensen man vill amplifiera upp. Polymeras är det enzym som kan bygga på nukleotider till primrarna med den befintliga DNA-sekvensen som mall. Reaktionen sker i olika temperaturcykler. Först höjs temperaturen till 95°C så att DNA-strängarna säras från varandra, denaturering. Då temperaturen sänks till den temperatur som är optimal för primrarna kommer dessa att binda in till varje 3'-ände på det segment man vill amplifiera upp, annealing. Efter annealingen höjs temperaturen till ca 72°C, vilken är den optimala temperaturen för det polymeras som bygger på DNA-sekvensen efter den "mall" som DNA-strängen utgör, elongering. Den nya kopian av sekvensen kan i nästa temperaturcykel användas som mall vilket gör att ökningen av kopior sker exponentiellt (Kubista et al 2006, Primrose & Twyman 2006, Griffiths et al 2005, Brown 2001).



Figur 3. Schematisk bild över PCR. Först denatureras DNA-segmenten vid 95°C. Sedan sänks temperaturen så att primrarna binder in, så kallad annealing. Vid 72°C kommer polymeraset att förlänga DNA-strängarna så att det bildas flera kopior av samma segment (modifierad från Kubista et al 2006).

Specificiteten vid PCR beror på vilka primrar man använder. Det finns några viktiga punkter som är bra att uppfylla då primrar designas. Primrarna bör vara mellan 17 till 30 nukleotider i längd. Innehållet av nukleotiderna guanin (G) och cytosine (C) bör vara kring 50 % för att inte få en för låg smältpunkt. Långa sekvenser med enskilda nukleotider bör undvikas. Primrar med sekundära strukturer, det vill säga att de kan binda tillbaka på sig själva, bör undvikas. De två primrarna ska heller inte vara komplementära, det vill säga att de inte ska kunna binda till varandra (Primrose & Twyman 2006).

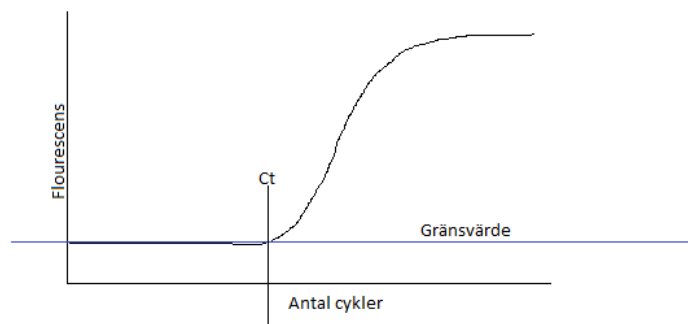
### **Reverse transkriptas PCR**

Då RNA ska analyseras måste det göras om till cDNA. Detta görs dels för att RNA är instabilt och känsligt för RNAsor som bryter ner RNAt och dels för att bra tekniker för att direkt amplifiera RNA-molekyler inte finns. Syntetiseringen av cDNA från RNA görs i en speciell PCR med ett specifikt enzym, reverse transcriptas, som bildar en komplementär DNA-sekvens till RNAt (Griffiths et al 2005). För att kopiera upp allt RNA som finns i provet används dT-Oligoprimrar. Dessa består av nukleotidkedjor som endast är Thymin (T). Detta för att ytterändorna på RNAt har långa svansar av Adenin (A).

### **qPCR**

Plasmiden kan användas för att kvantifiera uttrycket av TLR-4 med kvantitativ-PCR från valda prover från häst. qPCR bygger på att man amplifierar en specifik DNA-sekvens under olika temperaturcyklar för att få ett stort antal identiska kopior. För att registrera mängden produkt behövs något som binder in till produkten och som fluorescerar, antingen en fluorescensmärkt probe som binder in specifikt till den sekvens man är intresserad av eller någon färg, exempelvis SYBR Green, som fluorescerar när den binder in till dubbelstängat DNA som finns i provet. Under PCR-analysens gång kommer fluorescensen detekteras och motsvara den mängd produkt som bildats. Signalen återspeglas som en exponentiell kurva. Till en början kommer den flourescerande signalen inte att

kunna skiljas från bakgrunden. När tillräckligt stor mängd bildats kommer den fluorescerande signalen öka exponentiellt till dess att den planar ut på grund av att något i reaktionen saknas. Det antal cykler som krävs för att komma över bakgrundssignalen motsvarar provets  $C_T$ -värde (figur 4). Värdet på  $C_T$  beror på hur mycket material man har i provet från början (D'haene et al 2010, Kubista et al 2006, Primrose & Twyman 2006). Har man ett för högt  $C_T$ -värde kommer man inte att kunna dra några större slutsatser på grund av för mycket bakgrundsbrus eftersom det tar för många cykler innan man börjar detektera något i provet (Primrose & Twyman 2006). Under analysen har man även ett antal prover med känd mängd av ämnet man vill analysera. Dessa prover används till att upprätta en standardkurva. Standardkurvan bygger på att man vet hur många kopior av ämnet man vill analysera som finns i varje prov. Proverna för standardkurvan är lättast att ta fram genom en spädningsserie (Kubista et al 2010, Primrose & Twyman 2006). Standardkurvan fås genom att rita in  $C_T$  värden mot logaritmerade koncentrationen/innehållet av det kända provet i ett diagram (D'haene et al 2010, Kubista et al 2006, Primrose & Twyman 2006). Detta ger en rät linje och lutningen på linjen ger ett E-värde som representerar reaktionens effektivitet. E-värdet säger om det bildats så många kopior som är möjligt enligt givna koncentrationer för standardkurvan (Primrose & Twyman 2006, D'haene et al 2010). Ett optimalt E-värde (100 %) betyder att allt DNA fördubblat sig varje cykel. Ett E-värde mellan 90 % och 110 % anses acceptabelt (D'haene et al 2010).



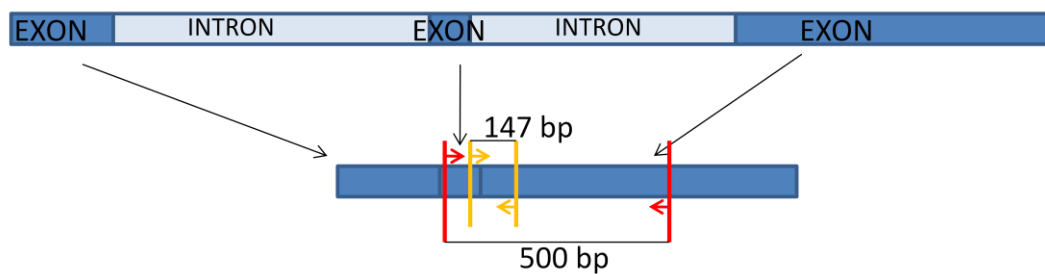
Figur 4. Exempel på hur resultatkurvor från qPCR kan se ut. Den cykel där mätningen går över bakgrunddetektionen representerar provets  $C_T$ .

