

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alja OBLAK

**VPLIV ZAMENJAVE AMINOKISLIN 82, 85 IN 87  
NA AKTIVNOST PROTEINA MD-2**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Alja OBLAK

**VPLIV ZAMENJAVE AMINOKISLIN 82, 85 IN 87  
NA AKTIVNOST PROTEINA MD-2**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF MUTATIONS OF AMINO ACID RESIDUES  
82, 85 AND 87 ON THE ACTIVITY OF MD-2**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Gregor Anderluh, za somentorja prof. dr. Roman Jerala, za recenzenta prof. dr. Tom Turk ter za predsednika komisije prof. dr. David Stopar.

Mentor: prof. dr. Gregor Anderluh

Somentor: prof. dr. Roman Jerala

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

## Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za  
živilstvo

Član: prof. dr. Tom TURK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Roman JERALA  
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biotehnologijo

Clan: prof. dr. Gregor ANDERLUH  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za  
biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Alja Oblak

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 616-097 : 572.27 : 577.112(043)=163.6
KG	imunski sistem/naravna imunost/receptor TLR4/protein MD-2 /lipopolisaharidi
AV	OBLAK, Alja
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)/ JERALA, Roman (somentor)/ TURK, Tom (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	VPLIV ZAMENJAVE AMINOKISLIN 82, 85 IN 87 NA AKTIVNOST PROTEINA MD-2
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XVI, 73 str., 13 pregl., 26 sl., 3 pril., 53 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Imunski odziv na bakterijsko okužbo se lahko včasih pretirano okrepi in vodi do bolezenskega stanja, imenovanega sepsa. Preko 60 odstotkov vseh primerov sepse je posledica imunskega odziva, ki ga sprožijo po Gramu negativne bakterije, ki v krvni obtok sproščajo lipopolisaharide (LPS). Lipid A je glavni agonist Toll-u podobnega receptorja 4 (receptor TLR4). Za njegovo prepoznavo oz. direktno vezavo pa je odgovoren koreceptor diferenciacijski mieloidni protein 2 (MD-2). MD-2 ima globok hidrofobni žep, kamor se vežejo acilne verige lipida A. Na robu hidrofobnega žepa je predel t.i. alifatske zanke, ki vsebuje veliko hidrofobnih aminokislin (V82, M85, L87), ki so izpostavljene topilu. Ker za vseh šest verig agonista v hidrofobnem žepu ni prostora, ena (ali največ dve) verjetno ostane zunaj žepa in tvori hidrofobne interakcije z aminokisinami alifatske zanke. Te interakcije so pomembne za biološko aktivnost MD-2. V diplomskem delu smo raziskali pomen aminokislin alifatske zanke, tako da smo preverili vpliv zamenjave teh aminokislin na aktivnost proteina MD-2. Mutante s povečano polarnostjo na predelu alifatske zanke so bile biološko neaktivne, kar se sklada s predhodno poznanimi rezultati vezave lipida A, saj te mutante niso bile sposobne prevzeti lipida A iz kompleksa s CD14. Povečanje hidrofobnosti pa na aktivnost MD-2 ni imelo negativnega vpliva, saj so se hidrofobne interakcije med aminokisinami alifatske zanke in acilno verigo lipida A lahko ohranile. Vse hidrofobne mutante (z izjemo mutante V82F) so bile stabilne in so obdržale aktivnost tudi v topni obliki v supernatantu. Rezultati podpirajo model MD-2 z vezanim heksaaciliranim lipidom A in prispevajo k boljšemu poznavanju mehanizma vezave lipida A na MD-2, kar lahko pripomore pri razvoju antagonistov MD-2, uporabnih v kliničnem zdravljenju sepse.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 616-097 : 572.27 : 577.112(043)=163.6
CX	immune system/innate immunity/receptor TLR4/protein MD-2 /lipopolysaccharides
AU	OBLAK, Alja
AA	ANDERLUH, Gregor (supervisor)/ JERALA, Roman (co-advisor)/ TURK, Tom (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2008
TI	THE EFFECT OF MUTATIONS OF AMINO ACID RESIDUES 82, 85 AND 87 ON THE ACTIVITY OF MD-2
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XVI, 73 p., 13 tab., 26 fig., 3 ann., 53 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	A normal host response to bacterial infection can sometimes become amplified and deregulated. This can lead to a complex medical condition called sepsis. Over 60 % of septic cases are caused by Gram negative bacteria that release lipopolysaccharides (LPS) into the patient's blood stream. Lipid A is the main agonist of TLR4. It is recognized and bound by TLR4's coreceptor protein MD-2. MD-2 has a deep pocket, lined with hydrophobic residues, which accommodates lipid A's acyl chains. An "aliphatic loop", consisted of several solvent exposed hydrophobic residues (V82, M85, L87) is located near the entrance to the hydrophobic pocket. The hydrophobic pocket is not large enough to accommodate all six acyl chains of the agonist. A model was proposed, where one (or maximally two) acyl chain stays outside the pocket and forms hydrophobic interactions with the hydrophobic residues of the aliphatic loop. These interactions are crucial for MD-2's ability to bind agonist and therefore for its biologic activity. We investigated the role of amino acid residues in the "aliphatic loop" by testing the effect of mutations in this region on the activity of MD-2. Mutants with increased polarity at positions 82, 85 and 87 were biologically inactive, which is consistent with results of LPS binding; none of the polar mutants were able to bind LPS provided as LPS:CD14 complex. Increased hydrophobicity did not compromise mutants' biological activity, since the hydrophobic interactions between the residues of the aliphatic loop and the acyl chain remain intact. All mutants with increased hydrophobicity (with the exception of V82F) were stable and did not lose activity after secretion into the medium. Our results support the model of MD-2 with bound hexaacylated lipid A and contribute to better understanding of the mechanisms of lipid A binding. This could contribute to the development of MD-2 antagonists that could be useful in the treatment of sepsis.

## KAZALO VSEBINE

	stran
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG.....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>SLOVARČEK.....</b>	<b>XV</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA .....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 IMUNSKI SISTEM .....	3
2.2 RECEPTORJI TLR .....	4
2.2.1 Odkritje receptorjev Toll in TLR .....	4
2.2.2 Receptor TLR4 .....	6
2.3 MD-2 .....	9
2.3.1 Lipopolisaharid.....	11
2.3.2 Struktura proteina MD-2.....	16
2.3.3 Pomen poznavanja MD-2.....	21
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>22</b>
3.1 MATERIALI .....	22
3.1.1 Kemikalije .....	22
3.1.2 Raztopine, pufri in standardi .....	23
3.1.3 Laboratorijska oprema .....	25
3.1.4 Protitelesa .....	25
3.1.5 Plazmidi .....	26
3.1.6 Organizmi.....	26
3.1.6.1 Bakterijski sevi .....	26
3.1.6.2 Celične kulture.....	26
3.1.7 Gojišča .....	27
3.1.7.1 Gojenje <i>E. coli</i> .....	27
3.2 METODE .....	28

<b>3.2.1 Sterilizacija raztopin, gojišč in steklovine .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.2 Izolacija plazmidne DNA .....</b>	<b>28</b>
3.2.2.1 Kemijska transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5α.....	28
3.2.2.2 Izolacija plazmidne DNA .....	29
3.2.2.3 Določanje koncentracije nukleinskih kislin.....	29
3.2.2.4 Elektroforeza DNA na agaroznem gelu.....	29
<b>3.2.3 Delo v celičnem laboratoriju.....</b>	<b>30</b>
3.2.3.1 Gojenje človeških celičnih kultur HEK293, HEK293BF1 in HEK293T	30
3.2.3.2 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293, HEK293BF1 in	
HEK293T .....	31
3.2.3.2.1 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293 in HEK293BF1 s	
transfekcijskim reagentom Lipofectamine 2000 .....	32
3.2.3.2.2 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293T s transfekcijskim	
reagentom PolyFect .....	32
3.2.3.3 Stimulacija transficiranih celic ter liza celic.....	33
3.2.3.3.1 Stimulacija celic pri merjenju aktivnosti mutant MD-2 .....	33
3.2.3.3.2 Stimulacija s supernatanti .....	33
<b>3.2.4 Merjenje luciferazne aktivnosti.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.5 Določanje proteinske sinteze.....</b>	<b>34</b>
3.2.5.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS-PAGE) ..	34
3.2.5.2 Prenos western.....	35
3.2.5.3 Imunodetekcija proteinov po prenosu western .....	36
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>37</b>
4.1 ZUNAJCELIČNO IZLOČANJE MUTANT MD-2.....	38
4.2 POMEN AMINOKISLIN 82, 85 IN 87 ZA BIOLOŠKO AKTIVNOST	
PROTEINA MD-2.....	40
<b>4.2.1 Biološka aktivnost hidrofobnih mutant proteina MD-2 .....</b>	<b>42</b>
4.2.1.1 Aktivacija s S-LPS .....	42
4.2.1.2 Aktivacija s spojino 506 in z Ra-LPS.....	43
4.2.1.3 Aktivacija s spojino 406 in z endotoksinom msbB .....	46
4.3 STABILNOST MUTANT MD-2 V MEDIJU .....	48
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>50</b>
5.1 RAZPRAVA.....	50
<b>5.1.1 Zunajcelično izločanje mutant MD-2 je primerljivo.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.2 Aminokisline na mestih 82, 85 in 87 proteina MD-2 so pomembne za njegovo biološko aktivnost oz. sposobnost vezave LPS.....</b>	<b>53</b>
5.1.2.1 Povečanje polarnosti aminokislin 82, 85 in 87 proteina MD-2 zniža njegovo biološko aktivnost.....	55
5.1.2.2 Povečanje hidrofobnosti na mestih 82, 85 in 87 proteina MD-2 ne oslabi njegove biološke aktivnosti .....	57
<b>5.1.3 Stabilnost mutant MD-2 v mediju.....</b>	<b>60</b>
5.2 SKLEPI.....	65
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>66</b>
<b>VIRI .....</b>	<b>67</b>

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

	stran
Preglednica 1: Poznani ligandi receptorja TLR4 (Gay in Gangloff, 2007: 23.4).....	7
Preglednica 2: Sintetične spojine, analogne lipidu A (Kotani in sod., 1985: 226).....	13
Preglednica 3: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti, ki smo jih uporabili pri diplomskem delu .....	22
Preglednica 4: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri detekciji proteinov .....	23
Preglednica 5: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri merjenju luciferazne aktivnosti ter pri delu v celičnem laboratoriju .....	24
Preglednica 6: Uporabljena laboratorijska oprema .....	25
Preglednica 7: Uporabljena protitelesa.....	25
Preglednica 8: Uporabljeni plazmidi .....	26
Preglednica 9: Uporabljen sev bakterije <i>Escherichia coli</i> .....	26
Preglednica 10: Uporabljene celične kulture .....	26
Preglednica 11: Tekoče gojišče LB za bakterije .....	27
Preglednica 12: Trdno gojišče LB za bakterije .....	27
Preglednica 13: Mutante proteina MD-2 .....	37

## KAZALO SLIK

	stran
Slika 1: Osnovna zgradba receptorjev Toll in TLR (Gay in sod., 2006: 694).....	5
Slika 2: Shema prepozname lipopolisaharida in signalne poti receptorja TLR4 (Akira in Takeda, 2004: 504).....	8
Slika 3: Model membrane <i>E. coli</i> K-12 (Raetz, 2002: 637).....	9
Slika 4: Struktura lipida A <i>E. coli</i> (Trent in sod., 2006: 211) .....	12
Slika 5: Struktura lipida A oz. njegovih sintetičnih analogov (Kotani in sod., 1985: 226). 13	13
Slika 6: Strukture lipidov A patogenih bakterij (Trent in sod., 2006: 211).....	14
Slika 7: Struktura endotoksina msbB (Somerville in sod., 1996: 361) .....	15
Slika 8: Nukleotidno ter aminokislinsko zaporedje človeškega MD-2 .....	16
Slika 9: Struktura človeškega MD-2 .....	17
Slika 10: Struktura človeškega MD-2 – prikaz trakov beta .....	18
Slika 11: Tridimenzionalna struktura MD-2 z vezanim eritoranom.....	20
Slika 12: Zunajcelično izražanje mutant MD-2.....	39
Slika 13: Povečanje polarnosti aminokislin 82, 85 in 87 proteina MD-2 negativno vpliva na njegovo biološko aktivnost.....	41
Slika 14: Povečanje hidrofobnosti aminokislin 82, 85 in 87 proteina MD-2 nima negativnega vpliva na njegovo biološko aktivnost.....	42
Slika 15: Lipid A je zadosten del endotoksina za aktivacijo kompleksa MD-2/TLR4 .....	43
Slika 16: Aktivacija kompleksa wtMD-2/TLR4 oz. mutMD-2/TLR4 je neodvisna od polisaharidnega dela endotoksina .....	44
Slika 17: Ra-LPS uspešno aktivira celice.....	45
Slika 18: Lipid IVa ne aktivira celic.....	46
Slika 19: Endotoksin msbB šibko aktivira celice pri izredno povišanih koncentracijah....	47
Slika 20: Topen MD-2 ohrani zadostno aktivnost za aktivacijo receptorja TLR4 .....	48
Slika 21: Aktivacija celic z LPS s supernatanti, ki vsebujejo MD-2.....	49
Slika 22: Preverjanje vezave endotoksina na MD-2 z metodo FPLC .....	52
Slika 23: Poravnava aminokislinskega zaporedja proteina MD-2 različnih organizmov. ..	54
Slika 24: Vezava endotoksina na mutante MD-2 s povečano polarnostjo .....	55

Slika 25: Model človeškega MD-2 z vezanim heksaaciliranim lipidom A ..... 61

Slika 26: Teoretični model dimera hTLR4/hMD-2 z vezanim eritoranom ..... 63

**KAZALO PRILOG**

Priloga A: Struktura zunajcelične domene mišjega TLR4 v kompleksu z mišjim MD-2

Priloga B: Sheme uporabljenih plazmidov

Priloga C: Uporabljene statistične metode

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca pri določeni valovni dolžini
AK	aminokislina, aminokislinski ostanek
Amp	ampicilin
ang.	angleško
APS	amonijev persulfat
bp	bazni par
CD	skupina proteinov, ki jih na svoji površini izražajo leukociti (ang. cluster of differentiation)
Da	dalton, enota za molekulsko maso
DMEM	gojišče za celične kulture Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
domena DD	domena smrti (ang. death domain)
domena TIR	domena Toll-interlevkinskega receptorja (ang. Toll-interleukin receptor domain)
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
FBS	fetalni telečji serum (ang. fetal bovine serum)
fLuc	kresničkina luciferaza
HEK293	celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (ang. human embryonic kidney cell line)
hMD-2	humani oz. človeški MD-2
hTLR4	humani oz. človeški TLR4
INF	interferon
IKK	inhibitorna kinaza kapa B (ang. I $\kappa$ B kinase)
IL	interlevkin
IRAK	kinaza, povezana z receptorjem IL-1 (ang. IL-1 receptor-associated kinase)

IRF3	interferonski odzivni faktor 3 (ang. interferon response factor 3)
kDa	kilo Da (1000 Da)
KDO	3-deoksi-D-mano-oktulozonska kislina
LB	gojišče Luria-Bertani
LBP	LPS-vezavni protein (ang. LPS-binding protein)
LOS	lipooligosaharid; endotoksin s krajšim saharidnim delom, ki ga proizvajajo določene bakterije (npr. <i>Neisseria meningitidis</i> ).
LPS	lipopolisaharid, imenovan tudi endotoksin
LRR	z levcinom bogate ponovitve (ang. leucine-rich repeat)
Mal/TIRAP	adapterski protein (ang. MyD88-adaptor-like/TIR-domain-containing adaptor molecule)
MD-2	diferenciacijski mieloidni protein 2 (ang. myeloid differentiation protein-2)
MQ	mili Q voda, dodatno očiščena destilirana voda
MyD88	diferenciacijski mieloidni protein 88 (ang. myeloid differentiation primary-response protein 88)
NF-κB	transkripcijski faktor κB (ang. nuclear factor κB)
PAMP	molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (ang. pathogen-associated molecular patterns)
PBS	fosfatni pufer
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov $H_3O^+$
RLA	relativna luciferazna aktivnost
rLuc	luciferaza <i>Renilla</i>
RNaza	ribonukleaza
RNA	ribonukleinska kislina
SDS	natrijev dodecil sulfat
S-LPS	LPS s polisaharidi (ang. smooth lipopolysaccharide)
STDEV	standardni odklon
TAB	protein, ki veže TAK1 (ang. TAK1-binding protein)
TAK1	s TGF-β aktivirana kinaza 1 (ang. transforming growth factor-β-activated kinase 1)
TEMED	N,N,N,N -tetrametil-etilendiamin

TLR	Toll-u podoben receptor (ang. Toll-like receptor)
TNF $\alpha$	dejavnik tumorske nekroze $\alpha$ (ang. tumor necrosis factor $\alpha$ )
TRAM/TICAM-2	adapterski protein (ang. TRIF-related adaptor molecule/TIR-domain-containing molecule 2)
TRIF/TICAM-1	adapterski protein (ang. TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF- $\beta$ /TIR-domain-containing molecule 1)
Tween 20	polioksietilensorbitan monolavrat
vrt/min	vrtljaji na minuto
wt	divji tip proteina
% (m/v)	masna koncentracija

## SLOVARČEK

HEK293	HEK293 je celična linija, nastala s transformacijo normalnih človeških embrionalnih ledvičnih celic z DNA adenovirusa 5. Na površini ne izražajo receptorjev TLR in ne tvorijo proteina MD-2, ohranjene pa imajo vse znotrajcelične proteine, ki sodelujejo pri signalizaciji receptorjev TLR.
HEK293BF1	HEK293BF1 so derivat celic HEK293, ki na površini stabilno izražajo človeški receptor TLR4.
HEK293T	HEK293T so derivat celic HEK293, v katerih se stabilno izraža antigen T, ki omogoča podvojevanje plazmidov z izvorom podvojevanja SV40, kar omogoča večje izražanje takšnih plazmidov.
LPS	Lipopolisaharidi, imenovani tudi endotoksini, so amfifilne molekule, ki so sestavljene iz lipida A, notranjega oligosaharidnega jedra, ki je povezano z lipidom A preko skupine KDO (3-deoksi-D-mano-oktulozonska kislina) in polimera s ponavljajočimi se oligosaharidi (antigen O), ki se nadaljujejo iz oligosaharidnega jedra. Lipid A je zadosten in potreben za endotoksične lastnosti molekule. Molekula LPS je z lipidnimi verigami umeščena v zunanjo stran zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij.
Luciferaza	Luciferaza je generično ime za encime, ki katalizirajo reakcije bioluminiscence pri organizmih kot sta kresnica <i>Photinus pyralis</i> ali kozolnjak <i>Renilla reniformis</i> . V molekularni biologiji luciferaze uporabljamo kot reporterske encime, s katerimi spremljamo izražanje genov. V dvojnem luciferaznem testu hkrati uporabimo dve luciferazi; inducibilno izraženo kresničkino luciferazo za spremljanje izražanja genov ter konstitutivno izraženo <i>Renilla</i> luciferazo za normalizacijo transfekcije.

MD-2	Protein MD-2 je koreceptor receptorja TLR4. Odgovoren je za prepoznavo in vezavo lipopolisaharida.
TLR4	Toll-u podoben receptor 4, zgrajen iz zunajcelične domene, ki vsebuje z levcini bogate ponovitve, transmembranske regije ter znotrajcelične domene TIR. Na zunajcelično domeno se veže kompleks MD-2, CD14 ter LPS.

## 1 UVOD

Imunski sistem višjih vretenčarjev obsega dve veji – naravno in pridobljeno imunost. Pomemben del naravne imunosti so receptorji, ki spadajo v družino Tollu-podobnih receptorjev (receptorji TLR; ang. Toll-like receptors). Receptorji TLR specifično spoznajo in vežejo določene molekule, ki so značilne za mikroorganizme, gostitelj pa jih ne vsebuje. Takšna molekula je tudi lipopolisaharid, ki je pomemben del zunanje celične stene po Gramu negativnih bakterij. Lipopolisaharid (LPS) je agonist receptorja TLR4. Aktivacija receptorja TLR4 pa je odvisna od zunajceličnega proteina MD-2. MD-2 je majhen glikoprotein, ki se z visoko afiniteto veže tako na hidrofobni del LPS, kot na zunajcelično domeno receptorja TLR4. Po vezavi kompleksa MD-2/LPS na TLR4 se receptor aktivira in sproži se znotrajcelična signalna pot, ki vodi do izražanja vnetnih genov oz. sinteze vnetnih citokinov.

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Čeprav je poznana tridimenzionalna struktura človeškega MD-2 v kompleksu z njegovim antagonistom lipidom IVa (tetraacilirani prekurzor lipida A), še ne poznamo natančnega mehanizma vezave agonista (LPS) oz. identitete aminokislin, ki so ključne za njegovo učinkovito vezavo in s tem za biološko aktivnost MD-2.

### 1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo želeli analizirati vpliv mutacij proteina MD-2 v predelu alifatske zanke (mutacije aminokislin na mestih V82, M85 in L87) na njegovo biološko aktivnost.

### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predel alifatske zanke proteina MD-2 je blizu mesta, kamor se vežejo acilne verige antagonist, vendar pa aminokisline alifatske zanke niso v direktnem kontaktu z acilnimi verigami antagonist. Agonist (lipid A) vsebuje večje število acilnih verig, ki bi se težko vezale v hidrofobni žep. Alifatska zanka MD-2 vsebuje precejšen delež hidrofobnih aminokislin, ki so izpostavljene topilu in bi lahko prispevale k hidrofobnim interakcijam z acilnimi verigami agonista. Zato predpostavljamo:

- povečanje polarnosti aminokislin bo imelo negativen učinek na biološko aktivnost MD-2, saj so acilne verige LPS hidrofobne.
- povečanje hidrofobnosti aminokislin ne bo oslabilo biološke aktivnosti MD-2.
- mutacije aminokislin 82, 85 in 87 ne bodo bistveno vplivale na topnost MD-2 oz. njegovo izločanje iz celic ter stabilnost v mediju.

Ker je za vezavo LPS na MD-2 odgovoren lipid A, predpostavljamo:

- oblike lipopolisaharida, ki se od lipopolisaharida *E. coli* (S-LPS) razlikujejo v predelu lipida A, se bodo razlikovale v sposobnosti za aktivacijo mutant MD-2 v primerjavi s S-LPS.
- oblike lipopolisaharida, ki se razlikujejo v polisaharidnem delu, se ne bodo razlikovale v sposobnosti za aktivacijo mutant MD-2 glede na lipopolisaharid *E. coli* (S-LPS).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 IMUNSKI SISTEM

Vsi organizmi smo neprenehoma v stiku z mikroorganizmi iz okolja; le ti lahko naseljujejo naše sluznice in kožo, lahko jih vdihnemo ali vnesemo v prebavni trakt. Ali bodo ti mikroorganizmi prodrli v telo gostitelja ter povzročili bolezensko stanje, je odvisno tako od virulenčnih dejavnikov mikroba kakor od učinkovitosti gostiteljeve obrambe.

Obrambo organizmov pred vdorom mikrobov predstavlja sklop limfatičnih organov, celic, citokinov ter drugih molekul, ki jih s skupnim imenom imenujemo imunski sistem. Imunski sistem vretenčarjev razdelimo na naravno ter pridobljeno imunost.

Pridobljena imunost je razvita samo pri vretenčarjih. Zanjo je značilna izredno specifična prepoznavanje antigena z receptorji, ki so izraženi na limfocitih B in T. Prepoznavanje antigena sledi zorenje limfocitov, kar vodi do obrambnega odziva. Le-ta je lahko posledica delovanja samih limfocitov T ali pa je posledica delovanja protiteles, ki jih izločajo limfociti B (Parkin in Cohen, 2001).