## MATERIAL OCH METODER

### Framtagning av segment inför kloning

#### Primerdesign

Primrar designades så att den klonade delen ligger inom exonavsnittet för genen (figur 5). Genen för TLR-4 har två intronavschnitt och tre exonavschnitt vilket möjliggör två platser till att designa primrar som löper över två exonavschnitt. Det klonade segmentet var 501 baspar (bp) långt. Primrar designades med hjälp av hemsidan [Primer3](http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/primer/primer3_www.cgi) [Input](http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/primer/primer3_www.cgi) ([http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/primer/primer3\\_www.cgi](http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/primer/primer3_www.cgi)) samt information om genen för TLR-4 från PubMed (GenBank acc. No NC 009168.2 region: 21966163..21976508 och AY005808). Vid analyser där plasmiden ska användas som positiv kontroll används andra primrar än de som användes för att ta fram segmentet som klonades. Det är viktigt att dessa primrar är specifika för att säkerställa att man analyserar rätt sak. Dessa primrar ska ligga innanför det klonade avsnittet och minst en av primrarna ska ligga över gränsen mellan två exoner för att säkerställa att det är mRNA som analyseras. Segmentet för senare analyser är 147 baspar långt. Gränsen mellan exon 2 och 3 ligger i forward primer där exon 2 slutar på CCAGG och exon 3 börjar med TGTG. Primrarna redovisas i tabell 2.



Figur 5. Schematisk illustration över mRNA-sekvensen för TLR-4 och hur primrar för kloning och kvantifiering ligger i förhållande till varandra. De röda pilarna motsvarar de primrar som användes för att få fram det segment som klonades. De gula pilarna motsvarar de primrar som används vid analyser. Notera att den gula forward-primern ligger över en gräns mellan två exoner för att säkerställa att det är mRNA som detekteras.

Tabell 2. Primrar för att få fram kloningssegment och senare analyser

|               | Sekvens               | smältpunkt |
|---------------|-----------------------|------------|
| TLR-4 fwd 215 | ACTTACCAATGCATGGACCT  | 55,3°C     |
| TLR-4 rvs 715 | TAAGGGCATTGTGATGTAGCA | 53,2°C     |
| TLR-4 fwd 353 | CTGGATTTGTCCAGGTGTG   | 56,0°C     |
| TLR-4 rvs 499 | CAGCGTCTGTAAACTGGAGA  | 57,3°C     |

#### Isolering och stimulering av lymfocyter

Blod togs med hepariniserade vacutainerrör från friska hästar. Lymfocyterna isolerades från blodet med Ficoll-Plaque<sup>TM</sup> Plus (GE Healthcare) enligt tabell 3. För att få rätt koncentration av celler i förhållande till medium räknades cellerna i Bürker-kammare. Lymfocyterna ( $1 \times 10^6$ /ml) inkuberades med 100 ng/ml LPS i 20

timmar samt 40 timmar i 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Att cellerna inkuberades olika länge var för att säkerställa att TLR-4 skulle uttryckas samt för att cellerna samtidigt skulle användas för att studera andra gener som eventuellt krävde längre inkuberingstid. Efter inkuberingen lagrades lymfocyterna i RNAlater för att inte RNA i cellerna skulle förstöras innan det extraherades från cellerna.

*Tabell 3. Protokoll för isolering av lymfocyter*

---

|    |  |
|----|--|
| 1. | Späd ut blodet 1:1 i PBS (utan Ca och Mg, i rumstemperatur)  |
| 2. | Tillsätt 2,5 ml Ficoll-Plaque Plus till 5 ml blod/PBS. Blodlösningen skall försiktigt läggas ovanpå Ficoll-Plaque Plus så att vätskorna inte blandas                 |
| 3. | Centrifugera 1800rpm, 45 min utan broms  |
| 4. | Samla PBMC-bandet med hjälp av en pasteurpipette och för över till ett mjölkkrör. Fyll upp med 8-10 ml PBS   |
| 5. | Skölj cellerna 3 gånger i PBS, centrifugera först 1000 rcf, 10 min sedan 2*1500 rcf, 5 min och bromsa. Häll av övre vätskan och fyll på med ny PBS mellan omgångarna |
| 6. | Lös upp cellpelleten i 1 ml medium (RPMI - Roswell Park Memorial Institute)  |
| 7. | Räkna celler med Türk, (10 µl celler till 90 µl Türk)  |
| 8. | Justera till 1*10 <sup>6</sup> celler/ml medium  |

---

### **RNA-extraktion**

Det totala RNA-innehållet från celler stimulerade i 20 timmar respektive 40 timmar, extraherades från med RNeasy Mini Kit (Qiagen) enligt manual. Metoden bygger på att cellerna lyseras i en speciell buffert som förstör RNAs för att säkerställa intakt RNA. Provet överförs sedan till en kolonn där RNA längre än 200 baspar binder till ett membran som möjliggör att cellrester och kontaminanter kan sköljas bort. RNA sköljs sedan ut från membranet ner i ett uppsamlingsrör med RNas-fritt vatten.

Cellerna (0,5x10<sup>7</sup> celler vid varje extraktion) pelleterades i ett 2 ml eppendorfrör i 5 min 1500 rpm. Cellerna löstes upp i 350µl buffer RLT. 350 µl 70 % etanol tillsattes till de lyserade cellerna och blandades genom pipettering. Från provet överfördes 700 µl till en RNeasy spinnskolonn placerad i ett uppsamlingsrör. Kolonnen centrifugerades i 10000 rpm i 15 sek. Vätskan som runnit igenom kasserades. Efter centrifugeringen tillsattes 700 µl buffert RW1 till kolonnen som sedan centrifugerades i 10000 rpm i 15 sek. Vätskan som runnit igenom kasserades. 500 µl buffert RPE sattes till kolonnen i två omgångar med centrifugering (10000 rpm i först 15 sek sedan 2 min) och tömning av vätska som runnit igenom mellan omgångarna. RNeasy spinnskolonnen centrifugerades därefter torr i full hastighet i 1 min. Spinnskolonnen placerades därefter i ett nytt uppsamlingsrör och RNA eluerades ut med RNas-fritt vatten genom centrifugering 10000 rpm i 1 min. Mängden RNA från extraktionen mättes med spektrofotometer (Picodrop<sup>TM</sup>).

### **Syntes av komplementärt DNA (cDNA)**

cDNA syntetiserades från RNA från celler stimulerade med LPS i 20 timmar med reverse transkriptas PCR med dT-Oligoprimrar. Syntesen skedde i en PCR-cykel om 55°C i 30 min med SuperScript<sup>®</sup> III One-Step RT-PCR System with

Platinum<sup>®</sup> *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). Olika mängder prov användes vid syntetiseringen i två olika reaktioner, en med 5 µl RNA-prov och en med 10 µl RNA-prov. Se tabell 4 för PCR-mix.

Tabell 4. PCR-mix för syntetisering av cDNA

| Substans                          | Reaktion 1 | Reaktion 2 |
|-----------------------------------|------------|------------|
|                                   | Mängd      | Mängd      |
| dT Oligoprimmer                   | 2 µl       | 2 µl       |
| 2X Reaction Mix                   | 25 µl      | 25 µl      |
| Prov (RNA-20 tim, 183,7 ng/µl)    | 5 µl       | 10 µl      |
| Superscript III RT <i>Taq</i> Mix | 2 µl       | 2 µl       |
| Destillerat H <sub>2</sub> O      | 16 µl      | 11 µl      |
| Total volym                       | 50 µl      | 50 µl      |

cDNA-syntesen för RNA från celler stimulerade med LPS i 40 timmar utfördes med QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription (Quiagen) enligt manualen. I korta drag: 6 µl RNA 40 timmar blandades med 2 µg DNA Wipeout Buffert 7x och 6 µl RNase-fritt vatten och inkuberades i 42°C i 2 minuter. Efter inkuberingen blandades dessa 14 µl med en reverse-transcriptase mix bestående av 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µl Quantiscript RT Buffert 5x och 1 µl RT primer mix. Reaktionen inkuberades i 42°C i 30 minuter och därefter i 95°C i 3 minuter för att inaktivera Quantiscript Reverse Transcriptase. Provet sparades i frysen för eventuell senare användning. Detta prov användes som exempel på prov med okänd mängd cDNA när plasmiden testades hur den senare kan användas i analyser.