Za razliko od pridobljene imunosti pa je naravna imunost razvita tudi pri nižjih organizmih. Sestavlja jo plazemske beljakovine (komplement), citokini in druge molekule ter celice, kot so nevtrofilci, dendritične celice, monociti in makrofagi, ki odstranjujejo bakterije. Čeprav so na naravno imunost dolgo gledali kot na nespecifični del imunskega odgovora, lahko te fagocitne celice specifično razlikujejo med lastnimi in telesu tujimi molekulami ter slednje odstranijo. To prepoznavanje jim omogočajo receptorji, ki se od receptorjev limfocitov B in T med drugim razlikujejo tudi v tem, da je zapis za njihovo sintezo v celoti vsebovan v genomu in ne zahteva prerazporejanja genov oz. somatske genske rekombinacije (Chaplin, 2006).

Receptorji naravne imunosti prepoznaajo ohranjene molekulske strukture, ki so značilne za mikroorganizme, v gostitelju pa jih ne najdemo. Te molekulske strukture so običajno komponente mikrobov, ki so pomembne za njihovo preživetje. Imenujemo jih molekulski motivi (patogenih) mikroorganizmov oziroma PAMP (ang. pathogen-associated molecular patterns) (Akira in sod., 2006). Takšni molekulski motivi so na primer lipopolisaharid, flagelin in peptidoglikan. V celični citoplazmi PAMP prepoznaajo receptorji iz družine NLR (Nod-u podobni receptorji, ang. Nod-like receptors), ki jo sestavlja 23 citosolnih proteinov (Franchi in sod., 2006) ter receptorja iz družine RLR (ang. RIG-I like receptors) (Yoneyama in sod., 2004; Kang in sod., 2002). Za prepoznavo PAMP na celični površini in v endosomih pa so odgovorni receptorji iz družine TLR (ang. Toll-like receptors) (Creagh in O'Neill, 2006).

## 2.2 RECEPTORJI TLR

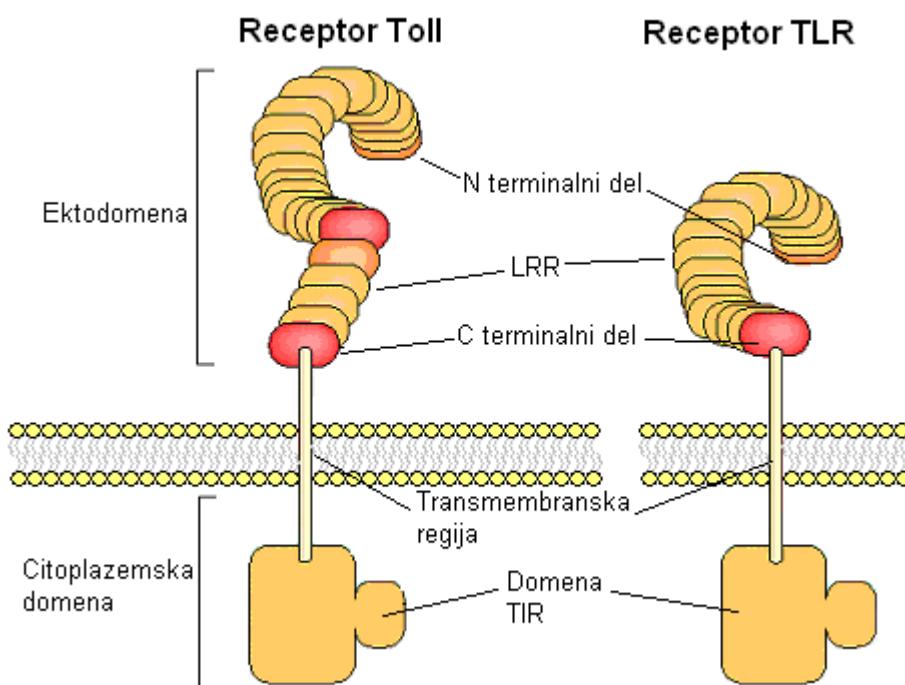
### 2.2.1 Odkritje receptorjev Toll in TLR

Receptorje Toll so odkrili Anderson in sod. (1985) na začetku osemdesetih let prejšnjega stoletja pri vinski mušici (*Drosophila melanogaster*). Ugotovili so, da so nujno potrebni za dorzoventralni razvoj zarodka mušice.

Nekaj let kasneje (1988) so Hashimoto in sod. določili zaporedje receptorja Toll. Glede na zaporedje so predpostavili tridelno strukturo receptorja (sl. 1):

- N-terminalna regija, ki vsebuje z levcinom bogate ponovitve ali LRR (ang. leucine-rich repeat)
- transmembranska regija
- C-terminalna regija, ki je homologna domeni receptorja za interlevkin 1 (IL-1R) pri vretenčarjih in jo imenujemo domena TIR (ang. Toll-interleukin receptor).

Kasneje so odkrili, da so receptorji Toll pomembni tudi pri imunskega odziva mušice na patogene glive in bakterije (Lemaitre in sod., 1996). Ko so za tem odkrili homologe receptorja Toll tudi pri človeku in ostalih vretenčarjih, so te homologe poimenovali receptorji TLR oz. Toll-u podobni receptorji (sl. 1).



Slika 1: Osnovna zgradba receptorjev Toll in TLR (Gay in sod., 2006: 694). Shema zgradbe receptorja Toll (levo) in receptorja TLR (desno) prikazuje, da imata oba receptorja ektodomeno (zunajcelično domeno), bogato z levcini, transmembransko regijo in citoplazemsko domeno TIR.

Pri človeku poznamo enajst, pri miših pa trinajst različnih receptorjev TLR, ki prepoznavajo in vežejo različne molekulske motive (patogenih) mikroorganizmov (PAMP) (Akira in sod., 2006).

Tako na primer receptor TLR4 prepozna lipopolisaharid po Gramu negativnih bakterij, receptor TLR2 prepozna različne lipopeptide in lipoproteine, receptor TLR3 prepozna dvoverižno molekulo RNA, ki je značilna za viruse, receptor TLR5 pa spozna flagelin, glavno sestavino bakterijskega bička (Kawai in Akira, 2006). Receptor TLR10, ki ga izražajo plazmocitoidne dendritične celice ter limfociti B, pa je zaenkrat še edini znani receptor TLR, katerega ligand še ni poznan (Lee in Kim, 2007). Receptorji TLR se ločijo

tudi po svoji lokaciji v celici, saj so nekateri na celični površini (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6), nekateri pa znotraj celice v endosomih oz. v veziklih endoplazemskega retikulumata ali v Golgijevem aparatu (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) (Kawai in Akira, 2006).

Po prepoznavi in vezavi specifičnih ligandov receptorji TLR dimerizirajo in aktivirajo znotrajcelično signalno pot, ki vodi do izražanje vnetnih citokinov, interferonov ter kemokinov. Aktivacija receptorjev TLR spodbudi tudi povečano izražanje kostimulatornih molekul na dendritičnih celicah oz. njihovo zorenje. Dendritične celice so antigen predstavlajoče celice, ki so pomembne za indukcijo pridobljenega imunskega odziva. Zrele dendritične celice lahko predstavijo antigen limfocitom. To nakazuje, da receptorji TLR povezujejo naravno in pridobljeno imunost (Akira in Takeda, 2004; Iwasaki in Medzhitov, 2004).

### **2.2.2 Receptor TLR4**

Leta 1997 so odkrili prvi človeški homolog receptorja Toll in ga poimenovali h-Toll, danes pa ga imenujemo receptor TLR4 (Medzhitov in sod., 1997). Receptor TLR4 je vpletен v prepoznavanje najrazličnejših molekul, ki so lahko mikrobnega (lipopolisaharid), rastlinskega (taksol) ali pa lastnega izvora (fibrinogen) (pregl. 1) (Gay in Gangloff, 2007). Pri slednjih velja obdržati določeno mero previdnosti, saj je težko povsem izključiti možnost kontaminacije vzorca z endotoksinom.

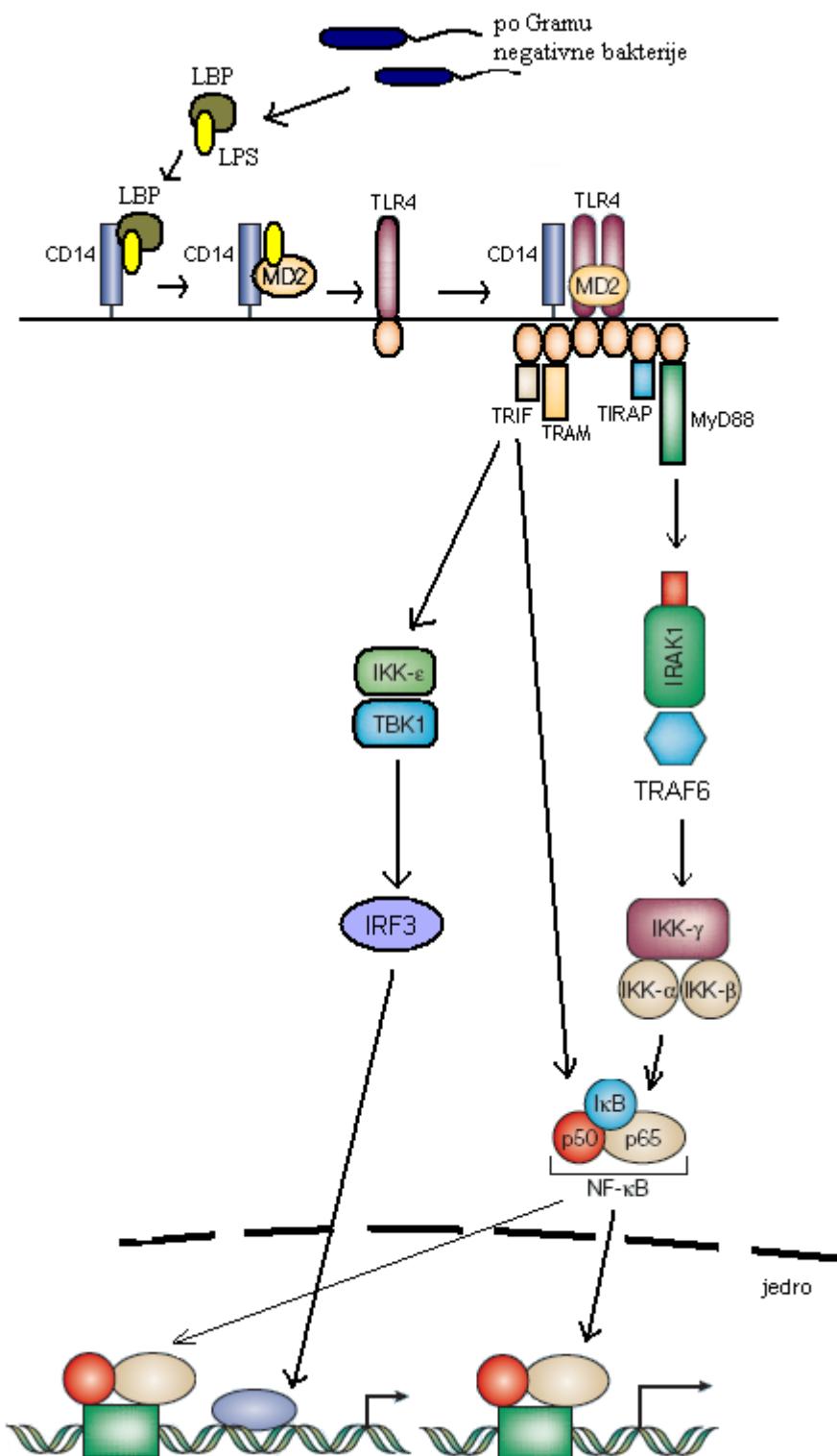
Vlogo receptorja TLR4 pri odzivu na lipopolisaharid po Gramu negativnih bakterij so dokazali Hoshino in sod. (1999), ko so ustvarili miši, ki niso izražale receptorja TLR4. Te miši se na LPS niso odzivale in so kazale enak fenotip kot miši C3H/HeJ, ki imajo mutacijo v genu *tlr4* (zamenjava prolina na mestu 712 v histidin) in so neodzivne na LPS in na sintetični lipid A (spojino 506).

Preglednica 1: Poznani ligandi receptorja TLR4 (Gay in Gangloff, 2007: 23.4)

Ligand	Izvor liganda
LPS	Po Gramu negativne bakterije
Flavolipin	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>
ER-112022, E5564, E5531	Sintetične spojine
Taxol	Rastline (tisa)
Fuzijski protein	Respiratorni sincicijski virus
Proteini ovojnice	Virus mišjega tumorja mlečnih žlez
Hsp60	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Hsp60	Telesu lastne spojine
Hsp70	Telesu lastne spojine
Del domene A fibronektina	Telesu lastne spojine
Oligosaharidi hialuronske kisline	Telesu lastne spojine
Polisaharidni fragmenti heparan sulfata	Telesu lastne spojine
Fibrinogen	Telesu lastne spojine

Po prepoznavi lipopolisaharida oz. drugega ustreznega agonista z receptorjem TLR4 le-ta dimerizira in se aktivira. Dimerizacija je potrebna za prenos aktivacijskega signala iz zunajcelične z levcini bogate domene na znotrajcelično domeno TIR (Saitoh in sod., 2004). Preko slednje se signal nato prenese bodisi preko adapterskih proteinov MyD88 (ang. myeloid differentiation primary-response protein 88) in Mal/Tirap (ang. MyD88-adaptor-like/TIR-domain-containing adaptor molecule), bodisi preko adapterskih proteinov TRIF (ang. TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF-β) in TRAM (ang. TRIF-related adaptor molecule).

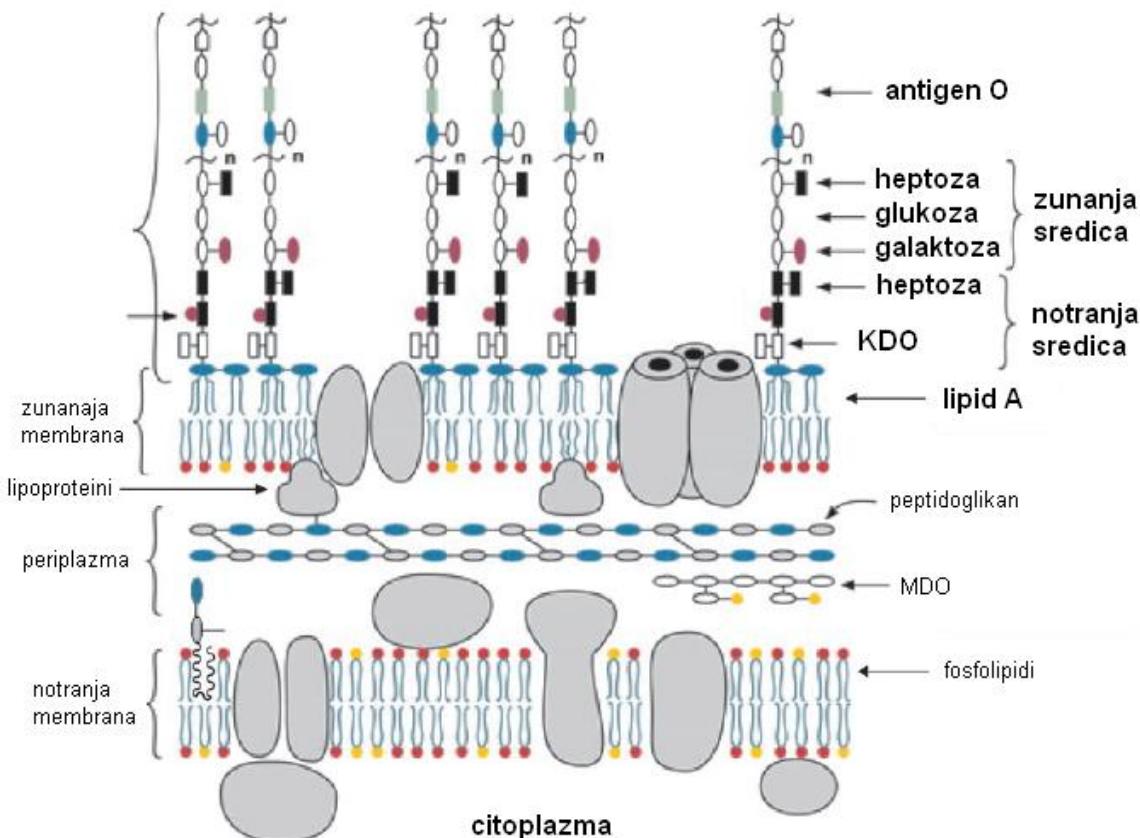
Signalna pot, ki poteka preko adapterja MyD88, sproži aktivacijo transkripcijskega faktorja NF-κB (ang. nuclear factor κB) in nastanek vnetnih citokinov, kot so TNF-α (ang. tumor necrosis factor α), IL-1 (interlevkin-1), IL-6, IL-8. Signalna pot, ki poteka preko adapterja TRIF, pa sproži zakasnjen odziv NF-κB ter aktivacijo transkripcijskega faktorja IRF3 (ang. interferon response factor 3), ki sproži nastanek INF (interferon) α in β ter izražanje INF-inducibilnih genov (sl. 2) (Akira in Takeda, 2004).



Slika 2: Shema prepozname lipopolisaharida in signalne poti receptorja TLR4 (Akira in Takeda, 2004: 504).

### 2.3 MD-2

Lipopolisaharid oziroma LPS (imenovan tudi endotoksin) je glikolipidna komponenta zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij in hkrati najpomembnejši agonist receptorja TLR4 (sl. 3).



Slika 3: Model membrane *E. coli* K-12 (Raetz in Whittfield, 2002: 637). Lipopolisaharid je glavna komponenta zunanje plasti zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij. Sestavlja ga trije deli; lipid A, oligosaharidna sredica in zunanji polisaharid (antigen O).

Prepoznavanje lipopolisaharida je kompleksno in poleg receptorja TLR4 vključuje tudi druge proteine. Pri neposredni aktivaciji TLR4 je udeležen protein MD-2, ki je ključen za vezavo LPS in aktivacijo receptorja TLR4. MD-2 je poznan tudi pod imenom LY96 (ang. lymphocyte antigen 96). Med prvimi so o vlogi proteina MD-2 pri prepoznavi LPS poročali Shimazu in sod. (1999), ki so pokazali, da se MD-2 veže na TLR4 na celični površini in omogoči celicam, ki izražajo TLR4, odzivnost na LPS. Celice, ki izražajo samo TLR4, ne pa tudi MD-2, so namreč pri stimulaciji z LPS neodzivne. Celice so pridobile

odzivnost na LPS, če so bile poleg TLR4 transficirane tudi z genskim zapisom za MD-2 oz. če so celicam, ki so izražale TLR4, dodali topen MD-2 (Shimazu in sod., 1999; Kennedy in sod., 2004). Te rezultate so potrdili tudi poskusi na miših (Miyake, 2004; Nagai in sod., 2002), ki niso izražale MD-2 in se na LPS niso odzivale. Ti poskusi so pokazali, da je MD-2 nujen za odziv na LPS; odgovoren je za njegovo vezavo in za prenos signala na TLR4, pri prepoznavanju pa sodeluje tudi proteina LBP in CD14.

LPS-vezavni protein (LBP, ang. LPS-binding protein) je 60 kDa velik serumski protein, ki veže LPS. Prvi so ga opisali Schumann in sod. (1990). LBP se veže na lipid A in deluje kot lipidna transferaza; katalizira prenos LPS iz celične stene po Gramu negativnih bakterij na CD14. CD14 (ang. cluster of differentiation 14) je 55 kDa velik glikoprotein, ki obstaja v dveh oblikah. Lahko se nahaja na površini mieloidnih celic (membranski CD14, mCD14), kjer je na membrano pritrjen preko glikozilfosfatidilinozitolnega sidra (GPI-sidro), najdemo pa ga tudi v topni obliki v krvnem obtoku (sCD14) (Wright in sod., 1990).

LPS, ki se sprosti iz bakterijske celične stene, v raztopini tvori aggregate (tudi več milijonov molekul endotoksina), ki so neučinkoviti pri aktivaciji imunskega sistema. LBP sodeluje pri razbitju agregatov in s tem olajša vezavo LPS na CD14, le ta pa monomeren LPS prenese na MD-2. Proteina LBP in CD14 imata torej vlogo pri monomerizaciji LPS, kar poveča učinkovitost njegove prepoznavne, vendar ne sodeluje pri neposredni aktivaciji TLR4. To trditev dokazujejo poskusi, ki kažejo, da je celice, ki izražajo samo TLR4, ne pa tudi LBP, CD14 ali MD2, mogoče zelo učinkovito aktivirati z izoliranim kompleksom LPS-MD-2 in sicer že pri pikomolarnih koncentracijah (Gioannini in sod., 2004). Akashi in sod. (2003) pa so s pomočjo koimunoprecipitacije dokazali nastanek kompleksa TLR4/MD-2/LPS na celični površini; CD14 je povečal ojačal nastanek kompleksa, ni pa sodeloval v samem kompleksu.

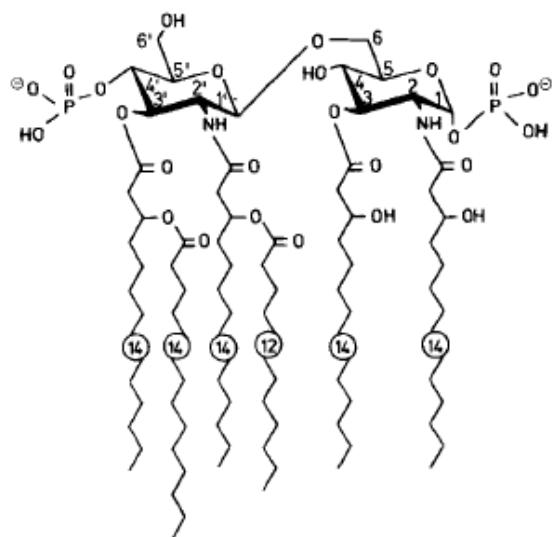
### 2.3.1 Lipopolisaharid

LPS bakterije *Escherichia coli* je zgrajen iz treh med seboj kovalentno povezanih regij: lipida A, oligosaharidne sredice in antiga O.

Lipid A je kompleksna molekula, ki je sestavljena iz dveh povezanih molekul glukozamina, na katere je običajno vezanih pet do sedem verig maščobnih kislin in dve fosfatni skupini (sl. 4). Služi kot sidro in pripne molekulo v zunanjou membrano. Lipid A je zadosten in potreben za endotoksične lastnosti lipopolisaharida in je najbolj ohranjen del strukture med različnimi bakterijskimi vrstami (Gorbet in Sefton, 2005; Kotani in sod., 1985).

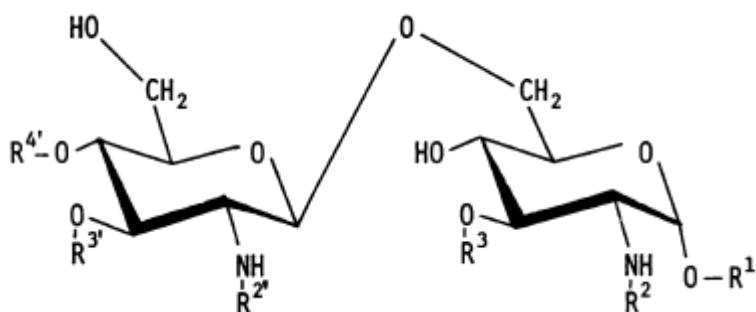
Osrednji oligosaharid (oligosaharidna sredica) je povezan z lipidom A preko skupine KDO (3-deoksi-D-mano-oktulozonska kislina).

Polisaharidna komponenta (antigen O ali O-specifična veriga) je sestavljena iz ponavljačih se oligosaharidov. O-specifična veriga je prisotna le pri po Gramu negativnih bakterijah, ki imajo kolonije z gladko površino in zato ima LPS s O-specifično verigo označeno S-LPS (ang. smooth LPS). Kolonije bakterij brez O-specifične verige imajo pri gojenju na trdnih gojiščih kolonije s hrapavo površino, zato je njegov LPS dobil označbo R-LPS (ang. rough LPS) (Gorbet in Sefton, 2005).