#### **PCR för att få fram segment för kloning**

Sekvensen för TLR-4 amplifierades upp från cDNA från celler stimulerade med LPS i 20 timmar med PCR, TaKaRa *Taq*<sup>TM</sup>, nr: R001AM (Takara Bio Inc.), med specifika primrar för hästens TLR-4 (tabell 2). PCR-mix och PCR-cykler ses i tabell 5 och 6. För att kontrollera primrarna kördes även en PCR med genomiskt DNA från kokade celler som vi inte extraherat ut RNA från.

Tabell 5. PCR-mix med specifika primrar (TaKaRa Taq™)

| Substans                     | Mängd    |
|------------------------------|----------|
| TaKaRa Taq™ (5 units/μl)     | 0,25 μl  |
| 10X PCR Buffer               | 5 μl     |
| 25mM MgCl <sub>2</sub>       | 3 μl     |
| dNTP mixture (2,5 mM)        | 4 μl     |
| prov (total cDNA)            | 5 μl     |
| Primer TLR-4 fwd 215 (10 μM) | 1 μl     |
| Primer TLR-4 rvs 715 (10 μM) | 1 μl     |
| Destillerat H <sub>2</sub> O | 30,75 μl |
| Total volym                  | 50μl     |

Tabell 6. TaKaRa-PCR-cykler

|         | Antal gånger | Temperatur | Tid    |
|---------|--------------|------------|--------|
| Cykel 1 | 1            | 94°C       | 2 min  |
| Cykel 2 | 40           | 94°C       | 15 sek |
|         |              | 55°C       | 30 sek |
|         |              | 68°C       | 3 min  |
| Cykel 3 | 1            | 68°C       | 5 min  |

I andra steget i cykel 2 användes temperaturen 55°C då den motsvarar de specifika primrarnas smältpunkt.

PCR-produkten visualiserades med elektrofores på en 1 % agarosgel med tillsatt etidiumbromid. Agarosgelen laddades med 7 μl stege (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas) samt 10 μl prov (5 μl prov, 5 μl dH<sub>2</sub>O och 2 μl färg) till respektive brunn.

### Kloning i en plasmid

Produkten från PCR-reaktionen med cDNA från 10 μl extraherat RNA användes vidare för plasmidkloning.

Som vektor användes pcDNA™3.1/V5-HisTOPO®TA (Invitrogen). Vektorn innehåller en gen för ampicillinresistens. Då mediet som mottagarbakterien ska växa på innehåller ampicillin kommer endast bakterier som tagit upp plasmiden att växa.

### Odlingsmedium och ampicillinplattor

Luria-Bertani (LB)-medium med tillsatt ampicillin (100 ng/ml, LBamp) användes som odlingsmedium. Som odlingsplattor användes LB med 15 % agar (LA) och ampicillin till en slutkoncentration av 100 ng/ml (LAamp-plattor) (tabell 7 och 8).

Tabell 7. Recept för LB-medium (Luria-Bertani)

- 
1. Tillsätt till 100 ml dH<sub>2</sub>O
    - a. 10 g Bacto-tryptone
    - b. 5 g jästextrakt
    - c. 10 g NaCl
  2. Justera pH till 7,5 med NaOH
  3. Fyll upp till 1L med dH<sub>2</sub>O
  4. Sterilisera genom autoklavering

Tabell 8. Recept för LA-amp

- 
1. Tillsätt till 100 ml dH<sub>2</sub>O
    - a. 10 g Bacto-tryptone
    - b. 5 g jästextrakt
    - c. 10 g NaCl
  2. Justera pH till 7,5 med NaOH
  3. Tillsätt 15 g agar
  4. Smält agar i mikro/värmebad
  5. Fyll upp till 1L med dH<sub>2</sub>O
  6. Sterilisera genom autoklavering
  7. När mediet svalnat, tillsätt ampicillin till en slutkoncentration av 100ng/ml
  8. Gjut plattor

### Transformering och kloning

Transformering och kloning utfördes enligt manualen för pcDNA<sup>TM</sup>3.1/V5-HisTOPO<sup>®</sup>TA (Invitrogen). SOC medium byttes ut mot LB-medium då fällningar fanns i SOC-mediumet. Reaktionsblandningen blandades enligt tabell 9 och inkuberades i rumstemperatur i 15 minuter. Reaktionsmixen flyttades därefter över på is. Från kloningsreaktionen överfördes 2 respektive 4 µl till två separata One Shot TOP10 kemiskt kompetenta *Escherichia coli*-celler och blandades varsamt. Reaktionen inkuberades på is i 30 minuter. Cellerna värmechokades i 42°C i 30 sekunder och överfördes sedan direkt till is. 500 µl LB-medium tillsattes reaktionen. Rören skakades därefter i 200rpm i 37°C, 30 min. Efter att bakteriekulturerna skakat centrifugerades bakterierna ner och 350 µl av övre vätskan togs bort så att bakterierna fanns i 150 µl medium.

Tabell 9. Kloningsreaktion

| Reagens                                 | Mängd |
|---|-------|
| PCR-produkt (TLR-4 10 µl RNA 20 timmar) | 3µl   |
| Saltlösning                             | 1µl   |
| Sterilt dH <sub>2</sub> O               | 1µl   |
| TOPO vektor                             | 1µl   |
| Total volym                             | 6µl   |



Efter transformering racklades bakteriekulturen ut på två LAamp-plattor per prov, 50 µl till en platta och resterande 100 µl till en annan, och inkuberades i 37°C över natten.

Fem kolonier valdes ut för vidare inkubering på masterplatta (LAamp) samt i flytande medium (LBamp). De flytande odlingarna inkuberades i skakande värmeskåp, 37 °C, 200 rpm, i ca 20 timmar.

### **Plasmidrening**

Efter odling av de fem transformanterna framrenades plasmiden ur dessa med E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit I Spin protokoll enligt manual. Metoden bygger på att man lyserar bakteriecellerna och sedan sätter sitt prov till HiBind<sup>TM</sup> matrix som finns i kolonner. Vid optimala förhållanden binder nukleinsyran reversibelt till matrixen vilket gör det möjligt att tvätta bort proteiner och kontaminanter. Nukleinsyran kan sedan sköljas ut med avjonat vatten eller buffert med låg salthalt.

Bakterierna pelleterades i eppendorfrör, överskottet hälldes av och sögs bort så att endast bakteriepelleten var kvar i röret. Pelleten löstes upp i 250 µl av lösning "Solution I/RNase A". Suspensionen överfördes sedan till ett nytt eppendorfrör till vilken 250 µl av "lösning II" tillsattes och blandades varsamt till ett klart lysat. Till röret tillsattes sedan 350 µl av "lösning III" och blandades tills vita precipitat bildats. Rören centrifugerades därefter i 10 min i 13000 rpm vid rumstemperatur. Den klara supernatanten (ca 700 µl) överfördes till HiBind<sup>®</sup>DNA Miniprep kolonner som jämviktats och centrifugerats med jämviktsbuffert. Kolonnerna centrifugerades i 13000 rpm i 1 min. Vätskan som pressats genom kolumnen slängdes. Kolonnen tvättades sedan med först 500 µl HB buffert och sedan 2x700 µl DNA tvättbuffert med centrifugering mellan varje omgång. Kolonnerna torrcentrifugerades sedan innan de flyttades över till nya rör och produkten eluerades med 50 µl eluerings buffert (10mM Tris-HCl, pH8,5) genom centrifugering 13000 rpm i 1 min.

Efter att plasmiden renats fram mättes koncentrationen av plasmiden med en spektrofotometer (Picodrop<sup>TM</sup>) (tabell 17). Valda prover (TLR-4-1, TLR-4-2, TLR-4-5) (50-100 ng/µl i 15 µl) skickades till Eurofines MWG Operon (Anzingerstr. 7a. D-85560 Ebersberg, Tyskland) för sekvensering för att säkerställa att rätt DNA-fragment klonats. Sekvenseringen utfördes med primer T7 från Eurofines MWG Operon. T7 primern valdes för att vektorn har ett område i anslutning till kloningsplatsen där primer T7 kan binda in.

### **Visualisering av positiv kontroll med primrar för kvantifiering**

När den positiva kontrollen används mot kliniska prov används andra primrar för TLR-4 än de primrar som användes för att ta fram kloningssegmentet (tabell 2). Dessa primrar ligger innanför det klonade segmentet och går dessutom över två exoner för att säkerställa att det är cDNA för mRNA som fångas upp (figur 2). Detta segment är 147 bp långt och kan visualiseras med exempelvis cybergreen. Primrarna testades med temperaturgradient för annealing i en PCR, TaKaRa Taq<sup>TM</sup>, nr: R001AM (Takara Bio Inc.). Till reaktionerna användes plasmiden TLR-4-1 som prov. Se tabell 10 och 11 för PCR-mix och cykler. Primrarna

testades vid fem olika temperaturer vid steg 2 i cykel 2, 54,8°C, 56,5°C, 57,8°C, 58,7°C samt vid 59°C. PCR-produkterna visualiserades med elektrofores på 1 % agarosgel med tillsatt etidiumbromid. Som stege vid elektroforesen användes GeneRuler™ 100bp plus från Fermentas. Till respektive brunn laddades 10 µl från en blandning av 5 µl PCR-produkt, 5 µl dH<sub>2</sub>O och 2 µl färg (orange dye). Av stegen laddades 6 µl. Elektroforesen kördes i ca 30 min med en spänning på 100V.

Tabell 10. PCR-mix med kvantifieringsprimrar (TaKaRa Taq™)

| Substans                            | Mängd    |
|-------------------------------------|----------|
| TaKaRa Taq™ (5 units/µl)            | 0,25 µl  |
| 10X PCR Buffer                      | 5 µl     |
| 25mM MgCl <sub>2</sub>              | 3 µl     |
| dNTP mixture (2,5 mM)               | 4 µl     |
| prov (plasmid TLR-4-1, 355,9 ng/µl) | 3 µl     |
| Primer TLR-4 fwd 353 (10 µM)        | 1 µl     |
| Primer TLR-4 rvs 499 (10 µM)        | 1 µl     |
| Destillerat H <sub>2</sub> O        | 32,75 µl |
| Total volym                         | 50 µl    |

Tabell 11. PCR-cykler kvantifieringsprimrar, TaKaRa PCR

|         | Antal gånger | Temperatur  | Tid         |
|---------|--------------|-------------|-------------|
| Cykel 1 | 1            | 94°C        | 15 sekunder |
| Cykel 2 | 30           | 95°C        | 30 sekunder |
|         |              | 54,8-59,0°C | 30 sekunder |
|         |              | 67°C        | 1 minut     |
| Cykel 3 | 1            | 4°C         | ∞           |

### Testomgång för att se hur plasmiderna fungerar i en qPCR

För att se hur den positiva kontrollen för TLR-4 fungerar i qPCR, quantitative polymerase chain reaction, testades plasmiden mot cDNA med okänd mängd TLR-4 mRNA. Analysen utfördes med i5Q BioRad med QuantiTect® SYBR® Green PCR (Quiagen). I5Q kalibrerades enligt manualen för det material vi skulle använda i våra analyser.

För att få fram antalet kopior av plasmiden i de olika proven som ska utgöra standardkurvan behöver man veta koncentration och molekylvikt på plasmiden. Molekylvikten för ett baspar dsDNA är ca 660 Da (<http://www.geneinfinity.org/index.html?er=404>). Då vektorn innehåller ca 5500 bp och det klonade segmentet är 501 bp blir den ungefärliga molekylvikten för plasmiden  $3,96 \cdot 10^6$  Da (6000x660Da). För att räkna ut antal kopior i provet användes formeln nedan.

$$\text{Antal kopior} = \frac{C (\text{ng}/\mu\text{L}) * 10^{-9}}{MV (\text{Da})} * 6,022 * 10^{23} (\text{Avogadros konstant})$$

Plasmiden TLR-4-1 späddes till ca 50 ng/μl. Koncentrationen bestämdes genom mätning med spektrofotometer (Picodrop™). Från denna lösning gjordes en spädningsserie på 1:50 i sju steg; 2 μl prov togs till 98 μl superQ H<sub>2</sub>O. Se tabell 12 för antalet kopior i respektive prov.

Tabell 12. Lösningar till standardkurva för qPCR

| standardlösning | spädning    | Antal kopior/μl      |
|-----------------|-------------|----------------------|
| ~50ng/μl        |             |                      |
| A               | 1:50        | 1,5*10 <sup>8</sup>  |
| B               | 1:50 från a | 3,0*10 <sup>6</sup>  |
| C               | 1:50 från b | 6,0*10 <sup>4</sup>  |
| D               | 1:50 från c | 1,2*10 <sup>3</sup>  |
| E               | 1:50 från d | 2,4*10 <sup>1</sup>  |
| F               | 1:50 från e | 0,5*10 <sup>0</sup>  |
| G               | 1:50 från f | 9,7*10 <sup>-3</sup> |

Reaktionerna för qPCR blandades enligt manualen för QuantiTect® SYBR® Green PCR så att det blev två av vardera standardprov a-f, en negativ kontroll, ett prov med cDNA från celler stimulerade med LPS i 40 timmar samt två prover med cDNA i olika volym från celler stimulerade med LPS i 20 timmar, se tabell 13 för reaktionerna.

Tabell 13. Reaktionsblandningar för qPCR

| Komponent                               | Standard-prover | cDNA 40h | cDNA 20h:1 | cDNA 20h:2 | Negativ kontroll |
|---|-----------------|----------|------------|------------|------------------|
| 2x QuantiTect SYBR Green PCR master mix | 25 μl           | 25 μl    | 25 μl      | 25 μl      | 25 μl            |
| Primer TLR-4 fwd 353 (10 μM)            | 1,5 μl          | 1,5 μl   | 1,5 μl     | 1,5 μl     | 1,5 μl           |
| Primer TLR-4 rvs 499 (10 μM)            | 1,5 μl          | 1,5 μl   | 1,5 μl     | 1,5 μl     | 1,5 μl           |
| RNase-fritt vatten                      | 21 μl           | 17 μl    | 17 μl      | 12 μl      | 22 μl            |
| Prov                                    | 1 μl            | 5 μl     | 5 μl       | 10 μl      | -                |
| Total volym                             | 50 μl           | 50 μl    | 50 μl      | 50 μl      | 50 μl            |

qPCR kördes enligt handboken för QuantiTect® SYBR® Green PCR (tabell 14). Annealingtemperaturen för primrarna sattes till 52°C då det i handboken stod att temperaturen borde vara 5-8°C under smältpunkten för primrarna. Smältpunkten för produkterna mättes i sista steget för att se att endast en produkt fanns i provet.