Slika 4: Struktura lipida A *E. coli* (Trent in sod., 2006: 211). Številke v krogcih kažejo število ogljikovih atomov v posamezni acilni verigi. Polisaharidni del lipopolisaharida se veže na hidrosilno skupino na mestu 6'.

Kotani in sod. (1985) so primerjali sintetični lipid A (spojina 506), nekaj njegovih različic (spojine 503, 504, 505) ter njegov prekurzor lipid IVa (spojina 406) glede na sposobnost aktivacije imunskega odziva. Ugotovili so, da spojina 506 izzove enako močan (ponekod pa celo močnejši) imunološki odziv kot lipid A, ki so ga pridobili iz *E.coli* (sev F515). To kaže, da je lipid A tisti del lipopolisaharida, ki je odgovoren za celično aktivacijo. Pokazali so tudi pomen števila acilnih verig; spojina 406 je imela bistveno nižji imunološki učinek kot spojina 506. Ugotovili so tudi, da so za učinkovito endotoksičnost ključne tudi fosfatne skupine; spojine 504 in 505, ki so v primerjavi z bifosforilirano spojino 506 le monofosforilirane, so imele bistveno nižji imunološki učinek, razlika pa je bila še večja pri nefosforilirani spojini 503 (sl. 5, pregl. 2).



Slika 5: Struktura lipida A oz. njegovih sintetičnih analogov (Kotani in sod., 1985: 226). Za biološko aktivnost lipida A so ključne njegove acilne verige in fosforiliranost. Posamezne funkcionalne skupine (R) so pojasnjene v preglednici 2.

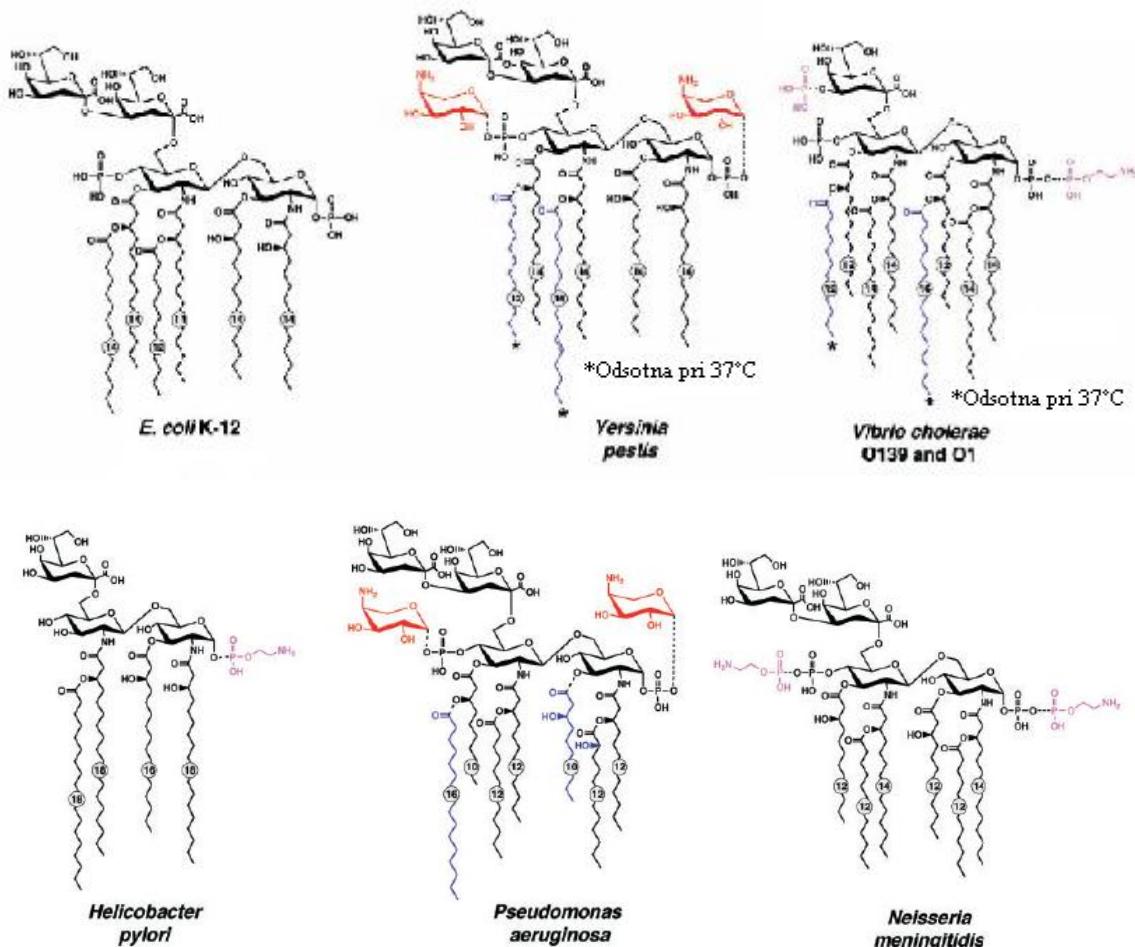
Preglednica 2: Sintetične spojine, analoge lipidu A (Kotani in sod., 1985: 226). Okrajšave: P, PO(OH)2; C14-OH, (R)-3-hidroksitetradecanoil; C14-O-(C12), (R)-3-dodecanoiloksitetradecanoil; C14-O-(C14), (R)-3-tetradekanoiloksitetradecanoil.

Spojina	R <sup>2</sup>	R <sup>2'</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>3'</sup>	R4	R1
503	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH-(C <sub>12</sub> )	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH-(C <sub>14</sub> )	H	H
504	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH-(C <sub>12</sub> )	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH-(C <sub>14</sub> )	P	H
505	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH-(C <sub>12</sub> )	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH-(C <sub>14</sub> )	H	P
506	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH-(C <sub>12</sub> )	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH-(C <sub>14</sub> )	P	P
406	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH	C <sub>14</sub> -OH	P	P

Dokazali so, da je lipid A del lipopolisaharida, odgovoren za njegovo endotoksičnost. Bakterije, ki sintetizirajo različne oblike lipida A, imajo različno zmožnost izzvati imunski odgovor. Le-ta je najmočnejši pri običajnem lipidu A (heksaaciliran, dve fosfatni skupini), kakršnega najdemo pri *E. coli*. Imunski odziv na lipid A bakterij, kot so *Helicobacter pylori*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Porphyromonas gingivalis* ali *Chlamydia trachomatis* je glede na odziv na običajen lipid A zmanjšan (sl. 6) (Trent in sod., 2006).

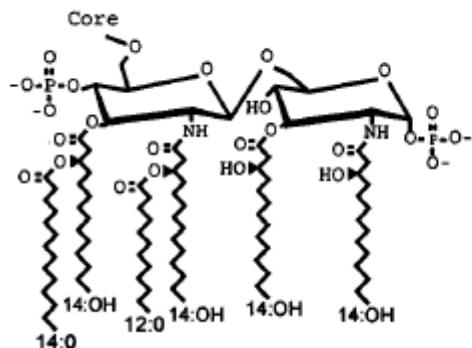
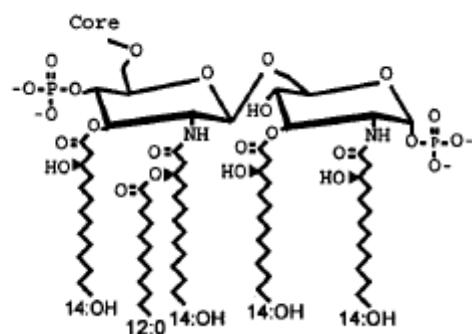
Oblak A. Vpliv zamenjave aminokislin 82, 85 in 87 na aktivnost proteina MD-2.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2008



Slika 6: Strukture lipidov A patogenih bakterij (Trent in sod., 2006: 211). V barvah so prikazane razlike lipidov A posamezne bakterije v primerjavi z lipidom A *E. coli* K-12.

Endotoksin msbB je pentaaciliran endotoksin, ki ga sintetizira *E. coli* z okvaro v genu *msbB*. Endotoksinu msbB manjka sekundarna miristoilna maščobna kislina na mestu 3' (sl. 7). Takšen LPS do deset tisočkrat slabše stimulira imunske celice v primerjavi z LPS bakterije brez okvare gena *msbB*. Ob hkratni stimulaciji imunskih celic z običajnim heksaaciliranim endotoksinom in endotoksinom msbB slednji deluje antagonistično (Somerville in sod., 1996).

**A****B**

Slika 7: Struktura endotoksina msbB (Somerville in sod., 1996: 361). (A) Struktura LPS *E. coli* K-12. (B) Struktura endotoksina, kakršnega sintetizira *E. coli* z okvaro v genu *msbB*.

### 2.3.2 Struktura proteina MD-2

MD-2 je LPS-vezavni protein, ki je nujen za aktivacijo receptorja TLR4. Odkrili so ga Shimazu in sod. (1999) na podlagi iskanj podobnih proteinov v podatkovnih zbirkah. Kot izhodišče iskanja jim je služil protein MD-1, za katerega so dokazali vezavo na protein RP105, ki ima podobno kot TLR4 zunajcelično domeno bogato z levcini. Na podlagi interakcije proteina MD-1 z RP105 so sklepali, da morda tudi z receptorjem TLR4 sodeluje podobna molekula. Na podlagi primerjav aminokislinskih zaporedij so odkrili protein, ki je v 23 odstotkih aminokislin identičen proteinu MD-1; poimenovali so ga MD-2. cDNA proteina MD-2 kodira 160 aminokislin (sl. 8). Prvih 18 aminokislin predstavlja signal, ki usmeri protein v sekretorno pot. Pokazali so, da se MD-2 direktno veže na TLR4 in da celice, ki izražajo TLR4, ob transfekciji z genskim zapisom za MD-2 pridobijo odzivnost na LPS (Shimazu in sod., 1999).

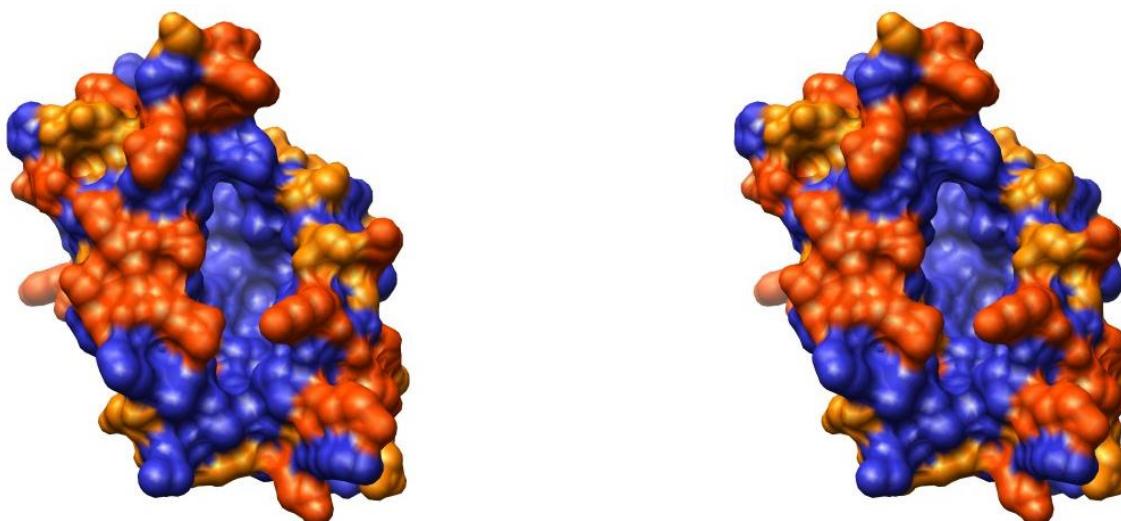
	M	L	P	F	L	F	F	S	T	L	F	S	S	I	F	T	E
1	A	T	G	T	T	A	C	C	T	G	T	T	T	C	A	T	T
	E	A	Q	K	Q	Y	W	V	C	N	S	S	D	A	S	I	S
51	A	G	C	T	C	A	G	A	C	T	G	T	C	A	G	T	A
	Y	T	Y	C	D	K	M	Q	Y	P	I	S	I	N	V	N	P
101	A	C	A	C	T	A	C	T	G	T	A	T	G	T	A	C	C
	C	I	E	L	K	G	S	K	G	L	L	H	I	F	Y	I	P
151	T	G	T	A	T	A	T	G	A	T	A	T	T	T	C	A	T
	P	R	R	D	L	K	Q	L	Y	F	N	L	Y	I	T	V	N
201	A	A	G	G	A	G	A	T	T	A	T	T	C	T	A	T	G
	T	M	N	L	P	K	R	K	E	V	I	C	R	G	S	D	D
251	C	C	A	T	G	A	T	T	C	C	A	A	G	A	G	T	C
	D	Y	S	F	C	R	A	L	K	G	E	T	V	N	T	T	I
301	G	A	T	T	C	T	T	T	G	C	A	G	G	A	G	T	G
	I	S	F	S	K	G	I	K	F	S	K	G	K	Y	K	C	V
351	A	T	C	A	T	T	C	T	A	G	G	A	A	T	A	C	A
	V	V	E	A	I	S	G	S	P	E	E	M	L	F	C	L	E
401	T	T	G	T	G	A	G	C	T	A	T	G	C	T	T	T	G
	F	Y	I	L	H	Q	P	N	S	N	*						
451	T	T	T	G	T	C	A	C	C	A	C	T	A	T	C	A	A

Slika 8: Nukleotidno ter aminokislinsko zaporedje človeškega MD-2 (aminokislinsko, zgornja vrsta; nukleotidno, spodnja vrsta). Podčrtane aminokisline predstavljajo signalno zaporedje.

Vlogo MD-2 pri odzivu na LPS so potrdili tudi Viriyakosol in sod. (2001), ki so pokazali, da MD-2 direktno veže LPS s Kd približno 65 nM in da za uspešno vezavo nista potrebna ne LBP ne CD14. S tem so protein MD-2 postavili v ospredje nadalnjih raziskav na področju prepozname lipopolisaharida.

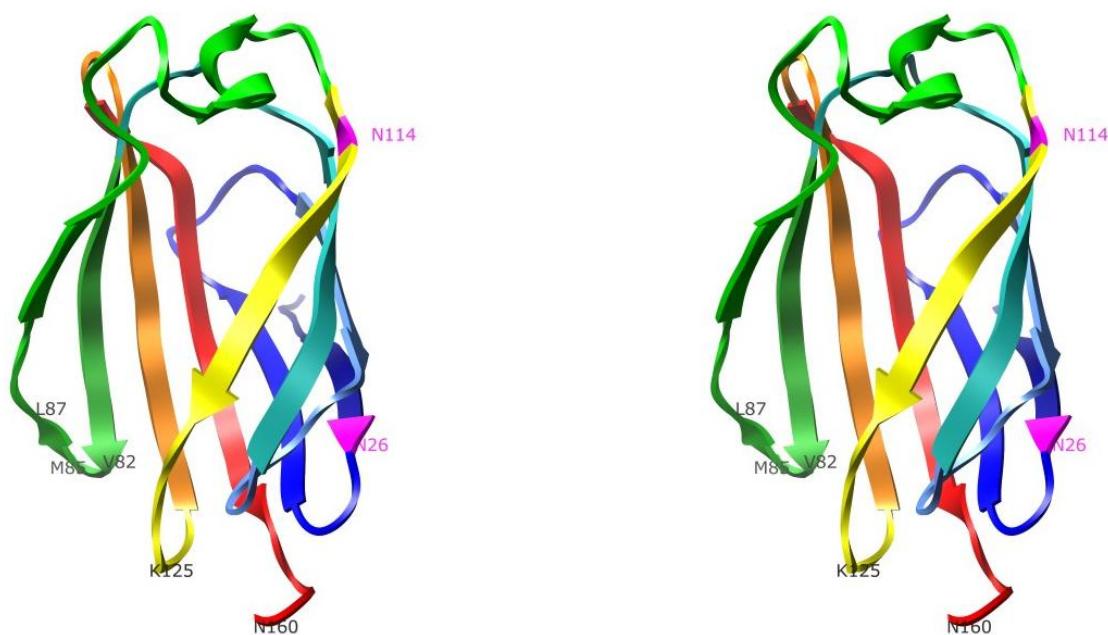
Za uspešno proučevanje mehanizma prepozname lipopolisaharida in z njim povezanih bolezenskih stanj je ključno poznavanje strukture MD-2. Na podlagi podobnih proteinov, ki vežejo lipide (NPC2, Der p2, GM2-AP), so pripravili strukturni model proteina MD-2. Model je pokazal visoko vsebnost  $\beta$ -strukture; MD-2 vsebuje dve beta ploskvi, sestavljeni iz treh oz. šestih trakov beta, ki oblikujeta hidrofobno votlino oz. žep, kamor bi se lahko vezale acilne verige lipopolisaharida. Polarni del liganda naj bi bil izpostavljen topilu (Gruber in sod., 2004).

Kasneje so določili tudi tridimenzionalno strukturo človeškega MD-2 v kompleksu z lipidom IVa (Ohto in sod., 2007), ki se je izkazala za zelo podobno predhodno napovedanemu modelu (Gruber in sod., 2004). Struktura je pokazala, da ima MD-2 hidrofoben žep s prostornino  $1710 \text{ \AA}^3$ . Vhod v žep pa obdajajo pozitivno nabiti aminokislinski ostanki (sl. 9) (Ohto in sod., 2007).



Slika 9: Struktura človeškega MD-2 (stereo pogled). Človeški MD-2 ima velik hidrofoben žep, kamor se vežejo acilne verige, ki ga obdajajo pozitivno nabiti aminokislinski ostanki. Barve: modro, nepolarne in aromatske ak; rumeno, polarne nenabite ak; oranžno, nabite ak (ak, aminokislina).

MD-2 je glikoprotein; pri mnogih sesalcih je glikoziliran na treh mestih (N26, N114 in N150), pri človeku pa sta glikozilacijski mesti dve (N26 in N114) (Visintin in sod., 2006a). Na elektroforeznem gelu (SDS-PAGE) v reducirajočih razmerah MD-2 torej potuje v treh pasovih; dvojno glikozilirana oblika ima velikost okrog 30 kDa, enkrat glikozilirana oblika je velika okrog 25 kDa, neglikoziliran protein pa 18 kDa (Visintin in sod., 2001). Glikozilacija MD-2 verjetno ni pomembna za njegovo pravilno zvitje ali za izločanje, saj sta da Silva Correia in Ulevitch (2002) pokazala, da se neglikozilirana mutanta MD-2, ki ima oba asparagina, pomembna za glikozilacijo, zamenjana z alanini, učinkovito izloča iz celice in ustrezno zvije. Neglikozilirana mutanta se je vezala na TLR4, ni pa bila aktivna; pomanjkanje aktivnosti pa je verjetno posledica same mutacije, ne pa odsotnosti glikozilacije. To trditev podpira tudi dejstvo, da je rekombinantni MD-2, proizведен v bakterijskih celicah, normalno aktiven (Gruber in sod., 2004). Iz tridimenzionalne strukture MD-2 pa je razvidno, da sta glikozilacijski mesti oddaljeni od hidrofobnega žepa, kamor se veže lipopolisaharid (sl. 10) (Ohto in sod., 2007).

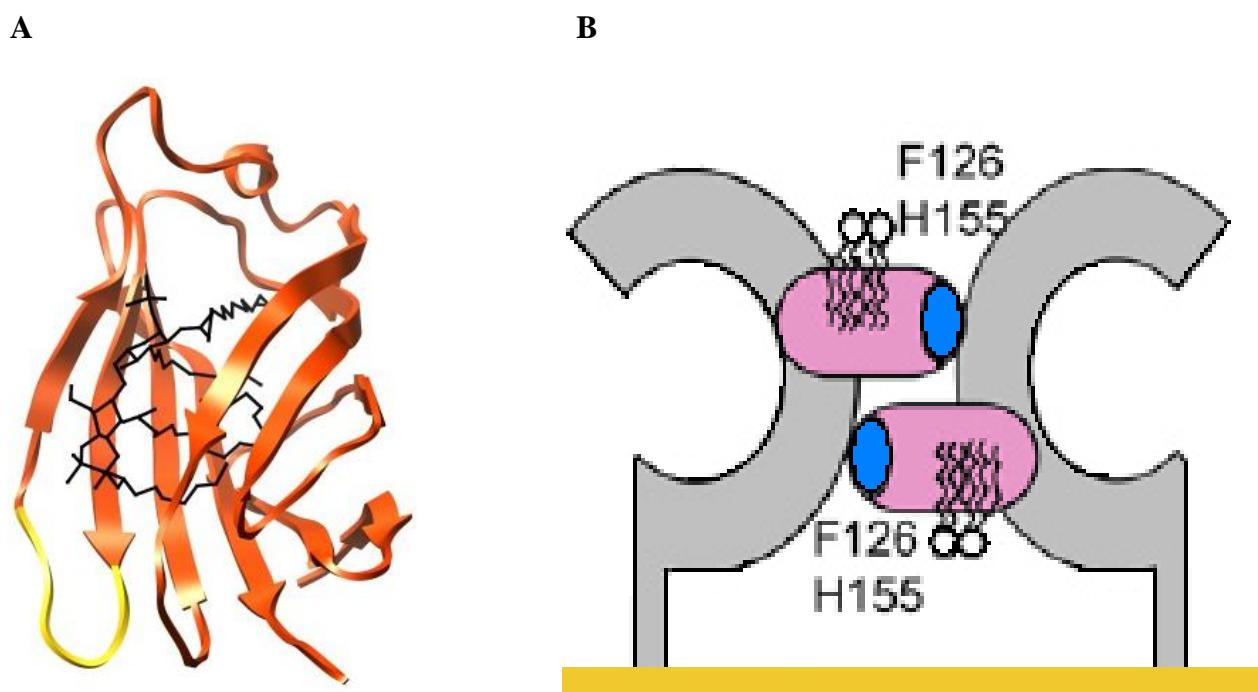


Slika 10: Struktura človeškega MD-2 – prikaz trakov beta (stereo pogled). Človeški MD-2 je glikoprotein, ki ima visok delež strukture beta. Posamezni trakovi beta sestavljajo dve ploski beta, ki oblikujeta žep oz. votlino, kamor se vežejo acilne verige lipopolisaharida. Človeški MD-2 ima dve glikozilacijski mesti; na sliki sta prikazani s škrlatno barvo. N-terminalni del proteina je prikazan v modri barvi, C-terminalni del pa v rdeči.

MD-2 vsebuje sedem cisteinskih ostankov. Mutacije posameznih cisteinov so le delno zmanjšale aktivnost MD-2; izjemi sta C95 in C105, katerih mutanti sta bili v primerjavi z divjim tipom MD-2 precej manj aktivni, a sta del aktivnosti (do 20 odstotkov) še vseeno obdržali. Cisteini torej niso ključni za aktivnost, pomembni pa so pri stabilnosti MD-2, saj ni nobena mutanta zmožna aktivirati TLR4 v topni obliki (Mullen in sod., 2003). MD-2 v topilu tvori oligomere in dimere, za kar so odgovorni cisteinski ostanki. Šest cisteinskih ostankov se poveže s tremi intramolekularnimi disulfidnimi mostički (C25 in C51, C37 in C148, C95 in C105), ki so izpostavljeni topilu in se lahko preurejajo oz. tvorijo oligomere. Cistein na mestu 133 je edini, ki ne tvori disulfidnega mostička; leži znotraj strukture, je v reducirani obliki in ne sodeluje pri nastanku oligomerov (Ohto in sod., 2007; Gruber in sod., 2004). Zaradi nastanka kovalentnih oligomernih oblik MD-2 je le-ta na SDS-PAGE elektroforeznem gelu viden v obliki monomera le, če je ločitev narejena v reducirajočih razmerah. V mediju je MD-2 v monomernih, dimernih in oligomernih oblikah, vendar se lahko le monomerna oblika učinkovito veže na TLR4 (Re in Strominger, 2002; Gioannini in sod., 2004).