Tabell 14. PCR-cykler qPCR

|         | Antal gånger | Temperatur | Tid         | Mätning     |
|---------|--------------|------------|-------------|-------------|
| Cykel 1 | *1           | 95°C       | 15 min      |             |
| Cykel 2 | *40          | 95°C       | 15 sek      |             |
|         |              | 52°C       | 30 sek      |             |
|         |              | 72°C       | 30 sek      | fluorescens |
| Cykel 3 | *1           | 55-95°C    | 10 sek/steg | smältkurva  |

Vid analys av kliniska prover renas RNA fram från aktuella prov på lämpligt sätt och görs om till cDNA. Provet kan sedan analyseras som ovan och med hjälp av standardkurvan kan man uppskatta mängden mRNA i provet. För att kunna dra slutsatser från resultaten från qPCR måste de normaliseras mot en referensgen vars uttryck i cellen hela tiden är konstant (Figueiredo et al 2009, Kubista et al 2006, Heid et al 1996). Exempel på gener som används som referensgen är 18SrRNA och GAPDH (Bas et al 2004).

### Frysning av bakteriekultur

För att spara en bakteriekultur med rätt plasmid i inokulerades lite bakterier från koloni 1 från masterplattan i LBamp och inkuberades i 37°C, 200rpm över natt. Från denna bakteriekultur togs sedan en ml och blandades med 77 µl dimetylsulfoxid (DMSO) och frystes i -70°C. DMSO är ett medium som skyddar cellerna vid frysning. Då plasmiden ska användas tas en del från kulturen och inkuberas i nytt medium 37°C över natt. Från denna odling kan man sedan rena ut plasmider som kan användas för analyser.

## RESULTAT

En positiv kontroll för uttrycket av hästens TLR-4 har tagits fram genom kloning av genen i en plasmid.

### Isolering av och stimulering av lymfocyter

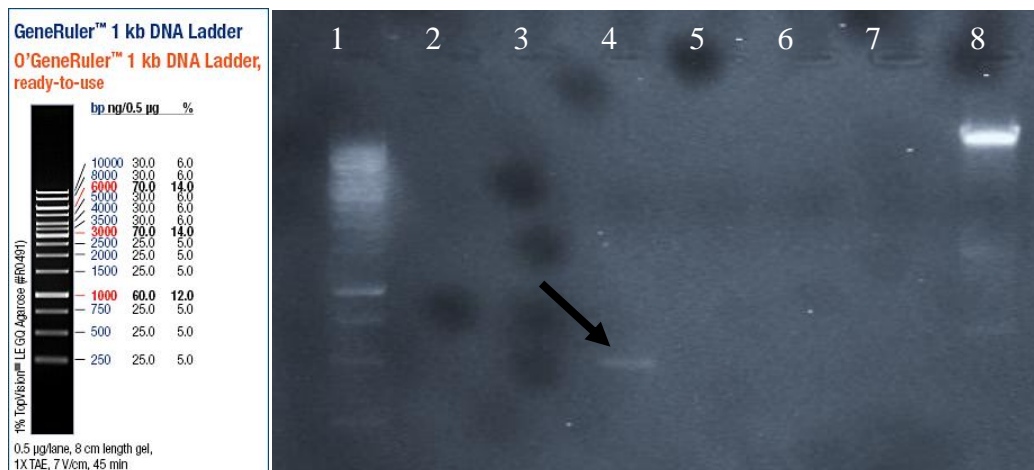
Isoleringen av lymfocyter resulterade i  $1 \times 10^7$  celler/ml. Detta justerades med RPMI-medium till en koncentration av  $1 \times 10^6$  celler/ml innan inkubering med LPS.

### RNA-extraktion och PCR

RNA detekterades med spektrofotometer (Picodrop™) som visade att det var 184 ng/µl RNA i provet från celler stimulerade med LPS i 20 timmar.

Provet från RNA extraherat efter 40 timmars stimulering med LPS innehöll 155 ng/µl RNA.

Vid visualisering av PCR-produkten med elektrofores (figur 6) sågs ett band från TLR-4 i provet med 10 µl extraherat RNA för syntetiseringen av cDNA. Inget band kunde ses i provet med 5 µl RNA, inte heller i det prov där genomiskt DNA använts. Eftersom bandet från brunn fyra överensstämmer med bandet för 500bp från stegen kan man relativt säkert säga att bandet motsvarar produkten för TLR-4. Detta prov användes för att gå vidare med kloning.



Figur 6. Fotografi av elektrofores på PCR produkt. Till vänster en förklaring till stegen. Brunnar från vänster till höger: 1. Stege, 2. TLR-4 genomiskt DNA, 3. TLR-4 cDNA 5µl RNA, 4. TLR-4 cDNA 10µl RNA, brunn 5-7 IL-17, 8. RNA. Pilen pekar på bandet i brunn 4 med TLR-4.

## Kloning

Efter att LA-plattorna inkuberats i 37°C över natten fanns koloniväxt på samtliga plattor. Fem isolerade kolonier valdes ut från plattorna och plockades vidare till en masterplatta samt till flytande medium med tillsatt ampicillin.

## Framrening av klonad plasmid

I tabell 15 kan resultaten från mätningen med spektrofotometer (Picodrop™) av DNA-koncentrationen i de olika proverna av framrenade plasmider utläsas.

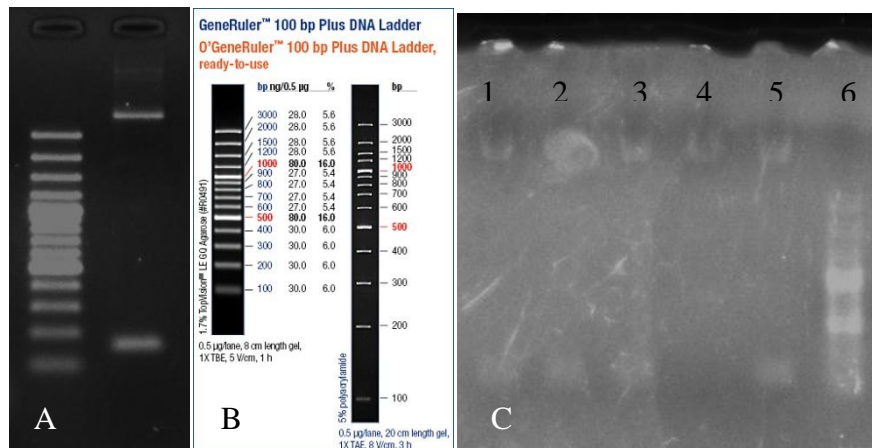
Tabell 15. Resultat Picodrop™ på framrenad plasmid med konfirmering genom sekvensering

| Prov    | Resultat  | A260/A280 | Sekvenserad | Resultat av sekvenseringen |
|---------|-----------|-----------|-------------|----------------------------|
| TLR-4-1 | 356 ng/µl | 2,004     | x           | Helt rätt                  |
| TLR-4-2 | 229 ng/µl | 2,041     |             |                            |
| TLR-4-3 | 342 ng/µl | 1,997     | x           | Basparsbyte samt fel håll  |
| TLR-4-4 | 261 ng/µl | 2,025     |             |                            |
| TLR-4-5 | 286 ng/µl | 2,013     | x           | basparsbyte                |

Sekvenseringen visade att TLR-4-1 var korrekt klonad. TLR-4-3 var klonad åt fel håll samt med ett utbyte av en nukleotid från A till G. Prov TLR-4-5 var klonad åt rätt håll med en nukleotidsubstitution på plats 376 in i det klonade fragmentet från A till G. I båda proven där det blivit ett nukleotidutbyte har det skett utanför den del som sedan används för detektion av den positiva kontrollen. Dessa prover skulle därför också kunna användas som en positiv kontroll.