Poleg tridimenzionalne strukture človeškega MD-2 v kompleksu z lipidom IVa (Ohto in sod., 2007) so določili tudi tridimenzionalno strukturo zunajcelične domene mišjega TLR4 z vezanim mišjim MD-2 (priloga A) ter strukturo zunajcelične domene človeškega TLR4 z vezanim MD-2 v kompleksu z eritoranom (Kim in sod., 2007). Strukture zunajcelične domene hTLR4 niso določili v celoti, temveč so določili kristalno strukturo različnih odsekov hTLR4 v povezavi z LRR proteina ribe *Eptatretus stouti*, ki s prekrivanjem predstavljajo celotno zunajcelično domeno. Eritoran je sintetična spojina, ki izvira iz lipida bakterije *Rhodobacter sphaeroides*. Deluje kot močan antagonist receptorskega kompleksa MD-2/TLR4 (Mullarkey in sod., 2003). Tako kot lipid IVa je tudi eritoran tetraaciliran in se veže v hidrofobni žep MD-2. Tridimenzionalna struktura je pokazala, da sta v hidrofobnem žepu dve njegovi acilni verigi v iztegnjeni konformaciji, dve pa sta na sredini upognjeni; na tak način acilne verige zavzamejo skorajda ves razpoložljiv prostor v hidrofobnem žepu (sl. 11A). Struktura je potrdila tudi pomen fosfatnih skupin liganda za njegovo uspešno vezavo, za katere so s pomočjo strukture dokazali nastanek ionskih interakcij s pozitivno nabitimi aminokislinskimi ostanki, ki obdajajo vhod v hidrofobni žep.

Raziskave, ki so jih opravili Kim in sod. (2007) so potrdile tudi vlogo LPS pri dimerizaciji kompleksa TLR4/MD-2; le-ta je dimeriziral le ob prisotnosti agonista heksaaciliranega LPS, ne pa ob prisotnosti antagonistov eritorana. Že predhodno so s pomočjo koimunoprecipitacij dokazali, da je dimerizacija TLR4 prva stopnja aktivacijske kaskade, ki jo sproži vezava agonista na MD-2 (Saitoh in sod., 2004). Čeprav se antagonist lipid IVa veže na isto vezavno mesto na MD-2 kakor agonist lipid A, pa lipid IVa ne sproži dimerizacije receptorskega kompleksa. Kim in sod. (2007) so predvideli tri možne modele za dimerizacijo dveh kompleksov TLR4/MD-2 z vezanim LPS; najverjetnejši predpostavlja strukturno spremembo MD-2 na predelu aminokisline Phe126 po vezavi LPS, kar izzove oz. omogoči dimerizacijo. Shematičen prikaz takšnega modela dimerizacije je prikazan na sliki 11B.



Slika 11: Tridimenzionalna struktura MD-2 z vezanim eritoranom – (A) hMD-2 z vezanim eritoranom – prikaz trakov beta. Rumeno je prikazan predel aminokislin 82-87. (B) Model dimera hTLR4/hMD2 (Kim in sod., 2007; 914). Zunajcelični domeni hTLR4 sta prikazani v sivi, hMD-2 pa v roza barvi. Na MD-2 je vezan agonist. Področje aminokislin F126 in H155, ki je odgovorno za dimerizacijo, je obarvano modro.

### 2.3.3 Pomen poznavanja MD-2

MD-2 je ključen za učinkovito obrambo pred po Gramu negativnimi bakterijami, saj njegova prepoznavna lipopolisaharida sproži imunski odgovor. Imunski odziv na bakterijsko okužbo lahko včasih uide nadzoru, se pretirano okrepi in vodi do bolezenskega stanja, imenovanega sepsa. O sepsi govorimo, če se po okužbi razvije močan sistemski vnetni odziv in dokažemo prisotnost mikrobov v krvi. Za razvoj sepse so v večini primerov odgovorne po Gramu negativne bakterije oz. endotoksin. Čeprav so tudi druge mikrobne komponente imunogene (npr. peptidoglikan), jim ne pripisujejo tako pomembne vloge pri razvoju sepse, saj ni dokazov, da bi v krvnem obtoku kdaj dosegle zadostne koncentracije (Cohen, 2002). Za sepso je značilnih več simptomov. Začetni simptomi vključujejo povisano telesno temperaturo, zmedenost, občasno znižan krvni tlak, zmanjšano izločanje urina in znižano število trombocitov (trombocitopenijo). Kasneje se pojavijo znaki odpovedi dihal in ledvic ter nepravilnosti pri strjevanju krvi. Če pri tem še močno upade krvni tlak, govorimo o septičnem šoku. V Severni Ameriki za sepso zboli okoli 750000 bolnikov letno. Ker učinkovitega zdravljenja ni, je smrtnost kar 30 odstotna (Cohen, 2002; Van Amersfoort in sod., 2003).

Vzrok okrepljenega sistemskega vnetnega odgovora je pretirano sproščanje citokinov oz. vnetnih posrednikov. Začetno sproščanje citokinov je posledica prepozname mikrobnih komponent z receptorji naravne imunosti (npr. receptorji TLR). Pri tem so pomembni monociti, ki sproščajo citokine, kot sta interlevkin 1 (IL-1) in TNF- $\alpha$ . Ta dva citokina sprožita sproščanje drugih vnetnih posrednikov, spodbudita pa tudi izražanje adhezijskih molekul in s tem povečata migracijo vnetnih celic iz krvnega obtoka v tkiva. Pri normalnem imunskejem odzivu je migracija vnetnih celic na mesto vnetja koristna, pri sepsi pa je vazodilatacija pretirana in lahko vodi do kritičnega znižanja krvnega tlaka oz. šoka. Pomemben citokin, ki ga sproščajo monociti v začetni fazni imunskega odziva, je tudi IL-6. Skupaj z IL-1 sta vpletena v regulacijo koagulacijskih poti. Pri sepsi pride do povečanega nastajanja krvnih strdkov, mehanizmi za njihovo razgradnjo pa so inhibirani. Zaradi oviranega dotoka krvi do tkiv lahko pride do sistemske odpovedi organov, lahko pa tudi smrti (Cohen, 2002).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije

Preglednica 3: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti, ki smo jih uporabili pri diplomskem delu.

Proizvajalec	Kemikalije
BioWhittaker	FBS
Calbiochem	G418 sulfat
Fermentas	DNA standardi lambda DNA
Fluka	Ponceau-S, SDS, DMSO
Ilford	razvijalec in fiksir
Invitrogen	DMEM + GlutaMAX™-I, Opti-MEM I medij brez seruma (1X), transfekcijski reagent Lipofectamine 2000, coelenterazine, proteinski standard SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard
Lux	CoA
Merck	etanol, metanol, izopropanol, NaCl, NaOH, bakteriološki agar
Novagen	UltraMobius 200, UltraMobius1000
Pierce	kemiluminiscentni substrat Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate
Pomurske mlekarne	mleko v prahu
Promega	5X lizni pufer, luciferin
Peptide Institute	endotoksin 406, endotoksin 506
Sigma	akrilamid, ATP, N,N'-metilen-bis-akrilamid, agarosa, bromfenolmodro, gojišče LB po Millerju, TEMED, nitrocelulozna membrana (45 µm), EDTA, ampicilin, amonijev persulfat, Tris, etidijev bromid, Tripsin EDTA raztopina (1x), KCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , SDS, glicin, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O, glicerol, β-merkaptoetanol, DTT, S-LPS
Qiagen	EndoFree Plasmid Maxi Kit, PolyFect Transfection Reagent

### 3.1.2 Raztopine, pufri in standardi

Preglednica 4: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri detekciji proteinov.

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
4X reducirajoči vzorčni pufer s SDS	320 mg SDS, 2 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 3,2 ml glicerol, 0,8 ml β-merkaptoetanol, 0,8 ml 1 % bromfenolmodro, 1,2 ml MQ
15 % ločitveni gel	2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 2,45 ml MQ, 5 ml 30 % akrilamid/bisakrilamid, 100 µl 10 % SDS, 50 µl 10% APS, 5 µl TEMED (navedeno za 2 gela)
4 % vstopni gel	1,25 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 3,05 ml MQ, 0,665 ml 30 % akrilamid/bisakrilamid, 50 µl 10 % SDS, 25 µl 10 % APS, 5 µl TEMED (navedeno za dva gela)
10X elektroforezni pufer s SDS	30 g Tris, 10 g SDS, 144 g glicina, dopolnimo do 1 l z dH <sub>2</sub> O. Pred elektroforezo pufer 10-krat redčimo z dH <sub>2</sub> O.
Pufer za mokri prenos proteinov na membrano	6,057 g Tris, 28,8 g glicina, 400 ml metanola, dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 2l.
10X raztopina Ponceau	2 % (m/v) raztopina Ponceau-S, 30 % (m/v) CCl <sub>3</sub> COOH, 30 % (m/v) sulfosalicilna kislina
SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Standard	vsebuje proteine velikosti 250 kDa, 148 kDa, 98 kDa, 64 kDa, 50 kDa, 36 kDa, 22 kDa, 16 kDa, 6 kDa, 4 kDa
Pufer za polsuh prenos proteinov na membrano	5,82 g Tris, 2,93 g glicina, 200 ml metanola, dopolnimo z dH <sub>2</sub> O do 11.
TBS	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl

Preglednica 5: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri merjenju luciferazne aktivnosti ter pri delu v celičnem laboratoriju.

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
50X TAE pufer za agarozno elektroforezo	242 g Tris, 57,1 ml ledocetna kislina, 100 ml 0,5 M EDTA, dH <sub>2</sub> O do 1l. pH uravnamo na 8.
6X nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	0,25 % bromfenolmodro, 0,25 % ksilencianol, 40 % (w/v) glukoze v dH <sub>2</sub> O
Pufer TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA.
Gene Ruler DNA Ladder Low Range	vsebuje DNA velikosti 700 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 150 bp, 100 bp, 75 bp, 50 bp, 25 bp
Standard λ EcoRI/HindIII	vsebuje DNA velikosti 21.226 bp, 5.148 bp, 4.973 bp, 2.027 bp, 1.907 bp, 1.584 bp, 1.375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp
LUC pufer (pufer za merjenje luciferazne aktivnosti)	LUC pufer: 2,38 g HEPES, 0,38 g MgCl <sub>2</sub> , 0,06 g EGTA-Na raztopimo v 100 ml dH <sub>2</sub> O, uravnamo pH na 7,8 in dodamo še 0,08 g NaF. Poleg 2,6 ml LUC pufra dodamo še DDT, ATP, coA in MQ do 13 ml. Luciferin raztopimo v DMSO in ga dodamo pufru.
RENILLA pufer (pufer za merjenje luciferazne aktivnosti)	2,6 ml 5X Renilla pufer (3,346 g Na pirofosfat, 6,9 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O, 14,5 g NaCl, 1,822 g CDTA, 5 ml metanol, pH uravnamo na 5,0) , MQ do 13 ml. Coelenterazin raztopimo v metanolu in ga dodamo pufru.
10 X PBS (za celični laboratorij)	100 g NaCl, 2,5 g KCl, 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , dodamo MQ do 1 l, pH uravnamo na 7,4.

### 3.1.3 Laboratorijska oprema

Preglednica 6: Uporabljena laboratorijska oprema.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Beckman	centrifuga J2-HS
BioRad	aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (Mini Protean II) in moker prenos proteinov na membrano (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell), aparatura za agarozno elektroforezo DNA
Binder	CO <sub>2</sub> inkubator za celične kulture
Berthold Technologies	Mithras LB 940 in pripadajoči računalniški program MikroWin 2000
Chemass	spektrofotometer in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
Eppendorf	Avtomatska pipeta 0.1-2.5µl, namizna centrifuga MiniSpin, centrifuga 5415R
Gilson	5ml, 1ml, 200µl, 100µl, 20µl pipete
Hettich	centrifuga Universal 32R
Kambič	parni sterilizator A-500/700
Thermo Scientific	centrifuga Sorvall RC5C Plus NanoDrop

### 3.1.4 Protitelesa

Preglednica 7: Uporabljena protitelesa.

primarna protitelesa proti His	mišja monoklonska protitelesa proti His (Qiagen)
poliklonska sekundarna protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	kozja poliklonska protitelesa proti mišjim protitelesom IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (SantaCruz)

### 3.1.5 Plazmidi

Preglednica 8: Uporabljeni plazmidi.

<b>Vir</b>	<b>Plazmid</b>
darilo (K. Miyake, University of Tokyo)	hMD-2 v pEF-BOS
Promega	pGL2 luciferazni reporterski vektor (z naknadno vstavljenim NF- $\kappa$ B odzivnim promotorjem), phRL-TK ( <i>Renilla</i> luciferazni reporterski vektor)

Plazmide pEF-BOS s hMD-2, phRL-TK in pGL2 z vstavljenim NF- $\kappa$ B odzivnim promotorjem smo uporabljali pri testu spremljanja luciferazne aktivnosti, plazmid pEF-BOS pa tudi pri preverjanju stopnje zunajceličnega izločanja proteina MD-2 (priloga B).

### 3.1.6 Organizmi

#### 3.1.6.1 Bakterijski sevi

Preglednica 9: Uporabljen sev bakterije *Escherichia coli*.

<b>Sev</b>	<b>Genotip</b>	<b>Vir</b>
DH5 $\alpha$	F $^-$ supE44, $\Delta lacU169$ ( $\phi 80$ lacZ $\Delta M15$ ) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96, thi-1, relA1</i>	zbirka sevov na Kemijskem Inštitutu

#### 3.1.6.2 Celične kulture

Preglednica 10: Uporabljene celične kulture.

<b>Celična kultura</b>	<b>Vir</b>
HEK293	J. Chow (Eisai Research Institute)
HEK293T	J. Weiss (University of Iowa)
HEK293 BF1 TLR4	D. Golenbock (University of Massachusetts Medical Center)

### 3.1.7 Gojišča

#### 3.1.7.1 Gojenje *E. coli*

Za gojenje bakterije *E. coli* smo uporabljali gojišče Luria-Bertani (LB). Za selekcijo uspešno transformiranih bakterij smo v večini primerov uporabljali antibiotik ampicilin.

Preglednica 11: Tekoče gojišče LB za bakterije.

Kemikalija	Količina
gojišče LB po Millerju	25 g/l

Preglednica 12: Trdno gojišče LB za bakterije.

Kemikalija	Količina
gojišče LB po Millerju	25 g/l
Agar	15 g/l

- Priprava tekočega gojišča LB: gojišče LB smo raztopili v destilirani vodi ter ga nato sterilizirali. Pred inokulacijo smo v gojišče dodali še antibiotik ampicilin v končni koncentraciji 50 µg/ml. Nacepljeno gojišče smo inkubirali na stresalniku pri 37 °C ter 150 vrt/min 16 ur.
- Priprava trdnega gojišča LB: trdo gojišče smo pripravili podobno kot tekoče, dodali pa smo mu še agar v končni koncentraciji 1,5 %. Po sterilizaciji smo delno ohlajenemu gojišču dodali ampicilin v končni koncentraciji 50 µg/ml in ga razlili v sterilne plastične petrijevke. Uporabili smo jih takoj, ko so se strdile, ali pa jih sterilne do uporabe shranili pri 4 °C. Trdno gojišče smo nacepili s sterilno cepilno zanko ali pa tekočo kulturo vcepka razmazali po plošči s sterilno hokejko. Nacepljene plošče smo inkubirali pri 37 °C 16 ur.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Sterilizacija raztopin, gojišč in steklovine

Ves potreben material za gojenje celičnih kultur in bakterije *E. coli* smo predhodno sterilizirali po standardnih postopkih:

- sterilizacija v avtoklavu z vlažno toploto, kjer je sterilizacija potekala 20 minut pri 121 °C in  $1,2 \cdot 10^5$  Pa.
- temperaturno občutljive snovi smo sterilizirali s filtracijo; uporabili smo filter s premerom por 0,2  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Izolacija plazmidne DNA

#### 3.2.2.1 Kemijska transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH5 $\alpha$

Plazmide, ki smo jih želeli uporabiti pri delu s celičnimi kulturami, smo namnožili v bakterijskih celicah *E. coli* DH5  $\alpha$ . Za vnos plazmida bakterijske celice *E. coli* DH5 $\alpha$  smo uporabili metodo s topotnim šokom. Kompetentne bakterijske celice (shranjene pri -80°C) smo odtalili na ledu, jim dodali 1  $\mu\text{l}$  plazmidne DNA ter inkubirali na ledu 30 minut. Sledil je topotni šok z inkubacijo 4 minute pri 42 °C. Mikrocentrifugirko s transformacijsko zmesjo smo nato takoj ohladili na ledu za 2 minuti, zatem pa dodali 1 ml sterilnega gojišča LB in inkubirali 1 uro pri 37 °C s stresanjem pri 150 vrt/min. Celice smo zbrali s centrifugiranjem 3 minute pri 7.000 vrt/min, celično usedlino smo nato resuspendirali v manjšem volumnu supernatanta in jo razmazali na trdno gojišče LB z ustreznim antibiotikom in inkubirali pri 37 °C čez noč.

### 3.2.2.2 Izolacija plazmidne DNA

Zaradi narave naših eksperimentov DNA, ki jo transficiramo v človeške celične kulture, ne sme vsebovati endotoksina (lipopolisaharida). V ta namen smo plazmidno DNA izolirali s komercialno dostopnimi kompleti (Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Kit, Novagen UltraMobičius200 ali Novagen UltraMobičius1000). Izolacija je potekala po navodilih proizvajalcev. Temelji na alkalni lizi bakterijskih celic, sledi odstranjevanje endotoksina z ekstrakcijo v poseben pufer, ki ga nato zavržemo. Plazmidno DNA potem vežemo na kolono, sledi še dodatno izpiranje nečistoč, na koncu pa DNA speremo s kolone v sterilno mikrocentrifugirko s priloženim puferom TE, ki ne vsebuje endotoksina.

### 3.2.2.3 Določanje koncentracije nukleinskih kislin

Za izvedbo eksperimentov v celičnem laboratoriju je potrebno natančno poznati koncentracijo plazmidne DNA. Koncentracijo plazmidne DNA smo zato določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 260 in 280 nm. Pri tem smo upoštevali, da raztopina z absorbanco 1 pri 260 nm vsebuje 50 µg/ml dvoverižne DNA. Razmerje A260:A280 = 1,8 – 2,0 pove, ali so pripravljeni vzorci čisti, brez proteinskih primesi, fenola ali RNA.

### 3.2.2.4 Elektroforeza DNA na agaroznem gelu

Elektroforezo plazmidne DNA na agaroznem gelu smo uporabili kot dodatno kontrolo koncentracije in čistosti (odsotnosti RNA) po izolaciji plazmidov. Običajno smo uporabili 1,2% (m/v) agarozni gel. Ustrezno količino agaroze smo raztopili s segrevanjem v 100 ml 1 X pufera TAE v mikrovalovni pečici, ohladili na 60 °C, dodali 2 µl etidijevega bromida (10 g/l) ter vlili v pripravljeno kadičko za elektroforezo. Ko se je gel strdil, smo nanesli vzorce DNA. Vzorcem, katerim smo preverjali koncentracijo, smo dodali 1 x nanašalni pufer za agarozno elektroforezo. Poleg vzorcev smo na gel nanesli še mešanice 1 x

nanašalnega pufra za agarozno elektroforezo in znane koncentracije (10 ng/µl, 20 ng/µl, 50 ng/µl in 100 ng/µl) DNA bakteriofaga lambda. To nam je omogočilo približno oceno koncentracije DNA v naših vzorcih.

Elektroforeza je potekala v 1 X pufru TAE pri konstantni napetosti 100 V. Gel smo nato osvetlili z UV svetlobo in fotografirali.

### 3.2.3 Delo v celičnem laboratoriju

#### 3.2.3.1 Gojenje človeških celičnih kultur HEK293, HEK293BF1 in HEK293T

Človeške celične kulture HEK293, HEK293BF1 in HEK293T smo gojili v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Uporabljene celične kulture rastejo v monosloju, zato smo jih gojili v posodicah, kjer so se lahko pritrdile na dno. Za njihovo gojenje smo uporabili gojišče DMEM z 10 % FBS, ki vsebuje vsa potrebna hranila in rastne faktorje. Gojišču celic HEK293BF1 smo dodali še antibiotik G418 v končni koncentraciji 0,5 mg/ml. Gojišče smo redno menjali na tri do štiri dni. Ob zadostni gostoti smo jih presadili oziroma zredčili; najprej smo jih sprali z 10 ml sterilnega pufra PBS, nato pa prelili z 2 ml tripsina z EDTA. Tako smo jih s pomočjo encima odstranili s podlage. Tripsin smo nevtralizirali z dodatkom 10 ml medija DMEM z 10 % FBS. Suspenzijo celic smo centrifugirali v sterilni plastični centrifugirki 5 minut pri 1200 vrt/min pri sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo celicam odsesali supernatant in jih nežno resuspendirali v svežem mediju DMEM z 10 % FBS. Delu celic (najmanj eni desetini) smo dodali ustrezno količino svežega medija oz. svežega medija z antibiotikom in jih vrnili v posodico, kjer so se celice ponovno pritrdile in rasle. Preostanek celic smo zavrgli ali pa uporabili za izvedbo poskusov. Če smo jih želeli uporabiti pri poskusih, smo celice najprej prešteli s pomočjo hemocitometra in jih nato ustrezno število nacepili na mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami, primerno za gojenje celičnih kultur (ang. 96-well plate). Nacepljene plošče smo inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, dokler celice niso dosegle primerne preraščenosti za transfekcijo.

### 3.2.3.2 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293, HEK293BF1 in HEK293T

Na človeških celičnih kulturah smo izvajali dva tipa poskusov; merili smo aktivnost mutant MD-2 s pomočjo merjenja luciferazne aktivnosti ter izražanje mutant MD-2 v medij.

- Merjenje luciferazne aktivnosti

Pri teh poskusih smo uporabljali celični liniji HEK293 in HEK293BF1. Dan pred transfekcijo smo celice nacepili na ploščo s 96 luknjami; celice HEK293 smo nacepili v koncentraciji  $5 \cdot 10^4$  celic/luknjo, celice HEK293BF1 pa v koncentraciji  $7 \cdot 10^4$  celic/luknjo (volumen suspenzije celic v DMEM s 10 % FBS v posamezni luknji je 100 µl). Pri merjenju aktivnosti mutant MD-2 smo celice HEK293BF1 vedno transficirali s plazmidi, ki so vsebovali zapis za divji tip oz. mutanto hMD-2 (10 ng plazmida na luknjo), za inducibilno fLuc (gen za kresničkino luciferazo – fLuc – je za inducibilnim promotorjem, odvisnim od transkripcijskega faktorja NF-κB; uporabili smo 80 ng plazmida na luknjo) in za konstitutivno rLuc (gen za *Renilla* luciferazo – rLuc – je za konstitutivnim promotorjem, torej se izraža ves čas; uporabili smo 10 ng plazmida na luknjo). Celice smo naslednji dan stimulirali z ustrezno količino endotoksina. Pri poskusih, kjer smo celice HEK293BF1 stimulirali s supernatanti celic HEK293, smo celice HEK293BF1 transficirali s 80 ng plazmida z fLuc ter 10 ng plazmida z rLuc. Celice HEK293 smo transficirali s 100 ng plazmida z zapisom za divji tip oz. mutanto hMD-2. Celice HEK293BF1 smo naslednji dan transficirali s supernatanti celic HEK293, ki so vsebovali MD-2, dodali pa smo jim še ustrezno količino endotoksina.

- Določanje izražanja mutant MD-2 v medij

Z namenom, da bi v mediju dokazali prisotnost mutant MD-2, smo dan pred transfekcijo celice HEK293T nacepili v ploščo s 96 luknjami, in sicer  $3,5 \cdot 10^5$  celic v posamezno luknjo (volumen suspenzije v posamezni luknji je 100 µl). Celice smo naslednji dan transficirali s 250 ng plazmida z zapisom za mutant MD-2. Celicam smo 16 ur po transfekciji zamenjali medij z DMEM z 2 % FBS in 5 ng/ml S-LPS, 24 ur po menjavi pa odvzeli supernatante.

Za navedena tipa poskusov smo uporabljali različna postopka transfekcije.

### 3.2.3.2.1 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293 in HEK293BF1 s transfekcijskim reagentom Lipofectamine 2000

Transfekcijski reagent Lipofectamine 2000 smo uporabljali pri poskusih, pri katerih smo merili luciferazno aktivnost. Transfekcijo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Dan pred transfekcijo smo celice nacepili v ustrezeno mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami. Celice smo nato en dan inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, da so dosegle ustrezeno gostoto oz. preraščenost. Na dan transfekcije smo najprej redčili ustrezeno količino plazmidne DNA v mediju OptiMEM. Ravno tako smo v OptiMEM-u redčili transfekcijski reagent Lipofectamine 2000. Mešanico OptiMEM-a in transfekcijskega reagenta smo 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi, nato smo jo dodali mešanici DNA in OptiMEM-a. Vse skupaj smo inkubirali 20 minut na sobni temperaturi, da so nastali transfekcijski kompleksi. Transfekcijsko mešanico smo dodali celicam in jih v inkubatorju inkubirali štiri ure. V tem času je potekla transfekcija. Po štirih urah smo celicam zamenjali medij s 100 µl svežega DMEM z 10 % FBS. Naslednji dan smo celice stimulirali z endotoksinom. Stimulacija je potekala 16 ur, nato pa smo celice lizirali.

### 3.2.3.2.2 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293T s transfekcijskim reagentom PolyFect

Transfekcijski reagent PolyFect smo uporabljali pri poskusih, pri katerih smo merili oz. dokazovali izražanje mutant MD-2 v medij. Transfekcijo smo izvedli po navodilih proizvajalca po prilagojenem postopku za transfekcijo v mikrotitrskih ploščah s 96 luknjicami. Dan pred transfekcijo smo celice nacepili v ustrezeno mikrotitrsko ploščo. Celice smo nato en dan inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, da so dosegle ustrezeno gostoto oz. preraščenost. Na dan transfekcije smo najprej redčili ustrezeno količino plazmidne DNA v mediju DMEM brez dodanega FBS. Ravno tako smo v DMEM brez FBS redčili transfekcijski reagent. Mešanici smo nato združili in inkubirali 10 minut na sobni temperaturi, da so nastali transfekcijski kompleksi. Transfekcijsko mešanico smo dodali celicam in jih v inkubatorju inkubirali šestnajst ur. Nato smo celicam zamenjali

medij s 100 µl svežega DMEM z 2 % FBS in 5 ng/ml S-LPS. Naslednji dan (po 24 urah) smo celicam odvzeli supernatant in pripravili vzorce za poliakrilamidno elektroforezo.

### 3.2.3.3 Stimulacija transficiranih celic ter liza celic

#### 3.2.3.3.1 Stimulacija celic pri merjenju aktivnosti mutant MD-2.

Ker je transfekcijski reagent toksičen za celice, smo štiri ure po transfekciji celicam zamenjali gojišče s svežim medijem DMEM z 10 % FBS. Nato smo počakali približno 30 ur; v tem času so se transficirani proteini prevedli, sintetiziran MD-2 pa se je izločal v medij. Nato smo celice stimulirali z dodatkom 10 µl ustrezne redčine endotoksina, tako da smo v luknjici v skupnem volumnu 110 µl dobili željeno koncentracijo endotoksina. Kontrolnim celicam smo namesto endotoksina dodali 10 µl medija DMEM z 10 % FBS. Čez 16 ur smo celicam odstranili medij in jih lizirali s 25 µl liznega pufa (Promega) za lizo celic, pri katerih smo merili luciferazno aktivnost. Do meritev smo plošče z liziranimi celicami shranili na -20 °C.

#### 3.2.3.3.2 Stimulacija s supernatanti

Na dan stimulacije smo celicam HEK293, ki so bile prejšnji dan transficirane s 100 ng plazmida z zapisom za mutanto MD-2, odvzeli supernatant (ker smo delali v ponovitvah, smo supernatante z isto mutanto združili). Supernatante smo centrifugirali pri 10000 obratih na minuto, da bi odstranili morebitne mrtve celice oz. celične ostanke. Supernatante smo nato razdelili, jim dodali ustrezne redčitve endotoksina ter jih inkubirali 30 minut na sobni temperaturi. Nato smo jih dodali celicam HEK293BF1 (100 µl na luknjico), ki so bile prejšnji dan transficirane s plazmidi z zapisom za fLuc in rLuc. Celice HEK293BF1 smo nato inkubirali 16 ur v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, potem pa jih lizirali s 25 µl liznega pufa in shranili na -20 °C.

### 3.2.4 Merjenje luciferazne aktivnosti

Tik pred merjenjem luciferazne aktivnosti smo pripravili pufra za merjenje luciferazne aktivnosti. Odtaljeno ploščo z liziranimi celicami, katerim smo želeli meriti luciferazno aktivnost, smo položili na mizico luminometra Mithras, injektorja pa smo pomagali v ustrezna pufra. Pri merjenju luciferazne aktivnosti luminometer opravi več zaporednih meritov. Najprej pomeri ozadje, nato pa vbrizga pufer za kresničkino luciferazo (fLuc) in pomeri njeno aktivnost. Nato vbrizga pufer za *Renilla* luciferazo (rLuc), ki vsebuje substrat za rLuc, hkrati pa tudi inhibitor za delovanje fLuc. Tako lahko z naslednjo meritvijo pomeri aktivnost rLuc. Ker ima plazmid z zapisom za rLuc konstitutivni promotor, se *Renilla* luciferaza ves čas izraža in nam tako prikazuje delež vseh celic, ki so sprejele plazmid z zapisom za rLuc. Aktivnost rLuc nam torej pove delež transficiranih celic, medtem ko nam aktivnost fLuc (transkripcijo mRNA za fLuc nadzira inducibilni NF-κB promotor) kaže aktivacijo TLR4/MD-2 signalne poti ob stimulaciji s S-LPS. Razmerje fLuc/rLuc (RLA – relativna luciferazna aktivnost) nam torej pove normalizirano vrednost transficiranih celic glede na transficirane celice.

### 3.2.5 Določanje proteinske sinteze

#### 3.2.5.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS-PAGE)

Za elektroforezo smo uporabili vertikalni sistem Mini-Protean II. Gele smo pripravili tako, da smo med dve stekelci, ločeni za 0,75 mm, najprej vlili ločitveni gel (15 % poliakrilamidni gel), ga prelili s 150 µl izopropanola in ga pustili 1 uro, da je polimeriziral. Nato smo odstranili izobutanol in na ločitveni gel vlili 4 % vstopni gel, v katerega smo vstavili glavniček, s katerim smo naredili žepke za nanos vzorcev. Tudi vstopni gel smo pustili polimerizirati 1 uro. Gele smo nato takoj uporabili, ali pa jih shranili na 4 °C.

Vzorce (supernatante celic HEK293T, transficiranih s 250 ng plazmida z zapisom za mutanto MD-2) smo najprej centrifugirali 3 min pri 10000 vrt/min, da smo jim odstranili

morebitne ostanke celic. Supernatantu smo dodali 4 x reducirajoči vzorčni pufer z SDS in jih denaturirali s segrevanjem 5 min pri 100°C. Nato smo vzorce nanesli na gel (20 µl vzorca na žepek), poleg vzorcev smo dodali še proteinski velikostni standard (SeeBluePlus, 5 µl na žepek).

Elektroforeza je potekala v 1 x elektroforeznem pufru SDS 45 min pri konstantni napetosti 200 V. Po končani elektroforezi smo odstranili vstopni gel, ločitveni gel pa uporabili v prenosu western.

### 3.2.5.2 Prenos western

Uporabljali smo dva tipa prenosa western.

- **Polsuhi prenos**

Po elektroforezni ločbi smo poliakrilamidni gel sprali z MQ in ga namakali v pufru za polsuhi prenos. V enakem pufru smo namočili tudi nitrocelulozno membrano (z 0,45 µm velikimi porami) in filtrirne papirje. Nato smo sestavili aparaturo za polsuhi prenos western; na spodnjo površino aparature (anodo) smo položili dva kosa omočenega filter papirja, nato pa še membrano, gel in še dva kosa filter papirja. Aparaturo za prenos smo pokrili z zgornjo površino (katodo) in tako omogočili prenos proteinov iz gela na membrano. Prenos je potekal 1 uro in 20 minut pri konstantnem toku 35 mA. Po končanem prenosu smo membrano sprali z MQ. Nato smo jo pobarvali z barvilkom Ponceau-S, da bi se prepričali, ali je prenos uspel. Barvanje v 13 ml barvila Ponceau je potekalo 1 do 2 minuti. Barvilo smo nato sprali s pufrom TBS.

- **Mokri prenos**

Mokri prenos se izvede na podoben način kot polsuhi. Poliakrilamidni gel, filter papirje in nitrocelulozno membrano smo namakali v pufru za mokri prenos. Sestavili smo aparaturo za mokri prenos, pri tem pa smo pazili, da sta bila membrana in gel ustrezno orientirana glede na anodo. Prenos je potekal 1 uro pri konstantnem toku 350 mA.

### 3.2.5.3 Imunodetekcija proteinov po prenosu western

Nespecifična vezavna mesta na membrani smo blokirali s 5 % posnetim mlekom v TBS. Blokiranje je potekalo bodisi 1,5 ure med stresanjem pri sobni temperaturi ali pa preko noči med stresanjem pri 4 °C. Po blokiranju smo nitrocelulozno membrano spirali s pufrom TBS (2 X 5 min). Sprano nitrocelulozno membrano smo prenesli v plastično vrečko in dodali primarna mišja monoklonska protitelesa proti His (vse mutante MD-2 in divji tip so bili označeni s His), redčena 1 : 2000 v raztopini za blokiranje (5 % mleko v TBS). Zavarjeno vrečko smo inkubirali 1,5 ure med stresanjem pri sobni temperaturi ali pa preko noči med stresanjem pri 4 °C. Sledilo je spiranje nevezanih protiteles (4-krat 5 min) s pufrom TBS. Nato smo membrano inkubirali v raztopini za blokiranje s sekundarnimi 1 proti 3000 redčenimi kozjimi proti-mišjimi protitelesi, konjugiranimi s peroksidazo. Inkubacija je potekala v zavarjeni vrečki 45 minut med stresanjem pri sobni temperaturi. Po spiranju membrane s pufrom TBS (4-krat 5 min) smo membrano prelimi z reagentom Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate. Substrat vsebuje luminol, ki ga hrenova peroksidaza na sekundarnih protitelesih oksidira. Membrano smo inkubirali 5 min pri sobni temperaturi, nato odlili reagent in jo položili v hibridizacijsko vrečko ter zaprli v kaseto. Oksidiran luminol preide v vzbujeno stanje, pri prehodu v osnovno stanje pa se sprošča svetloba, ki jo zaznamo na filmu, ki smo ga v temnici položili na membrano. Film smo izpostavili sproščeni svetlobi izbrano dolgo časa. Nato smo film 3 min razvijali v kadički z razvijalcem. Sledilo je spiranje z vodo in prenos v kadičko s fiksirjem za 3 min. Razvit film smo zopet sprali s tekočo vodo in ga posušili.

## 4 REZULTATI

Na podlagi modela proteina MD-2 (Gruber in sod., 2004) so pripravili mutante (J. Vašl<sup>1</sup>), ki naj bi pokazale pomen posameznih aminokislin proteina MD-2 za sposobnost vezave LPS (pregl. 13). Izbrali so aminokisline na mestih 82, 85 in 87, ki se nahajajo na t.i. alifatski zanki (ta del proteina MD-2 oblikuje zanko, bogato z alifatskimi aminokislinami). Alifatska zanka se nahaja v bližini vhoda v hidrofobni žep, kamor se vežejo acilne verige endotoksa (sl. 10, sl. 11). Ker je hidrofobni žep premajhen, da bi se vanj lahko vezalo vseh šest verig heksaaciliranega LPS, so predpostavili, da (vsaj) ena veriga heksaaciliranega LPS ostane zunaj hidrofobnega žepa. Ta veriga naj bi prišla v stik z aminokislinami alifatske zanke. Da bi preverili pomen aminokislin na mestih 82, 85 in 87, so na teh mestih pripravili mutante.

Preglednica 13: Mutante proteina MD-2

Mesto	Aminokislina	Mutacija	Mutanta	Tip mutante
82	Valin	Izolevcin	V82I	Hidrofobne
82	Valin	Fenilalanin	V82F	
85	Metionin	Fenilalanin	M85F	
85	Metionin	Triptofan	M85W	
87	Levcin	Fenilalanin	L87F	
82, 85	Valin, Metionin	Izolevcin	V82IM85I	
82	Valin	Glutamat	V82E	Polarne
82	Valin	Asparagin	V82N	
85	Metionin	Lizin	M85K	
85	Metionin	Aspartat	M85D	
85	Metionin	Asparagin	M85N	
87	Levcin	Lizin	L87K	

<sup>1</sup> Mutante je pripravila Jožica Vašl (Kemijski inštitut Ljubljana) v okviru svojega doktorskega dela.

#### 4.1 ZUNAJCELIČNO IZLOČANJE MUTANT MD-2

Ker lahko razlike v nivoju izražanja in zunajceličnega izločanja mutant vplivajo na interpretacijo rezultatov, smo najprej preverili stopnjo zunajceličnega kopiranja posameznih mutant. Ker so bile mutacije aminokislin 82, 85 in 87 točkovne (eno oz. največ dve aminokislinski mesti hkrati) in v predelu proteina, kateremu se ne pripisuje vloge pri ustreznem zvitju oz. strukturi, smo predpostavili, da mutacije ne bodo bistveno vplivale na topnost MD-2 oz. njegovo izločanje iz celic.

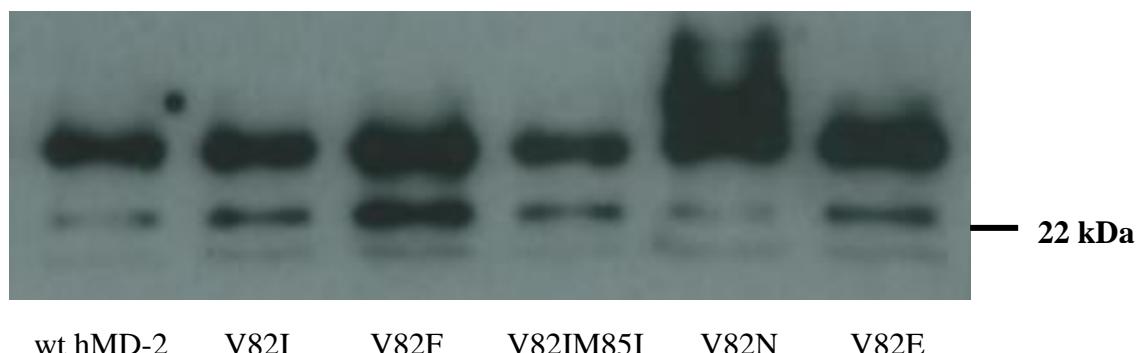
Da bi to predpostavko preverili, smo celice HEK293T prehodno transficirali s plazmidom pEF-BOS z zapisom za divji tip proteina MD-2 oz. z zapisom za posamezne mutante. 16 ur po transfekciji smo celicam zamenjali medij, 24 ur po menjavi medija pa smo pobrali supernatante celic. Vzorce supernatantov smo nanesli na akrilamidni gel, jih prenesli na nitrocelulozno membrano in MD-2 detektirali z anti-His protitelesi (sl. 12).

Ker je MD-2 na dveh mestih glikoziliran, potuje na elektroforeznem gelu (SDS-PAGE) v reducirajočih razmerah v treh pasovih. Najpočasneje potuje največja, dvakrat glikozilirana oblika, najhitreje pa neglikoziliran MD-2. Ugotovili smo, da je količina vseh mutant MD-2 v mediju primerljiva količini divjega tipa MD-2. Izjema je mutanta M85K, ki jo je glede na divji tip MD-2 v mediju več.

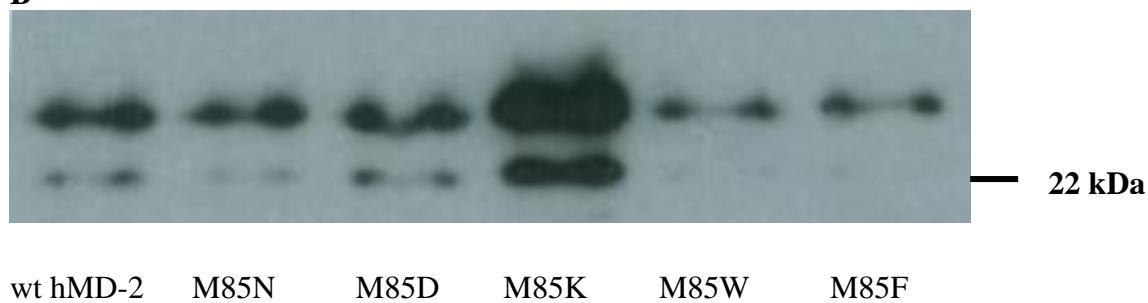
Oblak A. Vpliv zamenjave aminokislin 82, 85 in 87 na aktivnost proteina MD-2.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2008

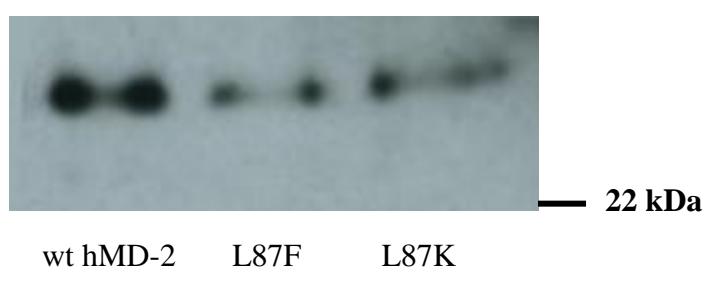
A



B



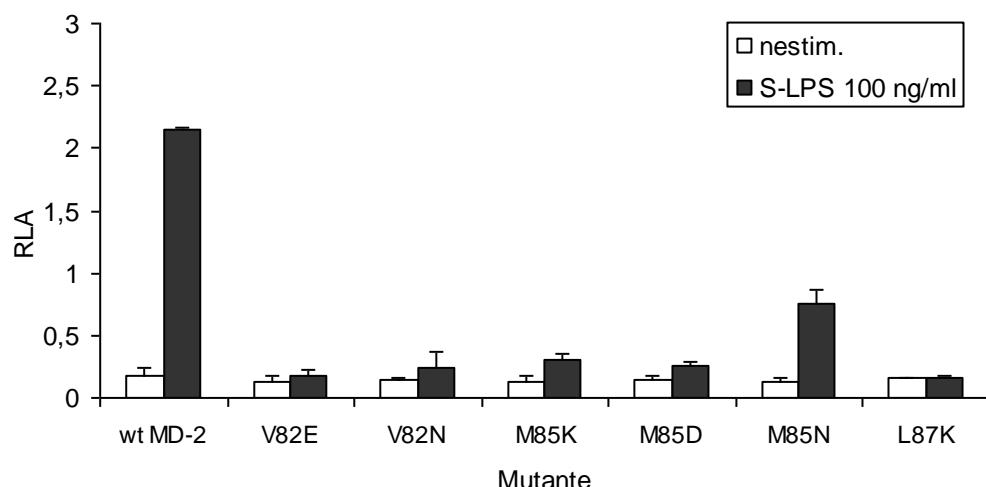
C



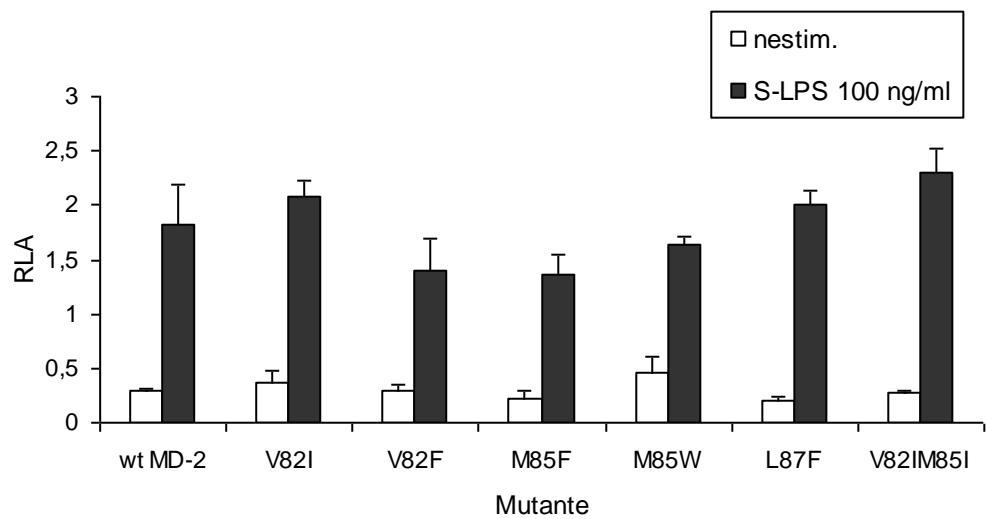
Slika 12: Zunajcelično izražanje mutant MD-2. Celice HEK293T smo bile prehodno transficirali z 250 ng plazmida z zapisom za ustrezno mutanto. Naslednji dan smo jim zamenjali medij s DMEM z 2%FBS in 5 ng/ml S-LPS. 24 ur kasneje smo pobrali supernatante celic, pripravili vzorce s štirikratnim reducirajočim nanašalnim pufrom in izvedli elektroforezo (SDS-PAGE) ter prenos western. Proteine smo detektirali s pomočjo primarnih protiteles anti-His in sekundarnih protiteles, označenih s peroksidazo. (A) Mutante na mestu V82. Ekspozicija filma: 5 minut. Reagent Femto. (B) Mutante na mestu M85. Ekspozicija filma: 5 minut. Reagent Pico. (C) Mutante na mestu L87. Ekspozicija filma: 1 minuta. Reagent Femto.

#### 4.2 POMEN AMINOKISLIN 82, 85 IN 87 ZA BIOLOŠKO AKTIVNOST PROTEINA MD-2

Predpostavili smo, da bo povečanje polarnosti aminokislin (glede na divji tip proteina) imelo negativen učinek na biološko aktivnost MD-2, saj so acilne verige LPS hidrofobne, povečanje hidrofobnosti aminokislin pa ne bo oslabilo biološke aktivnosti MD-2 oz. bo nanjo imelo pozitiven učinek. Da bi preverili te predpostavke, smo celice HEK293 prehodno transficirali s plazmidom z zapisom za divji tip človeškega MD-2 oz. s plazmidi z zapisom za posamezne mutante. Nato smo celice aktivirali s S-LPS in izmerili celično aktivacijo s pomočjo dvojnega luciferaznega testa. Iz slike 13A je razvidno, da mutante s polarnimi aminokislinami niso bile sposobne sprožiti celičnega odziva. Odziv mutant s hidrofobnimi aminokislinami je bil primerljiv odzivu divjega tipa MD-2 oz. je bil celo rahlo povečan (sl.13B).