### Visualisering av positiv kontroll med primrar för kvantifiering

TaKaRa PCRen med primrar för kvantifiering gav ett band vid ca 150 bp för alla temperaturer utom 58,7°C. Det var svårt att få någon bra bild av gelen från den första elektroforesen med alla prov, troligtvis för att agarosen var gammal vilket gjorde att gelen föll samman (figur 7C). Man ser även ett band högst upp, större än 3000 bp, i samtliga brunnar med prov i. För att få en bättre bild tog vi med ett av proven (57,8°C) i en andra elektrofores. Även på denna bild kan man se ett band som motsvarar det förväntade på ca 150 bp men även ett band som är större än 3000 bp (figur 7A).



Figur 7. Visualisering av TLR-4 positiv kontroll på gel efter PCR med primrar för kvantifiering. A: Den vänstra brunnen utgörs av 100 bp stege som finns förklarad i B. Den högra brunnen är prov från TLR-4-1 vid 57,8°C inbindningstemperatur vid TaKaRa PCR. Det nedre bandet i den högra brunnen motsvara ett band på ca 150 bp och är troligen det önskade segmentet för TLR-4. Det övre bandet är större än 3000 bp och kan vara orsakad av någon förorening av komponenterna i reaktionen eller att primrarna plockat upp något i vektorn. Bild C visar en gel med prov från alla temperaturer, från vänster 54,8°C (1), 56,5°C (2), 57,8°C (3), 58,7°C (4), 59°C (5), stege 100 bp (6).

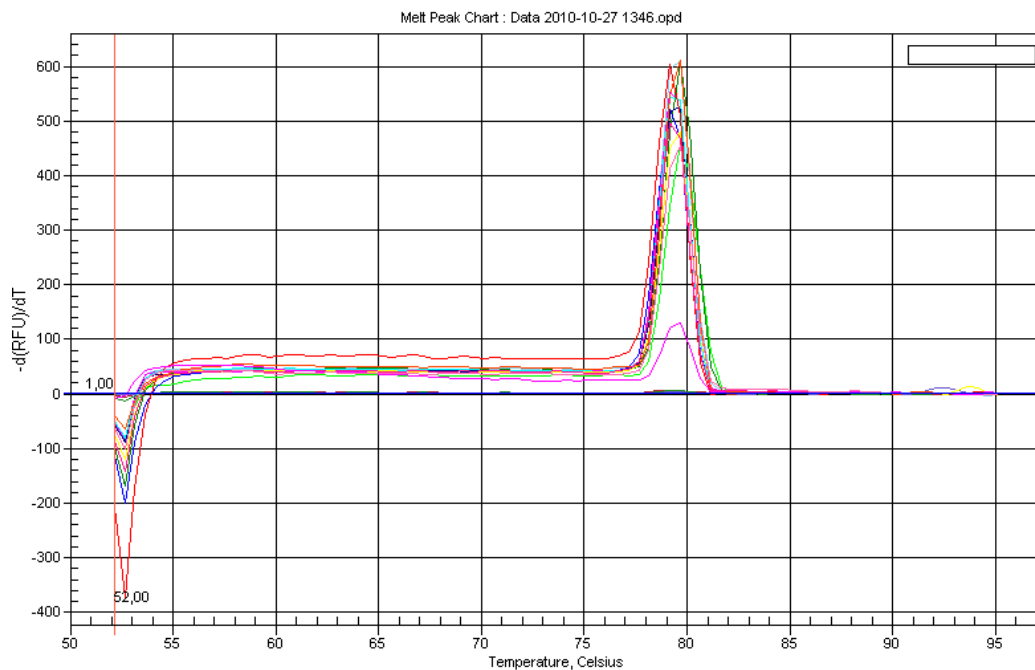
### Kvantifiering av prov med okänd mängd TLR-4 mRNA

Vid testkörningen med primrarna för kvantifiering av plasmiden i olika spädningar mot prover med cDNA från celler stimulerade med LPS fick vi ut en logaritmerad kurva på startinnehållet i provet. Eftersom vi vet hur stor mängd RNA som togs vid cDNA-syntesen och hur mycket prov från detta som laddades till qPCR, kan man räkna fram hur många kopior av mRNA-sekvensen för TLR-4 som fanns i provet (tabell 16). Det var två reaktioner av varje koncentration av TLR-4-plasmid för standardkurvan. Under analysen öppnades locken för tre av brunnarna vilket medförde att vätskan evaporerades bort. De prov som drabbades var spädning c, d och e från standardkurvan (tabell 12), vilket medförde att standardkurvan räknades ut med endast ett prov i dessa spädningar.

Tabell 16. Resultat qPCR

| Prov    | Volym RNA till cDNA syntes | Laddad volym i qPCR | Startkopior enligt standardkurva | Antal kopior per $\mu\text{l}$ | Antal kopior/ $\mu\text{l}$ RNA | Medel kopior/ $\mu\text{l}$ |
|---------|----------------------------|---------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| RNA 20h | 10 $\mu\text{l}$           | 5 $\mu\text{l}$     | $3,71 \cdot 10^2$                | 74,2                           | 7,42                            | 13,6                        |
|         | 10 $\mu\text{l}$           | 10 $\mu\text{l}$    | $1,89 \cdot 10^3$                | 189                            | 18,9                            |                             |
| RNA 40h | 6 $\mu\text{l}$            | 5 $\mu\text{l}$     | $4,74 \cdot 10^1$                | 9,48                           | 1,58                            |                             |

Som ett sista steg i PCR-reaktionen gjordes en smältkurva för att se hur specifik reaktionen varit. Eftersom smältkurvan endast hade en topp i samtliga reaktioner indikerar det att det bara finns en produkt i provet (figur 8).



Figur 8. Smältkurva för prov och plasmider. Alla prov har toppen vid samma ställe varför slutsatsen kan dras att det är samma prov och endast ett prov i alla brunnar.

## DISKUSSION

I det här arbetet har en positiv kontroll för hästens TLR-4 mRNA tagits fram genom plasmidkloning. Plasmiden kan användas för att kvantifiera uttrycket av TLR-4 med qPCR från valda prover från häst, bland annat för att kunna utvärdera uttrycket av TLR-4, och på så sätt den medfödda immuniteten, vid RAO.

Werners et al (2006) såg en polymorfism i nukleotidsekvensen för TLR-4 hos häst. Denna skillnad i sekvens gav åtta olika genotyper av TLR-4 som gav ändrad aminosyrasekvens i fyra positioner. Skillnaderna i nukleotidsekvensen kommer inte att störa analyser där plasmiden använd då dessa ligger utanför området för det klonade segmentet.

Även om de tre plasmider som skickades för sekvensering inte var helt identiska kan alla användas som positiv kontroll. De ställen där TLR-4-3 och TLR-4-5 har basparsbyte enligt sekvenseringen, kommer inte att störa dess användning som positiv kontroll, då platserna för basparsbyte ligger utanför platsen där primrarna för kommande analyser ska binda in. Det spelar heller ingen roll att TLR-4-3 blivit insatt i plasmiden åt fel håll eftersom DNA-strängarna är komplementära.

Figur sju visar resultatet från elektroforesen av PCR-produkterna genererade med primrar för kvantifiering. Förutom bandet som motsvarar den önskade produkten på 151 bp finns även ett band som är över 3000 bp långt. Detta band är antingen orsakad av en förorening av någon av komponenterna i reaktionen alternativt av att primrarna plockat upp något i vektorn. Vid testkörningen av qPCR upprättades en smältkurva för proverna. Denna smältkurva gav endast en topp vilket visar att det endast finns en produkt i provet. Eftersom det blev flera band vid visualiseringen av PCR-produkten från testomgången av primrarna för kvantifiering, men endast en topp vid smältkurvan och att dessa analyser är utförda med olika kit, är den troligaste anledningen till de två banden någon förorening snarare än att primrarna plockat upp något i vektorn.