A



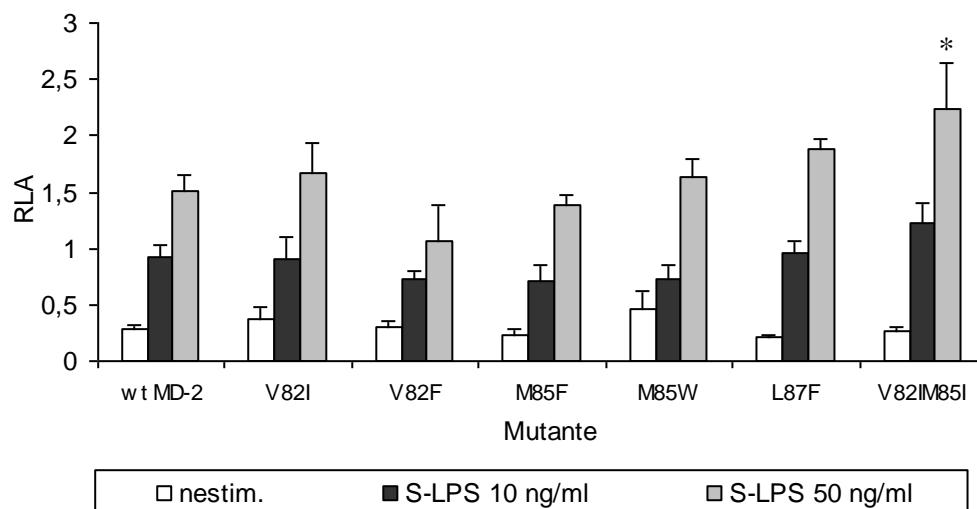
B

Slika 13: Povečanje polarnosti aminokislin 82, 85 in 87 proteina MD-2 negativno vpliva na njegovo biološko aktivnost. Celice HEK293BF1/TLR4 smo prehodno kotransfirali s plazmidom z zapisom za divji tip hMD-2 ali mutante hMD-2 v kombinaciji z reporterskima plazmidoma (od NF- $\kappa$ B odvisnim luciferaznim plazmidom in konstitutivnim renilnim plazmidom). 32 ur po transfekciji smo celice aktivirali s S-LPS, jih po 16 urah lizirali in izmerili luciferazno aktivnost. RLA smo izračunali z normalizacijo luciferazne aktivnosti glede na aktivnost rLuc v določenem vzorcu. Vrednosti RLA smo izračunali iz povprečja treh vrednosti  $\pm$  STDEV. Mutante s povečano polarnostjo imajo zelo oslabljeno biološko aktivnost (A), mutante s povečano hidrofobnostjo pa so aktivnost obdržale (B).

#### 4.2.1 Biološka aktivnost hidrofobnih mutant proteina MD-2

##### 4.2.1.1 Aktivacija s S-LPS

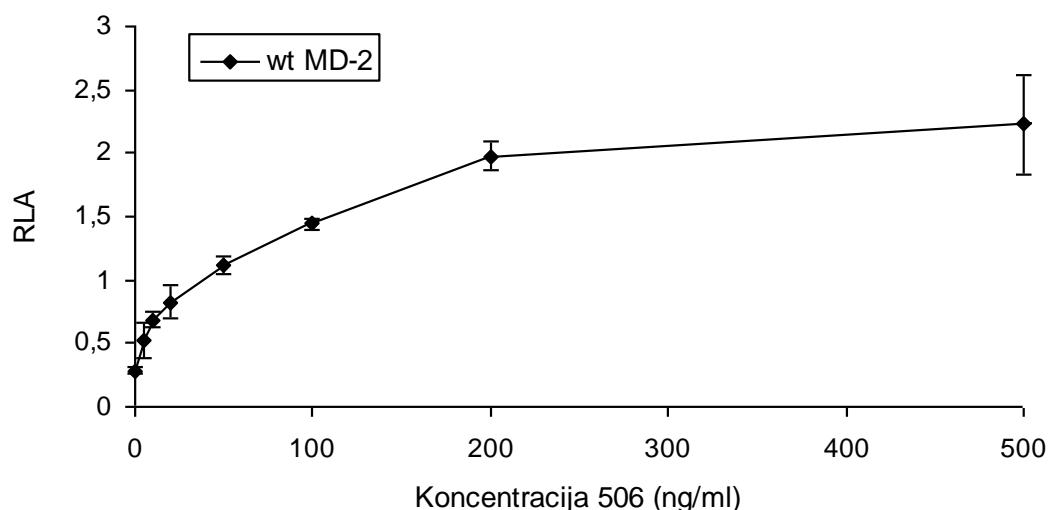
Ker polarne mutante niso bile biološko aktivne, smo nadaljnje poskuse izvajali samo s skupino mutant, ki so imele aminokisline na mestih 82, 85 in 87 spremenjene v bolj hidrofobne. Vse hidrofobne mutante so bile biološko aktivne tudi pri nižjih koncentracijah endotoksina (sl. 14). Aktivnost mutant V82I in L87F je bila primerljiva z divjim tipom proteina MD-2, dvojna mutanta V82IM85I je bila rahlo bolj aktivna, ostale mutante pa so imele glede na divji tip MD-2 rahlo zmanjšano aktivnost.



Slika 14: Povečanje hidrofobnosti aminokislin 82, 85 in 87 proteina MD-2 nima negativnega vpliva na njegovo biološko aktivnost. Celice HEK293BF1/TLR4 smo prehodno kotransfirali s plazmidom z zapisom za divji tip hMD-2 ali mutantne hMD-2 v kombinaciji z reporterskim plazmidom (od NF- $\kappa$ B odvisnim luciferaznim plazmidom in konstitutivnim renilnim plazmidom). 32 ur po transfekciji smo celice aktivirali z različnimi koncentracijami S-LPS, jih po 16 urah lizirali in izmerili luciferazno aktivnost. RLA smo izračunali z normalizacijo luciferazne aktivnosti glede na aktivnost rLuc v določenem vzorcu. Vrednosti RLA smo izračunali iz povprečja treh vrednosti  $\pm$  STDEV. \*, povečanje aktivnosti mutantne V82IM85I glede na divji tip MD-2 pri stimulaciji s 50 ng/ml S-LPS je statistično značilno ( $p<0,05$ ).

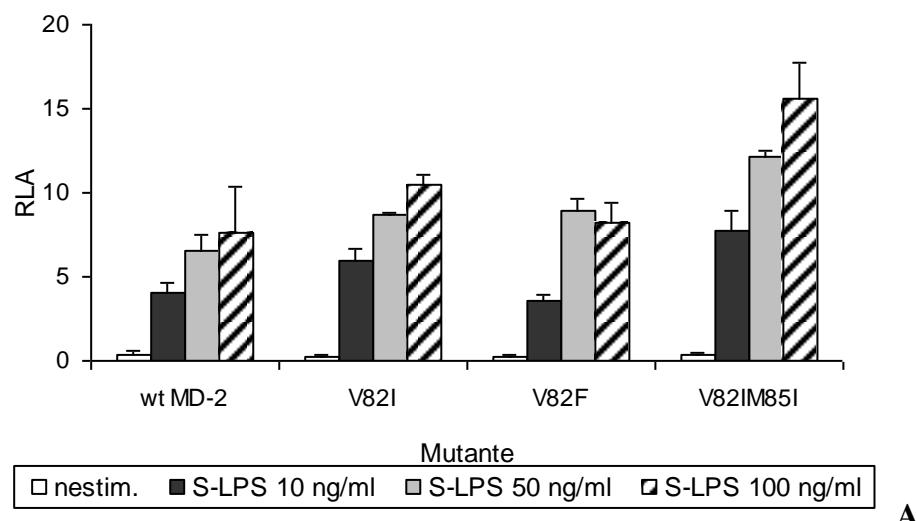
#### 4.2.1.2 Aktivacija s spojino 506 in z Ra-LPS

Spojina 506 je sintetični lipid A, torej endotoksin brez sladkornih ostankov. Lipid A je del endotoksina, ki je odgovoren za aktivacijo kompleksa MD-2/TLR4. Z namenom, da bi ugotovili, katere so optimalne koncentracije endotoksina 506 za celično stimulacijo, smo najprej celice, transficirane z plazmidom z zapisom za divji tip MD-2, stimulirali z različnimi koncentracijami endotoksina 506 (sl.15). Ugotovili smo, da se celična aktivacija povečuje v odvisnosti od koncentracije endotoksina 506 do koncentracije 200 ng/ml. Pri višjih koncentracijah pride do zasičenja, zato so optimalne koncentracije za stimulacijo pod to mejo.

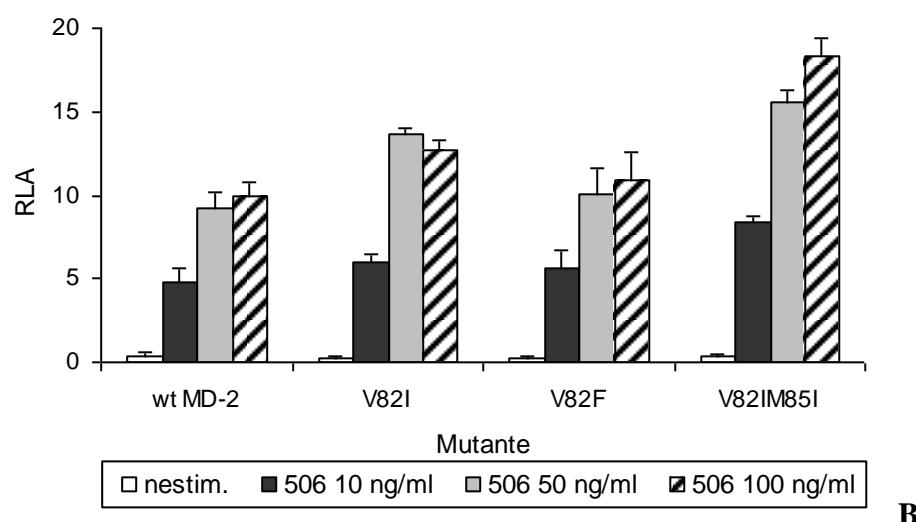


Slika 15: Lipid A je zadosten del endotoksina za aktivacijo kompleksa MD-2/TLR4. Celice HEK293BF1/TLR4 smo prehodno kotransficirali s plazmidom z zapisom za divji tip hMD-2 v kombinaciji z reporterskima luciferaznima plazmidoma. Celice smo aktivirali z različnimi koncentracijami spojine 506, jih po 16 urah lizirali in izmerili luciferazno aktivnost. RLA smo izračunali z normalizacijo luciferazne aktivnosti glede na aktivnost rLuc v določenem vzorcu. Vrednosti RLA smo izračunali iz povprečja treh vrednosti  $\pm$  STDEV.

Pokazali smo, da je tudi pri mutantah MD-2 na mestu V82 celična aktivacija z lipidom A (spojino 506) primerljiva aktivaciji s celotnim S-LPS (sl. 16).



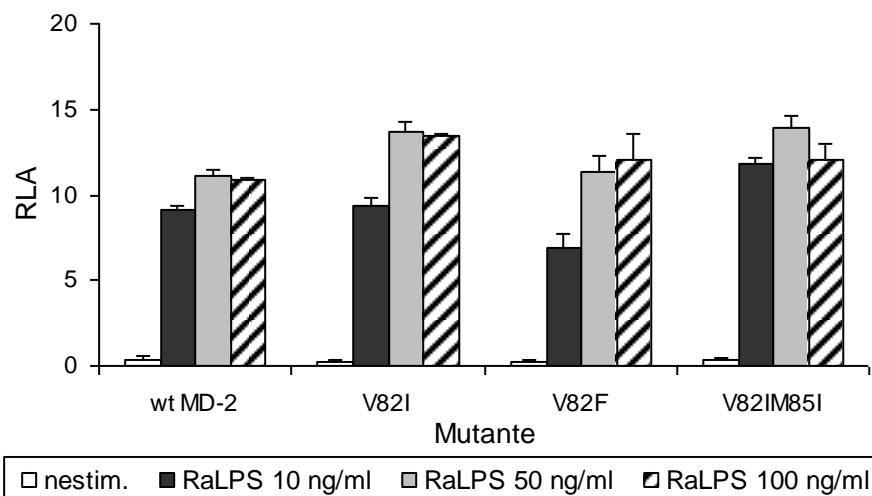
A



B

Slika 16: Aktivacija kompleksa wtMD-2/TLR4 oz. mutMD-2/TLR4 je neodvisna od polisaharidnega dela endotoksina. Celice HEK293BF1/TLR4 smo prehodno kotransfirali s plazmidom z zapisom za divji tip hMD-2 oz. mutantno hMD-2 v kombinaciji z reporterstima luciferaznima plazmidoma. Celice smo aktivirali s S-LPS oz. spojino 506 (A) oz. z različnimi koncentracijami spojine 506 (B), jih po 16 urah lizirali in izmerili luciferazno aktivnost. RLA smo izračunali z normalizacijo luciferazne aktivnosti glede na aktivnost rLuc v določenem vzorcu. Vrednosti RLA smo izračunali iz povprečja treh vrednosti ± STDEV.

Ra-LPS je lipid A, ki ima vse sladkorje, ki sestavljajo sredico, manjkajo pa mu slatkorni ostanki antiga O. Celično aktivacijo z Ra-LPS smo preverili na skupini mutant aminokisline V82 (sl. 17).

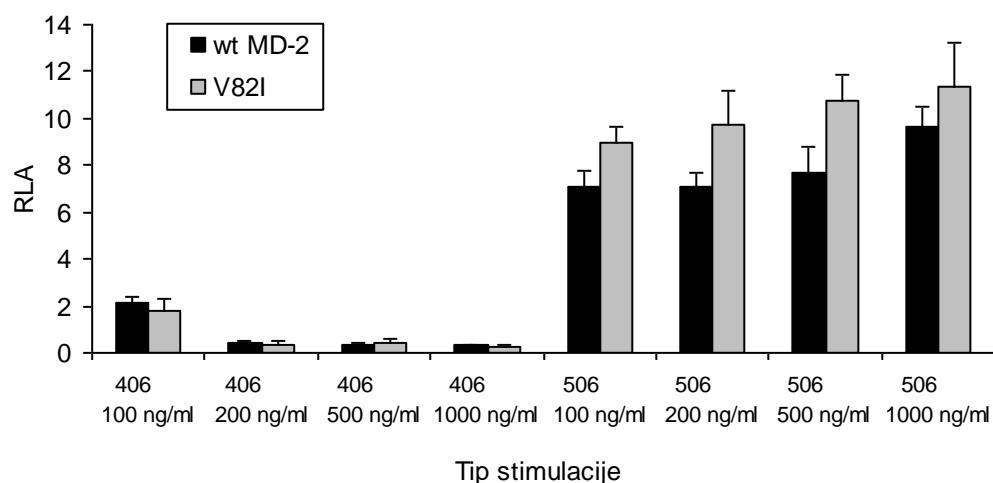


Slika 17: Ra-LPS uspešno aktivira celice. Celice HEK293BF1/TLR4 smo prehodno kotransfirali s plazmidom z zapisom za divji tip hMD-2 oz. mutanto hMD-2 v kombinaciji z reporterskima luciferaznima plazmidoma. Celice smo aktivirali z različnimi koncentracijami Ra-LPS, jih po 16 urah lizirali in izmerili luciferazno aktivnost. RLA smo izračunali z normalizacijo luciferazne aktivnosti glede na aktivnost rLuc v določenem vzorcu. Vrednosti RLA smo izračunali iz povprečja treh vrednosti  $\pm$  STDEV.

Slike 16 in 17 predstavljata hkrati izvedene poskuse, zato so vrednosti RLA medsebojno primerljive. Ugotovili smo, da se odziv posameznih mutant ne razlikuje bistveno glede na tip stimulacije (S-LPS, spojina 506 ali RaLPS).

#### 4.2.1.3 Aktivacija s spojino 406 in z endotoksinom msbB

Spojina 406 je sintetični lipid IVa, tetraaciliran prekurzor pri sintezi S-LPS. Lipid IVa je agonist mišjega MD-2, toda antagonist divjega tipa človeškega MD-2. Iz slike 18 je razvidno, da spojina 406 ne izzove niti aktivacije divjega tipa MD-2 niti mutante V82I, ki je drugače normalno aktivna.

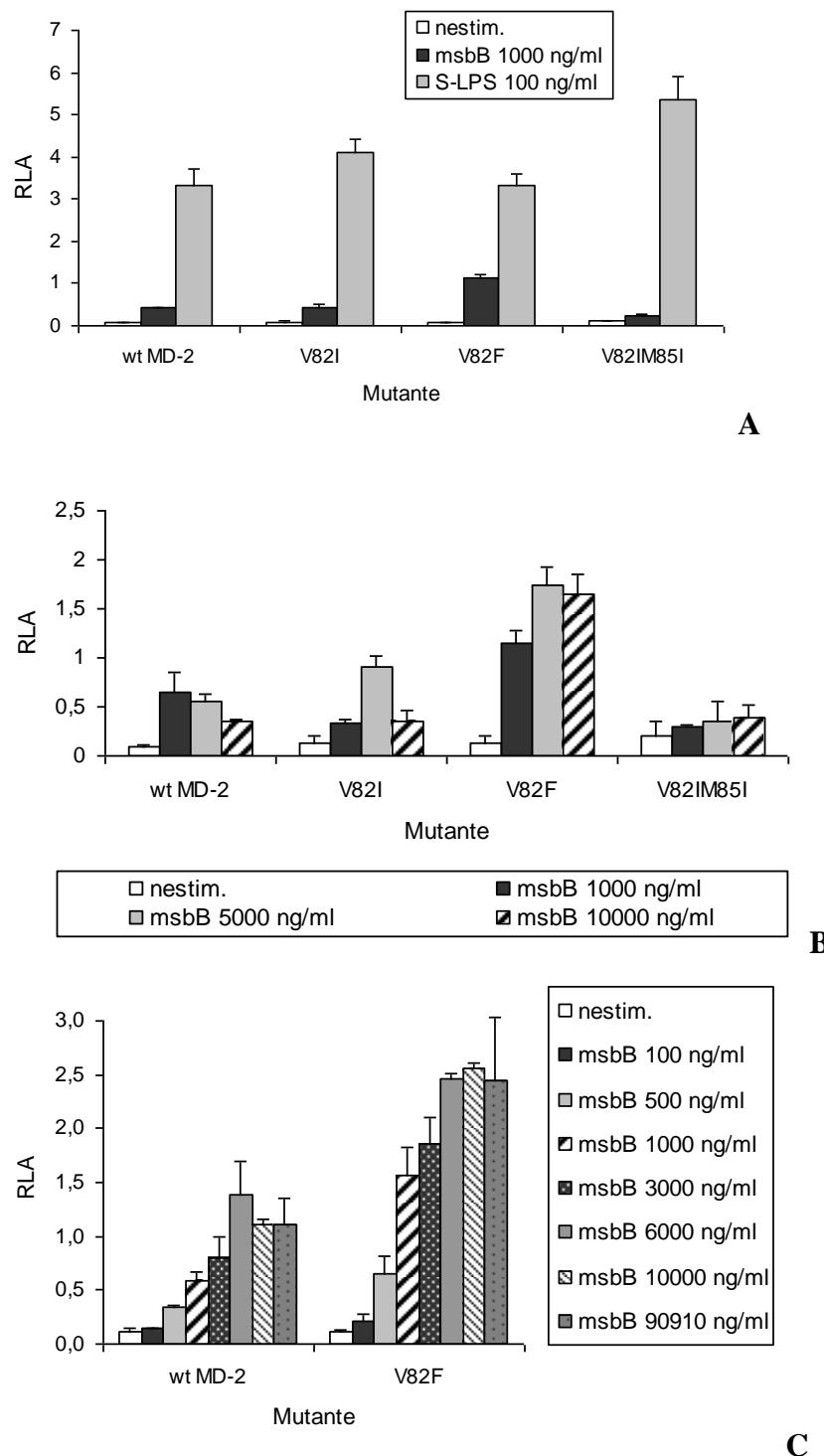


Slika 18: Lipid IVa ne aktivira celic. Celice HEK293BF1/TLR4 smo prehodno kotransfirali s plazmidom z zapisom za divji tip hMD-2 oz. mutanto V82I v kombinaciji z reporterskima luciferaznima plazmidoma. Celice smo aktivirali z različnimi koncentracijami spojine 406, jih po 16 urah lizirali in izmerili luciferazno aktivnost. RLA smo izračunali z normalizacijo luciferazne aktivnosti glede na aktivnost rLuc v določenem vzorcu. Vrednosti RLA smo izračunali iz povprečja treh vrednosti  $\pm$  STDEV

Endotoksin msbB je pentaaciliran endotoksin, ki ga sintetizira *E. coli* z okvaro v genu *msbB* (Somerville, 1996). Endotoksin msbB je antagonist proteina MD-2. Z uporabo endotoksina msbB smo preverili vpliv števila acilnih verig endotoksina na aktivacijo. Pokazali smo, da pri visokih koncentracijah izzove šibko celično aktivacijo (sl. 19). Izjema je mutanta V82F, kjer je aktivacija večja kot pri ostalih; zato smo za stimulacijo uporabili tudi višje koncentracije endotoksina msbB.

Oblak A. Vpliv zamenjave aminokislin 82, 85 in 87 na aktivnost proteina MD-2.

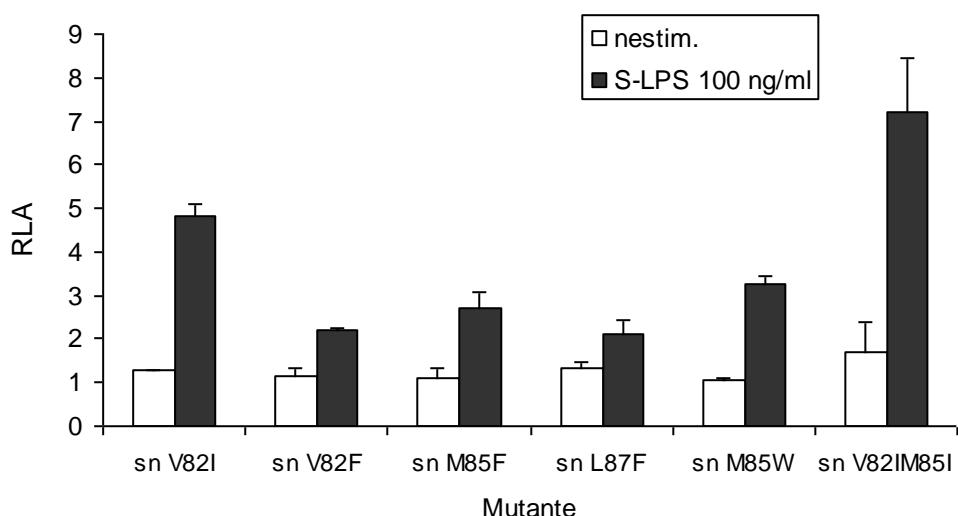
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2008



Slika 19: Endotoksin msbB šibko aktivira celice pri izredno povišanih koncentracijah. Celice HEK293BF1/TLR4 smo prehodno kotransfirali s plazmidom z zapisom za divji tip hMD-2 oz. mutanto MD-2 v kombinaciji z reportereskima luciferaznima plazmidoma. Celice smo aktivirali z različnimi koncentracijami endotoksina msbB, jih po 16 urah lizirali in izmerili luciferazno aktivnost. (A,B) Tudi pri desetkrat višji koncentraciji endotoksin msbB le šibko aktivira celice v primerjavi s S-LPS. (C) Aktivacija mutante V82F z endotoksinom msbB je višja v primerjavi z divjim tipom MD-2. RLA smo izračunali z normalizacijo luciferazne aktivnosti glede na aktivnost rLuc v določenem vzorcu. Vrednosti RLA smo izračunali iz povprečja treh vrednosti  $\pm$  STDEV.

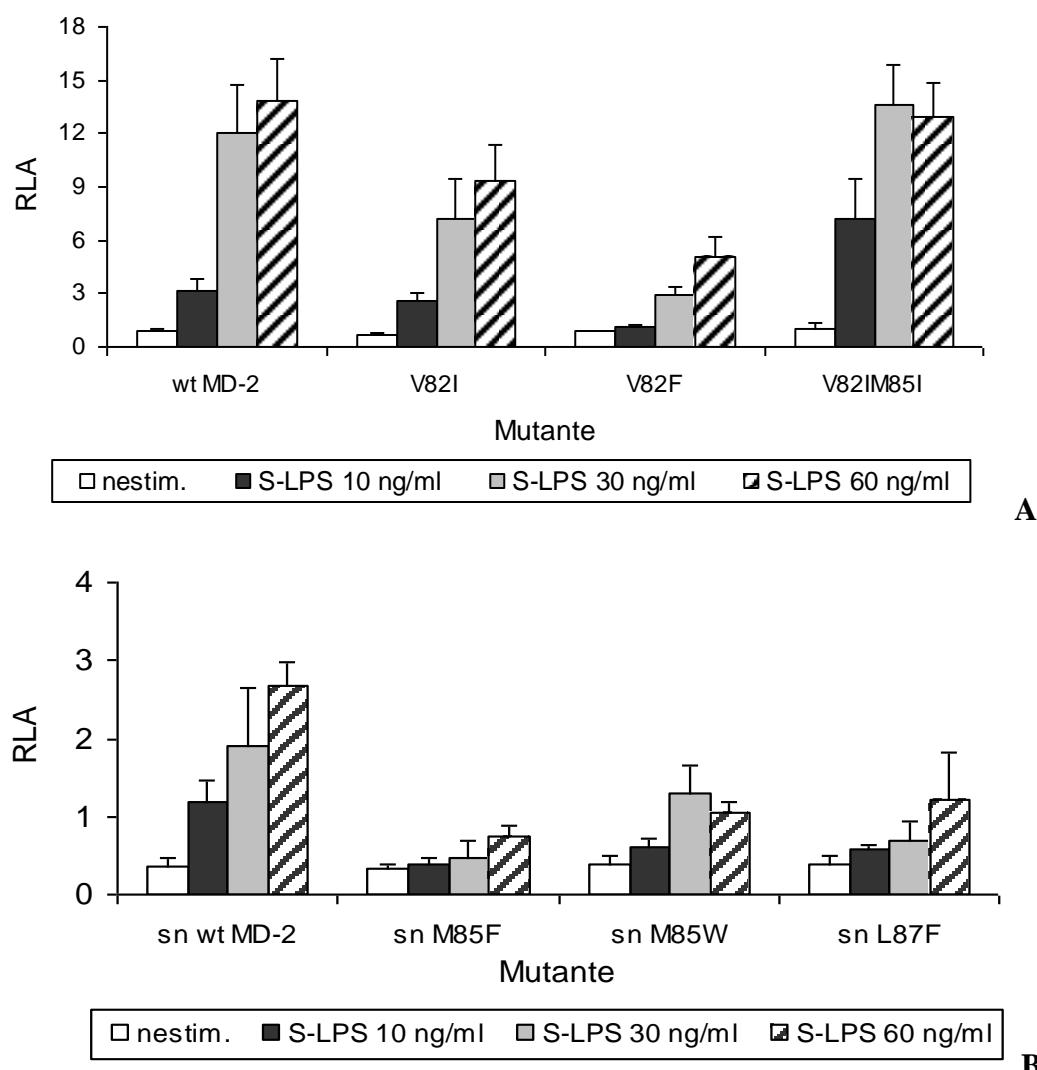
#### 4.3 STABILNOST MUTANT MD-2 V MEDIJU

Pokazali smo, da se hidrofobne mutante primerljivo izločajo v medij oz. gojišče (DMEM z 10 % FBS). Znano pa je, da MD-2 v mediju pri fiziološki temperaturi hitro izgublja aktivnost (Kennedy in sod., 2004). Mutacije, ki lahko vplivajo na topnost, bi lahko vplivale tudi na stabilnost mutant in s tem na sposobnost celične aktivacije. Da bi preverili stabilnost mutant MD-2 v mediju, smo celice HEK293 transficirali s plazmidom z zapisom za mutant MD-2, nato pa s supernatantom, ki je vseboval topno mutant MD-2, aktivirali celice HEK293BF1/TLR4 (sl. 20, sl. 21).



Slika 20: Topen MD-2 ohrani zadostno aktivnost za aktivacijo receptorja TLR4. Celice HEK293 smo prehodno transficirali s plazmidom z zapisom za mutant MD-2. Po 34 h smo pobrali supernatante celic (sn) s topnim MD-2 v DMEM 10% FBS in inkubirali s S-LPS. Po 30 min inkubaciji na sobni temperaturi smo sn MD-2 dodali celicam HEK293BF1/TLR4, katere smo prehodno transficirali z reporterskim plazmidom (od NF- $\kappa$ B odvisni luciferazni plazmid in konstitutivni renilni plazmid) in jih s tem aktivirali. 16 ur po stimulaciji smo celice HEK293BF1/TLR4 lizirali in izmerili luciferazno aktivnost. RLA smo izračunali z normalizacijo luciferazne aktivnosti glede na aktivnost rLuc v določenem vzorcu. Vrednosti RLA smo izračunali iz povprečja treh vrednosti  $\pm$  STDEV.

Ugotovili smo, da mutanta V82IM85I tudi pri dodatku celicam v topni obliki močneje sproži celični odziv kot ostale mutante.



Slika 21: Aktivacija celic z LPS s supernatanti, ki vsebujejo MD-2. (A) Aktivacija mutant na mestu V82. (B) Aktivacija mutant na mestih M85 in L87. RLA smo izračunali z normalizacijo luciferazne aktivnosti glede na aktivnost rLuc v določenem vzorcu. Vrednosti RLA smo izračunali iz povprečja treh vrednosti  $\pm$  STDEV.

Pri mutantah na mestu V82 se je od divjega tipa najbolj bistveno razlikovala mutanta V82F, pri kateri je bila aktivacija celic po dodatku mutante v topni obliki nižja. Prav tako je bila aktivacija celic nižja pri mutanti M85F.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

MD-2 je protein, ki je ključen za učinkovito obrambo pred po Gramu negativnimi bakterijami. Prepozna in veže lipopolisaharid ter nato preko receptorja TLR4 sproži imunski odziv. Poznavanje strukture MD-2, ki je ključno za razumevanje mehanizma vezave endotoksina, je potencialno pomembno tudi za razvoj učinkovitih postopkov zdravljenja bolezni, pri katerih je vpletен receptorski kompleks MD-2/TLR4.

Na podlagi modela proteina MD-2 (Gruber in sod., 2004) so bile pripravljene mutante, katerih aktivnost naj bi pokazala pomen posameznih aminokislin proteina MD-2 za sposobnost vezave LPS oz. aktivacijo signalnih poti, ki vodijo do sinteze vnetnih citokinov. Izbrane so bile aminokisline na mestih 82, 85 in 87, ki ležijo v bližini vhoda v hidrofobni žep, kamor se vežejo acilne verige endotoksina.

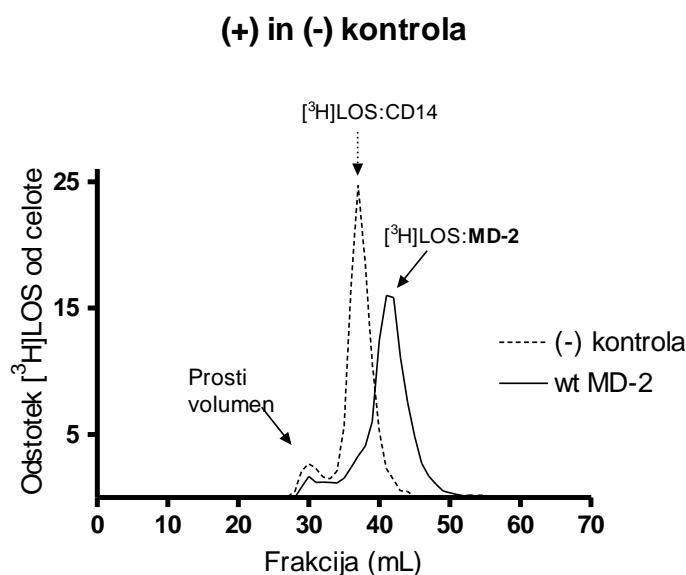
Kristalni strukturi MD-2 (Ohto in sod., 2007; Kim in sod., 2007) sta pokazali, da že štiri verige antagonista lipida IVa oz. eritorana skorajda povsem zapolnijo volumen hidrofobnega žepa. Kristalna struktura MD-2 z vezanim antagonistom lipidom IVa se le malo razlikuje od nativne strukture brez vezanega liganda. Edina večja sprememba je na mestu K122, kjer pride ob vezavi antagonista do premika stranske verige lizina, velikost hidrofobnega žepa pa se ne spremeni (Ohto in sod., 2007). Predpostavljam, da tudi ob vezavi agonista lipida A ne pride do raztezanja hidrofobnega žepa, zato naj bi ena oz. dve verigi heksaaciliranega lipida A ostala/i zunaj hidrofobnega žepa in bi prišla/i v stik z aminokislinsimi alifatske zanke. Predpostavljam, da so le-te pomembne pri vezavi endotoksina.

Da bi preverili pomen aminokislin na mestih 82, 85 in 87 proteina MD-2, smo primerjali mutante na teh mestih z divjim tipom proteina. Primerjava je potekala s pomočjo večih metod. V okviru diplomskega dela smo s pomočjo akrilamidne elektroforeze in imunodetekcije preverili zunajcelično izločanje mutant v medij. S pomočjo dvojnega luciferaznega testa smo preverili sposobnost mutant, da aktivirajo celični imunski odziv. Celice smo stimulirali z različnimi tipi endotoksina, da bi ugotovili ali so aminokisline na tem predelu odgovorne za razlikovanje med različnimi oblikami endotoksina. Preverili smo tudi ali mutacije vplivajo na stabilnost proteina v mediju, kar bi lahko imelo vpliv tudi na interpretacijo ostalih rezultatov celične aktivacije.

Rezultate smo primerjali s predhodno dobljenimi rezultati vezave endotoksina na mutante, pridobljenimi z metodo FPLC (sl. 22) (J. Vašl<sup>1</sup>). To nam je pomagalo pri interpretaciji rezultatov naših poskusov. Pri metodi FPLC so merili prehod radioaktivno označenega endotoksina ( $[^3\text{H}]$ LOS) (LOS, lipooligosaharid) iz kompleksa  $[^3\text{H}]$ LOS:CD14 na kompleks  $[^3\text{H}]$ LOS:MD-2. Celice HEK293T so transficirali s plazmidom z zapisom za MD-2 (divji tip oz. mutanto); po transfekciji so medij zamenjali s svežim medijem, ki je vseboval radioaktivno označen kompleks  $[^3\text{H}]$ LOS:CD14. Po inkubaciji so vzorce nanesli na kromatografsko kolono FPLC (70 mL kolona, Sephadex S200), ki omogoča ločevanje molekul glede na njihovo velikost. V zbranih frakcijah so nato s scintilacijskim števcem določili radioaktivni endotoksin.

---

<sup>1</sup> Poskuse vezave endotoksina na MD-2 z metodo FPLC je izvedla Jožica Vašl (Kemijski inštitut Ljubljana) v okviru svojega doktorskega dela.



Slika 22: Preverjanje vezave endotoksina na MD-2 z metodo FPLC (J. Vašl). Celice HEK293T, transficirane s plazmidom z zapisom za MD-2, so inkubirali z endotoksinom v kompleksu s CD14. Divji tip MD-2 oz. mutante, ki vežejo endotoksin, le-tega prevzamejo iz kompleksa [<sup>3</sup>H]LOS:CD14, ob čemer nastane kompleks [<sup>3</sup>H]LOS:MD-2. Slednji se iz kromatografske kolone izpere v poznejši frakciji.

### 5.1.1 Zunajcelično izločanje mutant MD-2 je primerljivo

Ker lahko razlike v nivoju izražanja in zunajceličnega izločanja mutant vplivajo na interpretacijo rezultatov, smo preverili zunajcelično kopiranje posameznih mutant. Ker so bile mutacije aminokislin 82, 85 in 87 točkovne (ena oz. največ dve mesti hkrati) in v predelu proteina, kateremu se ne pripisuje vloge pri ustreznem zvitju oz. strukturi, smo predpostavili, da mutacije ne bodo bistveno vplivale na topnost MD-2 oz. njegovo izločanje iz celic.

Vzorce supernatantov celic, transficiranih z divjim tipom oz. mutantom MD-2, smo nanesli na akrilamidni gel, jih prenesli na nitrocelulozno membrano in MD-2 detektirali z anti-His protitelesi. Ugotovili smo, da je količina vseh mutant v mediju primerljiva. Edina mutanta, ki se je od divjega tipa MD-2 močneje razlikovala, je M85K, katere je bilo v mediju glede na divji tip več. To je lahko posledica mutacije, saj je bil namesto metionina uveden močno polaren lizin. Lizin je aminokislina, ki lahko bistveno poveča topnost proteina, kar lahko

olajša tudi njegovo izločanje iz celice. Kljub večji količini MD-2 v supernatantu pa mutanta M85K zaradi povečane polarnosti v predelu alifatske zanke ni bila biološko aktivna. Razlike v celični aktivaciji mutant s povečano hidrofobnostjo in mutant s povečano polarnostjo glede na divji tip MD-2 torej ne izhajajo iz razlik v izločanju mutant iz celic, temveč so posledica sprememb interakcij mutant z LPS in TLR4.

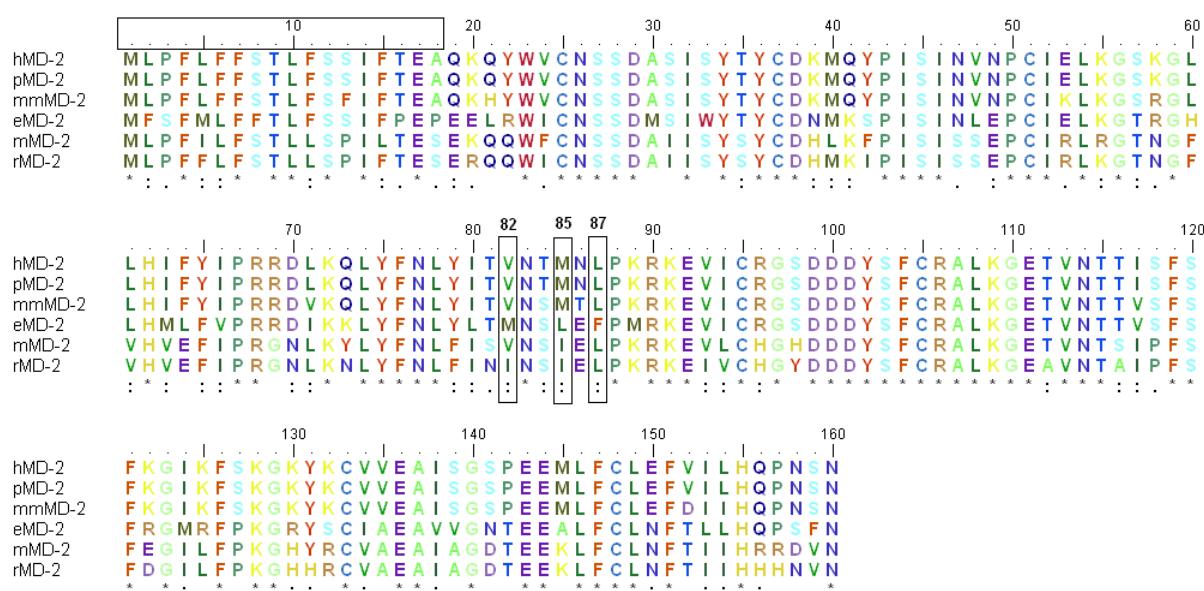
Mutanta V82N je vedno potovala počasneje od ostalih mutant. Ugotovili smo, da lahko mutacija V82N predstavlja dodatno glikozilacijsko mesto. Konsenzno zaporedje za glikozilacijo je NX(S/T), torej zaporedje treh zaporednih aminokislin, kjer je prva asparagin (N), na drugem mestu je katera koli aminokislina (X), na tretjem pa sta bodisi serin bodisi treonin (S/T). Ob uvedbi mutacije na mestu 82 smo zaporedje aminokislin V82 N83 T84 spremenili v N82 N83 T84, ki bi se lahko glikoziliralo. Pri elektroforezi SDS/PAGE v reducirajočih razmerah bi tako dobili še eno dodatno (večjo) liso. Takšen vzorec glikozilacije je razviden tudi iz slike (sl. 12). Ker z metodo FPLC ni bilo mogoče ugotoviti ali mutanta V82N veže endotoksin, ne moremo trditi, da morebitna dodatna glikozilacija ne prispeva še dodatno k zmanjšani aktivnosti mutante, saj je to glikozilacijsko mesto na mestu, za katerega smo dokazali, da je pomembno za vezavo endotoksina.

### **5.1.2 Aminokisline na mestih 82, 85 in 87 proteina MD-2 so pomembne za njegovo biološko aktivnost oz. sposobnost vezave LPS**

Vsebnost hidrofobnih aminokislin proteina MD-2 je visoka, vendar teh aminokislin ne najdemo znotraj strukture proteina, saj MD-2 ni tipičen globularen protein. Hidrofobne aminokisline skorajda v celoti tvorijo površino globokega hidrofobnega žepa, ki ga oblikujeta dve beta ploskvi (sl. 10). Veliko hidrofobnih aminokislin najdemo tudi na površju MD-2, kar daje proteinu izrazito hidrofobne lastnosti. Večina nabitih aminokislin, ki so na površju, pa obdaja vhod v hidrofobni žep in sodeluje pri tvorbi ionskih vezi s fosfatnimi skupinami lipida A, kar pripomore k njegovi vezavi (sl. 9).

Na vhodu v hidrofobni žep je tudi manjši predel hidrofobnih aminokislin, ki se nahajajo na t.i. alifatski zanki; aminokisline valin 82, metionin 85 in levcin 87 so obrnjene proti površju in obdajajo nekakšen kanal, preko katerega bi lahko potekala acilna veriga lipida A, ki bi zaradi pomanjkanja prostora ostala zunaj hidrofobnega žepa.

Aminokislinska mesta 82, 85 in 87 so med različnimi organizmi tudi precej ohranjena, kar kaže na njihov pomen za celično aktivacijo (sl. 23).

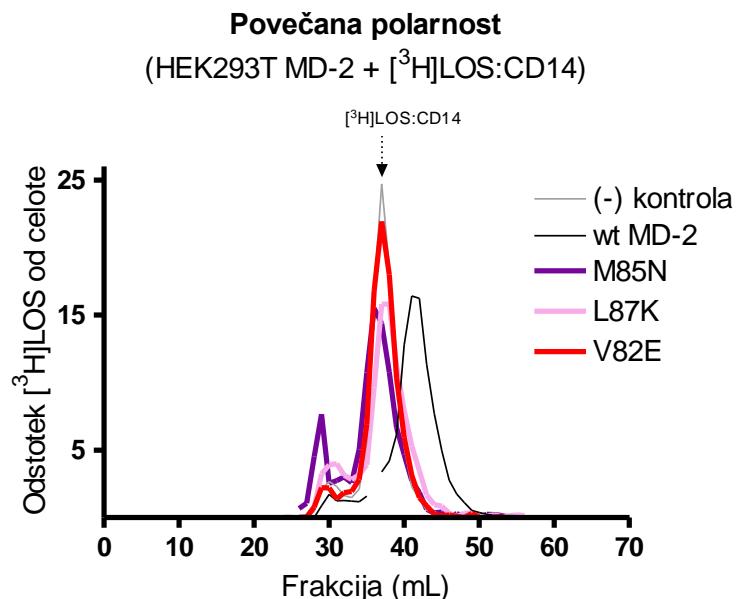


Slika 23: Poravnavo aminokislinskega zaporedja proteina MD-2 različnih organizmov. Prvih osemnajst aminokislin predstavlja signalno zaporedje. 50 odstotkov aminokislin je identičnih pri vseh šestih organizmih, človek in miš pa imata identičnih 64 odstotkov aminokislin. hMD-2, človek (*Homo sapiens*); pMD-2, šimpanz (*Pan troglodytes*); mmMD-2, opica maki (*Macaca mulatta*); eMD-2, konj (*Equus caballus*); mMD-2, miš (*Mus musculus*); rMD-2, podgana (*Rattus norvegicus*).

Predpostavili smo torej, da so aminokisline na mestih 82, 85 in 87 proteina MD-2 pomembne za sposobnost vezave LPS. Predpostavili smo, da bo sprememba polarnosti teh aminokislin vplivala na sposobnost MD-2 za vezavo LPS in s tem na sposobnost aktivacije celičnega imunskega odziva. Predpostavili smo, da bo vpliv večji pri mutantah, kjer bo sprememba polarnosti bolj izrazita (npr. pri nabitih aminokislinah) ter pri mutantah, ki se bodo od aminokislin divjega tipa razlikovale tudi glede velikosti; večje aminokisline bi namreč lahko predstavljalje tudi sterično prepreko, ki bi ovirala vezavo acilne verige lipida A.

### 5.1.2.1 Povečanje polarnosti aminokislin 82, 85 in 87 proteina MD-2 zniža njegovo biološko aktivnost

Predpostavili smo, da bo povečanje polarnosti aminokislin (glede na divji tip proteina) imelo negativen učinek na biološko aktivnost MD-2. Polarne aminokisline v tem predelu ne bi omogočile hidrofobnih interakcij z acilno verigo heksaaciliranega agonista. Afiniteta vezave lipida A bi se zato zmanjšala. Iz slike 13A je razvidno, da mutante s polarnimi aminokislinami (V82N, M85K, M85D, M85N, L87K, V82E) niso sposobne sprožiti celičnega odziva, kar je v skladu z našo hipotezo. Rezultati se ujemajo tudi z rezultati vezave endotoksina na mutante, dobljenimi s pomočjo metode FPLC (sl. 24) (J. Vašl). Pri tej metodi so merili prehod radioaktivno označenega endotoksina iz kompleksa [ $^3\text{H}$ ]LOS:CD14 na kompleks [ $^3\text{H}$ ]LOS:MD-2.



Slika 24: Vezava endotoksina na mutante MD-2 s povečano polarnostjo (metoda FPLC) (J. Vašl). Celice so prehodno transficirali s plazmidom z zapisom za divji tip MD-2 oz. mutanto MD-2, nato pa inkubirali s kompleksom [ $^3\text{H}$ ]LOS:CD14. Prisotnost radioaktivno označenega endotoksina so spremljali v frakcijah po FPLC. Rezultati kažejo, da nobena od mutant M85N, L87K oz. V82E ni sposobna prevzeti endotoksina iz kompleksa s CD14. Ostale mutante s povečano polarnostjo so tvorile agregate visoke molekulske mase, ki so se izločili v prostem volumnu, zato se jim s to metodo sposobnost vezave endotoksina ni dala določiti.

Glede na model človeškega MD-2 z vezanim heksaaciliranim lipidom A (dr. Jerala<sup>1</sup>) je valin na mestu 82 aminokislina, ki bi najlažje oz. najbolj prišla v stik z acilno verigo. Zato predvidevamo, da bodo spremembe na tem mestu bolj vplivale na sposobnost mutante za celično aktivacijo kakor pa spremembe na mestu metionina 85, ki je najbolj izpostavljen topilu in je od acilne verige bolj oddaljen.