Vid testkörningen av qPCR för att utvärdera hur den positiva kontrollen fungerar fick vi ett för högt E-värde. E-värdet talar om hur bra effektivitet PCR-omgången har och säger om det bildats så många kopior som är möjligt enligt givna koncentrationer för standardkurvan (Primrose & Twyman 2006, D'haene et al 2010). Ett E-värde mellan 90 och 110 % sägs vara acceptabelt (D'haene et al 2010). Vi fick ett E-värde upp mot 200 %. En orsak till att vi fick ett för högt E-värde kan vara att vi inte räknade ut det exakta antalet kopior i spädningsserien eller att koncentrationerna inte kontrollerades med spektrofotometer innan körning. Under testomgången hade locken till tre av brunnarna lossnat vilket gjorde att vätskan i brunnarna evaporerades bort. Det var brunnar till tre av plasmiderna som då endast fick ett värde till standardkurvan. Det går inte att dra några slutsatser från resultaten på testkörningen eftersom vi inte använde någon referensgen och för att vi fick ett avvikande E-värde för standardkurvan. Testomgången utfördes mest för att illustrera hur plasmiden kan användas i kommande analyser. Något som är viktigt vid eventuella analyser är att alla prover prepareras lika fram till analysen så att man senare kan jämföra resultaten mot varandra. Vad gäller plasmiderna är det bäst att rena ut nya plasmider och späda till lämplig koncentration så att man använder så färsk plasmider som möjligt. Det är även viktigt att mäta koncentrationerna på spädningarna på plasmiden för att få ett bra E-värde.

Även om det ur texten ovan ser ut som om allt går prickfritt vid laborativt arbete är det mycket som kan gå snett. Det krävdes två omgångar av isolering och stimulering av celler då de prover vi extraherade ut RNA från första gången gav alldeles för lite RNA vilket gjorde att vi inte amplifierade TLR-4 vid PCR-omgången. Detta medförde att vi fick börja om från början och isolera nya lymfocyter och stimulera celler på nytt.

Varför blev det inget band med elektroforesen i brunn 3 i figur 6? Troligtvis är orsaken till detta att det var för lite cDNA i mixen inför PCR eftersom det blev ett band i provet då vi tog cDNA som syntetiserats från 10 µl RNA. En annan orsak



kan vara pipetteringsfel, att något saknades i mixen eller att det kommit i RNaser i mixen för cDNA-syntesen.

Vid forskning och laborativt arbete går det inte alltid som man tänkt sig. Det kan verka ganska lätt så länge allt går bra och man får de resultat man förväntar. Svårigheterna kommer när man inte får rätt resultat eftersom det är många olika steg som kan gå snett vilket kan kräva en ganska omfattande felsökning.

Vad gäller patogenesen vid RAO är det ett flertal studier gjorda med utgångspunkt från att mäta olika inflammatoriska mediatorer. Många av studierna talar mot varandra men kan bero på att man har framkallat sjukdomen på olika sätt i de olika studierna samt att man har mätt vid olika tidpunkter i sjukdomsutvecklingen och använt olika vävnader vid mätningar. De studier som är utförda med naturlig provokation med dammig hö kan vara svåra att reproducera eftersom det förmodligen är olika nivåer och koncentrationer av de olika molekylerna som finns i dammet. I de studier där man standardiserat provokationen kan man å andra sidan eventuellt få högre koncentrationer av ett specifikt ämne jämfört med vad som finns i dammet vid naturlig provokation, vilket kanske kan påverka uttrycket av de inflammatoriska mediatorerna. Enligt konsensus från en workshop på Island 2007 där man diskuterat RAO, har man just tagit upp problemen med att jämföra olika studier eftersom det inte finns klarlagt vilken vävnad som är bäst att studera eller vilken metod som är bäst för att framkalla sjukdom (Marti et al 2008).

Vid RAO finns det en klar koppling mellan ökad inflammation och exponering av endotoxin i luftvägarna (Pirie et al 2003a, Pirie et al 2003b). Det är därför troligt att toll-liknande receptorer kan vara en del i ansamlingen av neutrofiler och luftvägsinflammationen vid RAO. Uttrycket av TLR4 hos hästar med RAO har dels visat sig vara oförändrat (Ainsworth et al 2006) och dels varit ökat (A. Berndt 2006). Det finns dock inte så många publicerade studier där man studerat uttrycket av TLR-4 och fler studier krävs innan man kan dra några större slutsatser. På humansidan har man sett att RSV kan uppreglera uttrycket av TLR-4. RSV är ett pneumovirus som är en undergrupp till paramyxoviridae (Quinn et al 2002). Kan det finnas lågvirulenta virus hos häst som är släkt med RSV som uppreglerar TLR-4 och gör lungan känsligare för damm som gör att RAO utvecklas? Detta är tankar som idag endast går att spekulera i eftersom det inte finns bevisat att det finns RSV-liknande virus som går på häst.

## **TACK**

Jag vill tacka mina handledare, Karin Ellencrona, Anna Rosander och John Pringle, för stöd och vägledning under arbetets gång. Tack Karin som tålmodigt svarat på frågor och stöttat under den laborativa delen. Tack även till Eva Svärd för roliga stunder under laborationerna.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Ainsworth, D.M; Wagner, B; Franchini, M; Grünig, G; Erb, H.N; Tan, J.Y. (2006). Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res.* Apr; 67 (4) 69-77.
- Ainsworth, D.M; Grünig, G; Matychak, M.B; Young, J; Wagner, B; Erb, H.N; Antczak, D.F. (2003) Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN- $\gamma$  and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* (96) 83-91.
- Bas, A; Forsberg, G; Hammarström, S; Hammarström, M-L. (2004). Utility of the Housekeeping Gene 18S rRNA,  $\beta$ -Actin, and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol.* (59) 566-573.
- Berndt, A; Derksen, F.J; Venta, P.J; Ewart, S; Yuzbasiyan-Gurkan, V; Robinson N.E. (2007). Elevated amount of Toll-like receptor 4 mRNA in bronchial epithelial cells is associated with airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Apr; 292 (4) L936-43. Epub 2006 Dec 8.
- Brown, T.A. (2001) *Gene Cloning and DNA analysis, An introduction.* Fourth edition. Malden, Mass. : Blackwell Science, cop 2001. ISBN: 0-632-05901-X.
- Bureau, F; Bonixxi, G; Kirschvink, N; Delhalle, S; Desmecht, D; Merville, M-P; Bours, V; Lekeux, P. (2000). Correlation between Nuclear Factor- $\kappa$ B Activity in Bronchial Brushing Samples and Lung Dysfunction in an Animal Model of Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* (161) 1314-1321.
- Chaudhuri, N; Whyte; M.K.B; Sabroe, I. (2007). Reducing the Toll of Inflammatory Lung Disease. *Chest.* (131) 1550-1556.
- Cordeau, M-E; Joubert, P; Dewanchi, O; Hamid, Q; Lavoie, J-P. (2004). IL-4, IL-5 and IFN- $\gamma$  mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet Immunol Immunopathol.* (97) 87-96.
- D'haene, B; Vandesompele, J; Hellemans, J. (2010). Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods* (50) 262-270.
- Figueiredo, M.D; Salter, C.E; Andrietti, A.L.P; Vandenpals, M.L; Hurley, D.J; Moore, J.N. (2009). Validation of a reliable set of primer pairs for measuring gene expression by real-time quantitative RT-PCR in equine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* (131) 65-72.
- Fitzgerald, K.A; Rowe, D.C; Golenbock, D.T. (2004). Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR-4/MD-2 complex. *Microbes Infect.* (6) 1361-1367.
- Gold, J.R; Perkins, G.A; Erb, H.N; Ainsworth, D.M. (2007). Cytokine Profiles of Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolates from Septic and Healthy Neonatal Foals. *J Vet Intern Med.* (21) 482-488.
- Giguère, S; Viel, L; Lee, E; MacKay, R.J; Hernandez, J; Franchini, M. (2002). Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol.* (85) 147-158.
- Griffiths; Wessler; Lewontin; Gelbart; Suzuki; Miller. (2005). *Introduction to Genetic Analysis.* Eight edition. New York: W.H Freeman and Company. ISBN: 0-7167-4939-4.

- Heid, C.A; Stevens, J; Livak, K.J; Williams, P.M. (1996). Real Time Quantitative PCR. *Genome Res.* (6) 986-994.
- Janeway; Travers; Walport; Shlomchik. (2005). *Immunobiology, the immune system in health and disease.* sixth edition. New York : Garland, cop 2005. ISBN: 0-8153-4101-6.
- Jost, U; Klukowska-Rötzler, J; Dolf, G; Swinburne, J.E; Ramseyer, A; Bugno, M; Burger, D; Blott, S; Gerber, V. (2007). A region on equine chromosome 13 is linked to recurrent airway. *Equine Vet J.* May; 39 (3) 236-41.
- Kleiber, C; McGorum, B.C; Horohov, D.W; Prire, R.S; Zurbriggen, A; Straub, R. (2005). Cytokine profiles of peripheral blood and airway CD4 and CD8 T lymphocytes in horses with recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunophatol.* (104) 91-97.
- Kubista, M; Andrade, J.M; Bengtsson, M; Forootan, A; Jonák, J; Lind, K; Sindelka, R; Sjöback, R; Sjögreen, B; Strömbom, L; Ståhlberg, A; Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Review. Mol Asp Med.* (27) 95-125.
- Kuno, M; Nemoto, K; Ninomiya, N; Inagaki, E; Kubota, M; Matsumoto, T; Yokota, H. (2009). The novel selective toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor tak-242 prevents endotoxaemia in conscious Guinea-pigs. *Abstract. Clin Exp Pharmacol Physiol.* (36) 589-93.
- Künzle, F; Gerber, V; Van Der Haegen, A; Wampfler, B; Straub, R; Marti, E. (2007). IgE-bearing Cells in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Allergen-specific IgE Levels in Sera from RAO-affected Horses. *J Vet Med.* (54) 40-47.
- Lavoie, J-P; Maghni, K; Desnoyers, M; Taha, R; Martin, G.M; Hamid, A.Q. (2001). Neutrophilic Airway Inflammation in Horses with Heaves is Characterized by a Th2-type Cytokine Profile. *Am J Respir Crit Care Med.* (164) 1410-1413.
- Léguillette, R. (2003). Recurrent airway obstruction – heaves. *Vet Clin Equine.* (19) 63-86.
- Marti, E; Gerber, V; Wilson, A.D; Lavoie, J.P; Horohov, D; Grameri, R; Lunn, D; Antczak, D; Björnsdóttir, S; Cunningham, F; Dérer, M; Frey, R; Hamza, E; Horin, P; Heimann, M; Kolm-Stark, G; Ólafsdóttir, G; Ramery, E; Russel, C; Schaffartzik, A; Svansson, V; Torsteinsdóttir, S; Wagner, B. (2008) Report of the 3<sup>rd</sup> Havemeyer workshop on allergic diseases of the horse, Hólar, Iceland, June 2007. *Vet Immunol Immunopathol.* (126) 351-361.
- Monick, M.M; Yarovinsky, T.O; Powers, L.S; Butler, N.S; Carter, A.B; Gudmundsson, G; Hunnughake, G.W. (2003). Respiratory Syncytial Virus Up-regulates TLR4 and Sensitizes Airway Epithelial Cells to Endotoxin. *J Biol Chem.* 26; 278 (52) 53035-53044.
- Pirie, R.S; Collie, D.D.S; Dixon, P.M; McGorum, B.C. (2003a). Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma). *Clin Exp Allergy.* (33) 676-683.
- Pirie, R.S; Dixon, P.M; McGorum, B.C. (2003b). Endotoxin contamination contributes to the pulmonary inflammatory and functional response to *Aspergillus fumigatus* extract inhalation in heaves horses. *Clin Exp Allergy, Sep;* 33 (9) 1289-96.
- Primrose S.B. and Twyman R.M. (2006). *Principles of Gene Manipulation and Genomics,* seventh edition. Oxford : Blackwell Pub, 2006. ISBN: 1-4051-3544-1.
- Quinn, P.J; Markey, B.K; Carter, M.E; Donnelly, W.J; Leonard, F.C. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* Oxford : Blackwell Science. ISBN: 0-632-05525-1.

- Reed, S.M; Bayly, W.M; Sellon, D.C. (2010). Equine Internal Medicine. Third edition. St Louis : Saunders Elsevier, 2010. s340-344. ISBN:978-1-4160-5670-6.
- Rice, T.W; Wheeler, A.P; Bernard. G.R; Vincent, J.L; Angus, D.C; Aikawa, N; Demeyer, I; Sainati, S; Amlot, N; Cao, C; Ii, M; Matsuda, H; Mouri, K; Cohen, J. (2010). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis. Crit care Med. (38) 1685-94.
- Schmallenbach, K.H; Rahman, I; Sasse, H.H.L; Dixon, P.M; Halliwell, R.E.W; McGorum, B.C; Cramer, R; Miller, H.R.P. (1998). Studies on pulmonary and systemic *Aspergillus fumigates*-specific IgE and IgG antibodies in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Vet Immunol Immunopathol. (66) 245-256.
- Sha, T; Sunamoto, M; Kitazaki, T; Sato, J; Ii, M; Iizawa, Y. (2007). Therapeutic effects of TAK-242, a novel selective Toll-like receptor 4 signal transduction inhibitor, in mouse endotoxin shock model. Eur J Pharmacol. (571) 231-9.
- Singh Suri S; Janardhan, K.S; Parbhakar, O; Caldwell, S; Appleyard, G; Singh, B. (2006). Expression of toll-like receptor 4 and 2 in horse lungs. Vet Res. Jul-Aug; 37 (4) 541-51. Epub 2006 Apr 28.
- Tizard, I.R. (2009). Veterinary immunology: an introduction, 8 edition. St Louis, Mo : Saunders Elsevier cop 2009. ISBN:9781416049890.
- Tsujimoto, H; Ono, S; Majima, T; Kawarabayashi, N; Takayama, E; Kinoshita, M; Seki, S; Hiraide, H; Moldawer, L.L; Mochizuki, M. (2005). Neutrophil elastase, MIP-2 and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. Shock. (23) 39-44.
- Werners, A.H; Bull, S; Vending, J.C; Smyth, T; Bosch, R.R; Fink-Gremmels, J; Bryant, C.E. (2006). Genotyping of Toll-like receptor 4, myeloid differentiation factor 2 and CD-14 in the horse: An investigation into the influence of genetic polymorphism on the LPS induced TNF- $\alpha$  response in equine whole blood. Vet Immunol Immunopathol. (111) 165-173.
- Zhang, P; Summer, W.R; Bagby, G.J; Nelson, S. (2000). Innate immunity and pulmonary host defense. Immunol Rew. (173) 39-51.