Rezultati kažejo, da med posameznimi mutantami s povečano polarnostjo ni razlik, saj nobena ne aktivira celic (sl. 13B). Manjšo aktivacijo kaže le mutanta M85N; čeprav mutanta M85N (tako kot tudi ostale mutante s povečano polarnostjo) ni sposobna prevzeti endotoksina iz kompleksa s CD14, pa je (z razliko od ostalih mutant s povečano polarnostjo) to sposobnost pridobila, če so jo kotransfircirali skupaj z zunajcelično domeno TLR4 (J. Vašl). Kljub stimulaciji z močno povečanimi koncentracijami LPS pa ni nikoli dosegla nivoja aktivacije divjega tipa MD-2, saj je sprememba polarnosti najbrž prevelika in vpliva na učinkovitost vezave endotoksina. Ker pa je asparagin po velikosti primerljiv metioninu in ker je mesto 85 najbolj izpostavljen topilu, lahko mutanta M85N zadrži del sposobnosti vezave endotoksina. Rezultati so pokazali, da je za to potreben TLR4, ki verjetno že na poti od endoplazemskega retikuluma do celične površine sodeluje pri stabilizaciji MD-2. Mutanti M85D in M85K, pri katerih je metionin zamenjan z nabito aminokislino, nista aktivirali celičnega imunskega odziva in kljub kotransfekciji z zunajcelično domeno TLR4 nista vezali endotoksina, saj je sprememba iz metionina, ki je nepolaren in nevtralen, v nabito aminokislino prevelika, da bi to dopuščala.

Mutanti s povečano polarnostjo na mestu 82 (V82E in V82N) nista aktivirali celic. To potrjuje našo hipotezo, da je mesto 82 pomembno za aktivnost proteina MD-2, saj je glede na model bližje acilni verigi. Blizu je tudi mesto 87; tudi mutanta L87K, kjer je bil levcin zamenjan z večjim bazičnim lizinom, ni sprožila celične aktivacije, kar je v skladu z našimi predpostavkami.

---

1

Model je pripravil prof. dr. Roman Jerala (Kemijski inštitut Ljubljana).

### 5.1.2.2 Povečanje hidrofobnosti na mestih 82, 85 in 87 proteina MD-2 ne oslabi njegove biološke aktivnosti

Z razliko od mutant s povečano polarnostjo pa mutante s povečano hidrofobnostjo (V82I, V82F, M85F, L87F, M85W in V82IM85I) niso imele tako izrazitega vpliva na biološko aktivnost proteina MD-2 (sl. 13B, sl. 14). Ti rezultati govorijo v prid hipotezi, da na mestu alifatske zanke pride do hidrofobnih interakcij z acilno verigo endotoksina.

Vse mutante s povečano hidrofobnostjo so obdržale sposobnost aktivacije celičnega imunskega odziva. Nivo aktivacije je bil primerljiv divjemu tipu oz. se je rahlo razlikoval. Celična aktivacija z mutantami V82F, M85F in M85W je bila glede na divji tip MD-2 rahlo znižana, česar pa ne pripisujemo sprememb polarnosti, temveč uvedbi aminokislinske z večjo stransko skupino. Obe aromatski aminokislini (fenilalanin in triptofan) sta od izvornih aminokislin precej večji in lahko predstavljata sterično prepreko, ki bi lahko ovirala vezavo acilne verige heksaaciliranega agonista na ta predel proteina MD-2. Ta vpliv pa ni opazen pri mutanti L87F; mesto 87 je pomaknjeno rahlo bolj v notranjost strukture, zaradi česar večja stranska skupina ne bi predstavljala tako velike ovire. Prav tako celična aktivacija ni spremenjena v primeru mutante V82I, kjer je valin zamenjan z velikostno primerljivim izolevcinom; izolevcin ima glede na valin le rahlo večjo hidrofobnost (razlika v indeksu hidrofobnosti je le 0,3), zato je tudi celična aktivacija primerljiva divjemu tipu. Edina mutanta, ki je celični imunski odziv aktivirala bolj kot divji tip MD-2, je bila dvojna mutanta V82IM85I. Izolevcin je po velikosti primerljiv tako valinu kot metioninu; povečana aktivnost mutante tako izhaja iz povečane hidrofobnosti, ki olajša vezavo acilne verige v predelu alifatske zanke MD-2.

Pomen posameznih aminokislinskih ostankov MD-2 za celično aktivacijo so proučevali tudi pri mišjem MD-2 (Kawasaki in sod., 2003). Zamenjava aminokislinskih ostankov na mestih 82, 85 in 87 z alaninom (V82A, I85A, L87A) je vsem mutantam bistveno znižala sposobnost celične aktivacije. Ohranjenost primarne strukture (sl. 23) in zelo podobna terciarna struktura mišjega in človeškega MD-2 (Ohto in sod., 2007; Kim in sod., 2007) nakazuje na podoben mehanizem aktivacije s heksaaciliranim lipidom A. Kljub uvedbi

hidrofobne aminokisline je bila stranska skupina le-te verjetno premajhna, da bi zadoščala za učinkovito hidrofobno interakcijo z acilno verigo endotoksina. Tudi mutanta človeškega MD-2, katere predel aminokislinskih ostankov 79-83 so v celoti zamenjali z alanini, je onemogočila učinkovito aktivacijo z LPS (Viriyakosol in sod., 2006). Ker pa so v primeru človeškega MD-2 zamenjali celoten predel petih aminokislinskih ostankov, ne moremo sklepati o vlogi posameznega ostanka za biološko aktivnost MD-2. Zmanjšana aktivnost mišjih mutant pa skupaj z našimi rezultati potrjuje pomen aminokislin na mestih 82, 85 in 87 za celično aktivacijo.

Pokazali smo, da je tako pri divjem tipu MD-2 kot tudi pri mutantah celična aktivacija z lipidom A (spojino 506) (sl. 16) in z Ra-LPS (sl. 17) primerljiva aktivaciji s celotnim S-LPS. Endotoksina 406 (sl. 18) in msbB (sl. 19) pa nista sprožila celične aktivacije. Ti rezultati potrjujejo ugotovitve Kotani in sod. (1985), da je lipid A del lipopolisaharida, ki je odgovoren za njegove endotoksične lastnosti. Rezultati tudi kažejo, da verjetno nobena od proučevanih aminokislin (V82, M85, L87) ne pride v stik s slatkornimi ostanki sredice ali antiga O, saj spremembe v slatkornem delu lipopolisaharida niso vplivale na biološko aktivnost mutant. Naši rezultati (sl. 16 in 17) pa niso v skladu ugotovitvami Zughaijer in sod. (2004), ki so opazili povezavo med skupino KDO oligosaharidne sredice in povišanim odzivom na meningokokni endotoksin glede na meningokokni endotoksin brez slatkornih ostankov. Vzrok povišane aktivacije pri stimulaciji z endotoksinom s skupino KDO še ni pojasnjen. Čeprav je endotoksin bakterije *Neisseria meningitidis* heksaaciliran, pa se od endotoksina enteričnih bakterij razlikuje glede na simetrijo acilnih verig, saj je meningokokni endotoksin simetrično aciliran (tri acilne verige na vsaki glukozaminski skupini) (Zhang in sod., 2007). Direktna primerjava aktivacije z meningokoknim endotoksinom in endotoksinom *E. coli*, uporabljenem pri naših poskusih, torej ni mogoča. Vpliva skupine KDO oligosaharidne sredice vseeno ne moremo povsem zavrniti, saj smo pri našem delu zaradi težav pri določanju molske mase LPS (močno variabilni slatkorni ostanki) vedno uporabljali masne koncentracije (ng/ml) namesto molarnih (mol/l), ki bi bile za primerjavo različnih endotoksinov ustreznnejše.

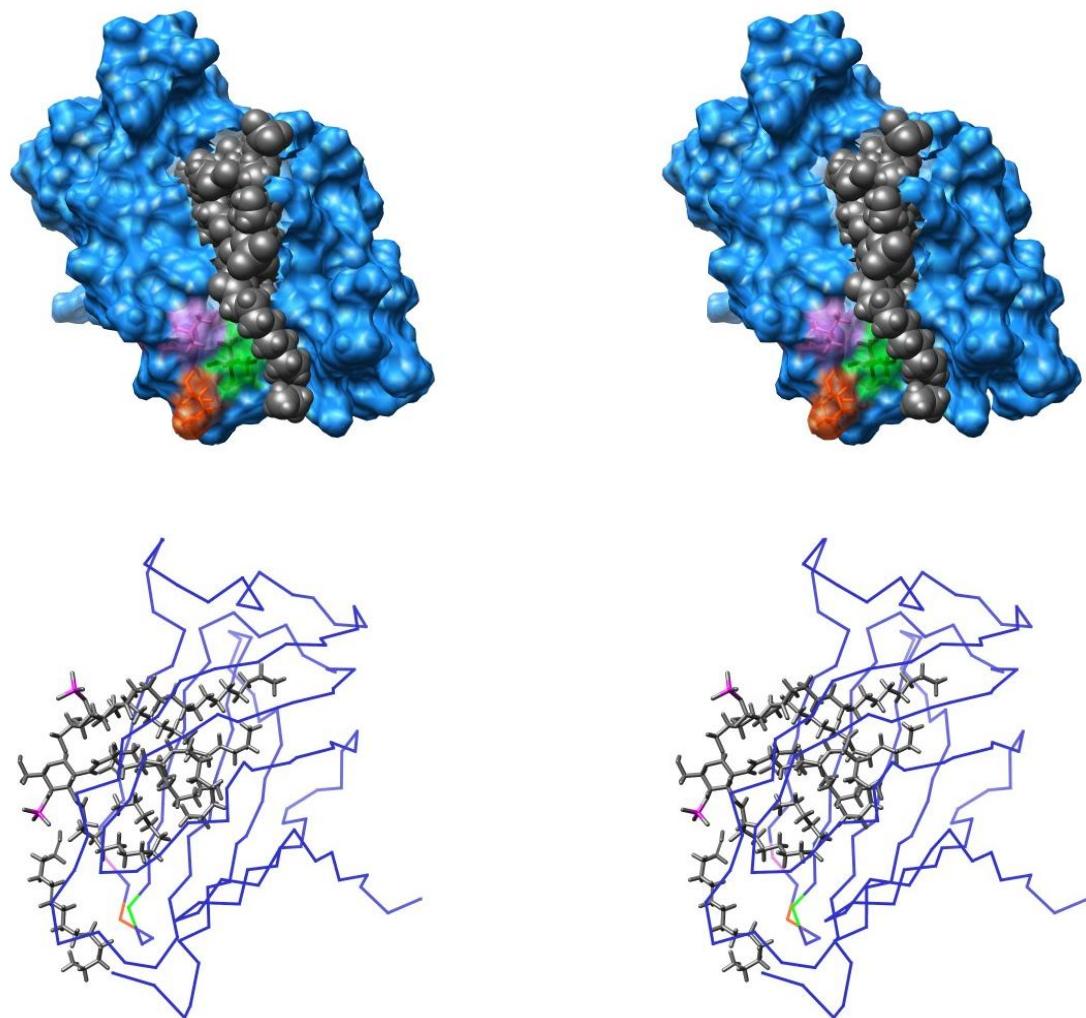
Izrazit vpliv na biološko aktivnost pa je imela sprememba števila acilnih verig, kar je v skladu z rezultati raziskav Ulmer in sod. (1992) in Somerville in sod. (1996). Število acilnih verig lipida A je namreč ključno za endotoksične lastnosti lipopolisaharida. Različni organizmi se različno odzivajo na lipopolisaharide glede na število acilnih verig. Za vrstno specifično prepoznavo in odziv na endotoksin je odgovoren MD-2. Heksaaciliran lipid A tako aktivira človeški in mišji MD-2, medtem ko tetraaciliran lipid IVa deluje agonistično le na mišji MD-2 in celo antagonistično na človeškega. (Akashi in sod., 2001). Tako tetraaciliran kot pentaaciliran lipid A se lahko vežeta na LBP, CD14 in MD-2 enako učinkovito kot heksaaciliran lipid A, vendar v primerjavi s slednjim več kot desetkrat slabše aktivirata celični imunski odziv. Mogoče je, da je za aktivacijo receptorja TLR4 potrebna konformacijska sprememba MD-2, ki pa je hipoacilirani endotoksini niso sposobni izzvati. Slabša aktivacija bi lahko bila tudi posledica slabše stabilnosti kompleksov tetra- oz. pentaaciliranega lipida A z MD-2 v primerjavi s kompleksom heksaaciliranega lipida A z MD-2 (Teghanemt in sod., 2005). Visoke koncentracije pentaaciliranega endotoksina msbB so tudi pri mutantah MD-2 izzvale šibko celično aktivacijo, kar je v skladu z zgornjimi rezultati. Mutanta V82F, katere aktivnost ob stimulaciji z LPS je bila glede na divji tip MD-2 rahlo zmanjšana, pa je ob stimulaciji z endotoksinom msbB kazala večjo aktivnost kot divji tip MD-2. Rahlo znižano aktivnost mutante V82F pri stimulaciji s heksaaciliranim LPS glede na divji tip MD-2 pripisujemo uvedbi aminokisline z večjo stransko skupino, ki lahko predstavlja sterično oviro. Acilne verige, katere vezavo večja stranska skupina ovira, pri pentaaciliranem endotoksinu ni. Fenilna skupina bi lahko prišla v stik s primarno miristoilno maščobno kislino na mestu 3' in jo pri manjšem deležu kompleksov celo izrinila iz hidrofobnega žepa, kar bi lahko privedlo do aktivacije. Tridimenzionalni strukturi MD-2 v kompleksu s pentaaciliranim oz. heksaaciliranim lipidom A še nista določeni. Naši rezultati govorijo v prid predpostavki, da aminokislinski ostanek V82 neposredno sodeluje pri vezavi agonista in je tako ključen za učinkovito aktivacijo proteina MD-2, potrdila pa jo bo šele določena tridimenzionalna struktura.

### 5.1.3 Stabilnost mutant MD-2 v mediju

Pokazali smo, da se hidrofobne mutante primerljivo izražajo v medij, v katerem smo celice gojili. MD-2 v mediju pri fiziološki temperaturi hitro izgublja aktivnost (Kennedy in sod., 2004). Mutacije, ki lahko vplivajo na topnost, bi lahko vplivale tudi na stabilnost mutant in s tem na sposobnost celične aktivacije. Da bi preverili stabilnost mutant MD-2 v mediju, smo celice HEK293 transficirali s plazmidom z zapisom za MD-2, nato pa s supernatantom, ki je vseboval topen MD-2, aktivirali celice HEK293BF1/TLR4.

Aktivacija z mutantama V82F oz. M85F v supernatantu se je najbolj bistveno razlikovala od divjega tipa v primerjavi z rezultati poskusov celičnih aktivacij, kjer sta bila MD-2 in TLR4 kotransficirana. Za mutanti V82F in M85F z metodo FPLC ni bilo mogoče določiti sposobnosti vezave endotoksina, saj je prišlo do nastanka visokomolekularnih agregatov, ki so se izločili v prostem volumnu. Iz rezultatov vezave endotoksina ter rezultatov celične aktivacije lahko sklepamo, da sta mutanti L82F in M85F zaradi uvedbe fenilne skupine nagnjeni k tvorbi agregatov. Pri poskusih celične aktivacije s kotransfekcijo MD-2 in TLR4 pa je bila aktivacija primerljiva aktivaciji divjega tipa; to lahko pojasnimo s stabilizacijo, ki jo nudi TLR4 svojemu koreceptorju MD-2.

Dokazali smo, da so aminokisline 82, 85 in 87 pomembne za vezavo endotoksina. Ta vloga verjetno izhaja iz stika teh aminokislin z acilno verigo endotoksina, tako kot smo predpostavli glede na model MD-2 z vezanim heksaaciliranim lipidom A (dr. Jerala) (sl. 25).

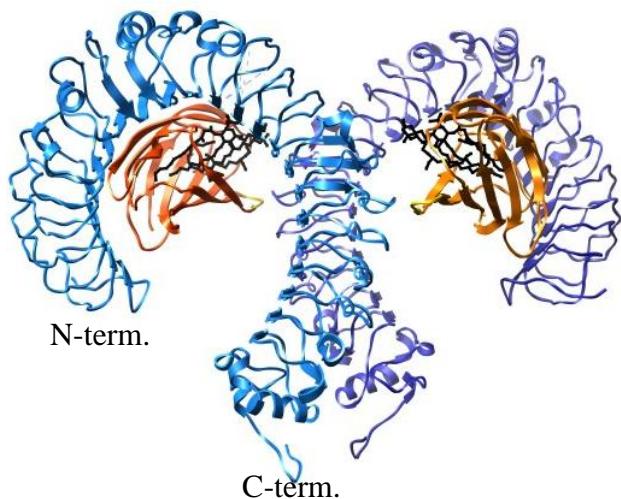
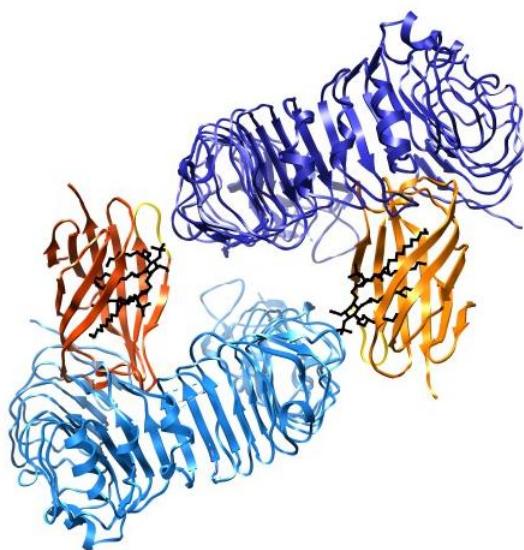


Slika 25: Model človeškega MD-2 z vezanim heksaaciliranim lipidom A (dr. Jerala) (stereo pogled). (A) Model hMD-2 z vezanim heksaaciliranim lipidom A, kjer ena acilna veriga ostane zunaj hidrofobnega žepa in poteka v bližini alifatske zanke. Površina hMD-2 je prikazana v modri barvi. V82, zeleno; M85, oranžno; L87, vijolično. Heksaciliran lipid A je prikazan kot kroglični model v sivi barvi. (B) Prikaz skeleta hMD-2 (modro, z označenimi aminokislinami V82, M85 in L87) z vezanim heksaaciliranim lipidom A (siva; fosfata sta označena rožnato). Slika (B) je zasukana za približno 60 stopinj glede na (A).

Tridimenzionalni strukturi MD-2 (Ohto in sod., 2007; Kim in sod., 2007) sta pokazali, da že štiri verige antagonista lipida IVa oz. eritorana skorajda povsem zapolnijo volumen hidrofobnega žepa, kristalna struktura MD-2 z vezanim antagonistom lipidom IVa pa se le malo razlikuje od nativne strukture brez vezanega liganda. Naši rezultati podpirajo hipotezo, da naj bi ena oz. dve verigi heksaaciliranega lipida A ostala/i zunaj hidrofobnega žepa in bi prišla/i v stik z aminokislinsimi alifatskimi zanke, hidrofobni žep pa se ob tem ne bi razširil.

Kim in sod. (2007) so potrdili vlogo LPS pri dimerizaciji kompleksa TLR4/MD-2; le-ta je dimeriziral le ob prisotnosti agonista heksaaciliranega LPS, ne pa ob prisotnosti antagonista eritorana. Predvideli so tri možne modele za dimerizacijo dveh kompleksov TLR4/MD-2 z vezanim LPS; najverjetnejši predpostavlja strukturno spremembo MD-2 na predelu aminokisline Phe126 po vezavi LPS, kar izzove oz. omogoči dimerizacijo (sl. 11B).

Analiza strukture človeškega TLR4 v kompleksu z MD-2 nam je pokazala, da je možna interakcija med MD-2 enega kompleksa TLR4/MD-2 s TLR4 drugega kompleksa TLR4/MD-2. Ker so naši rezultati potrdili pomen aminokislinskih alifatskih zanke, predpostavljamo, da hidrofoben žleb, ki ga oblikujejo aminokisline V82, M85 in L87, interagira z delom acilne verige. Analiza pa je pokazala, da je celotna acilna veriga lipida A za interakcijo s hidrofobnim žlebom preko celotne dolžine predolga; preostanek bi se lahko vezal na hidrofoben predel TLR4, kar bi omogočilo dimerizacijo kompleksa TLR4/MD-2, to pa je pogoj za celično aktivacijo.

**A****B**

Slika 26: Teoretični model dimera hTLR4/hMD-2 z vezanim eritoranom (dr. Jerala<sup>1</sup>) – prikaz trakov beta. hTLR4 je prikazan v modri, hMD-2 pa v oranžni barvi. Eritoran, vezan v hidrofobni žep MD-2 je prikazan s črno barvo.

<sup>1</sup>

Model je pripravil prof. dr. Roman Jerala (Kemijski inštitut Ljubljana).

Model MD-2 z vezanim heksaaciliranim lipidom A (sl. 25) so naredili ob predpostavki, da ob vezavi liganda ne pride do večjih konformacijskih sprememb MD-2, kar potrjujejo tudi rezultati nalaganja tridimenzionalnih struktur nativnega MD-2 in MD-2 z vezanim lipidom IVa (Ohto in sod., 2007). Raztezanja hidrofobnega žepa ob vezavi agonista pa ne moremo izključiti. Protein GM2-AP je eden izmed proteinov, ki so služili kot osnova za model strukture MD-2 (Gruber in sod., 2004). GM2-AP ima določene strukturne in funkcijeske podobnosti z MD-2, kot so hidrofoben žep, sestavljen iz strukture beta, kamor se lahko vežejo acilne verige liganda (gangliozida) (Wright in sod., 2000). Po vezavi liganda pa pride do večje konformacijske spremembe proteina (Wright in sod., 2003). Nedvoumen odgovor na ta vprašanja bo znan šele, ko bo določena kristalna struktura MD-2 z vezanim heksaaciliranim agonistom.

## 5.2 SKLEPI

Aminokisline na mestih 82, 85 in 87 proteina MD-2 (predel alifatske zanke) so pomembne za njegovo biološko aktivnost oz. sposobnost vezave lipida A.

Na predelu alifatske zanke pride do hidrofobnih interakcij med aminokislinami V82, M85 in L87 ter acilno verigo heksaaciliranega lipida A. Ta interakcija je pomembna za biološko aktivnost MD-2. Uvedba bolj polarnih aminokislin v ta predel prepreči to interakcijo in s tem negativno vpliva na vezavo lipida A.

Povečanje hidrofobnosti na mestih 82, 85 in 87 proteina MD-2 ne oslabi njegove biološke aktivnosti, saj se hidrofobne interakcije med acilno verigo lipida A in MD-2 ohranijo.

Uvedba aminokislin z večjimi stranskimi verigami lahko predstavlja sterično oviro za vezavo acilne verige.

Aktivnost mutante V82IM85I, ki je imela povečano hidrofobnost, velikost stranskih skupin aminokislinskih ostankov pa se ni spremenila, se je povečala.

## 6      POVZETEK

Imunski odziv na bakterijsko okužbo se lahko včasih pretirano okrepi in vodi do bolezenskega stanja, imenovanega sepsa. Preko 60 odstotkov vseh primerov sepse je posledica imunskega odziva, ki ga sprožijo po Gramu negativne bakterije, ki v krvni obtok sproščajo LPS. Lipid A je glavni agonist receptorja TLR4. Za njegovo prepoznavo oz. direktno vezavo pa je odgovoren koreceptor MD-2. MD-2 ima globok hidrofobni žep, kamor se vežejo acilne verige lipida A. Na robu hidrofobnega žepa je predel t.i. alifatske zanke, ki vsebuje veliko hidrofobnih aminokislin (V82, M85, L87), ki so izpostavljene topilu. Ker za vseh šest verig agonista v hidrofobnem žepu ni prostora, predpostavljamo da ena (ali največ dve) verjetno ostane zunaj žepa in tvori hidrofobne interakcije z aminokislinami alifatske zanke. Te interakcije so pomembne za biološko aktivnost MD-2. V diplomskem delu smo raziskali pomen aminokislin alifatske zanke, tako da smo preverili vpliv zamenjave teh aminokislin na aktivnost proteina MD-2. S pomočjo poliakrilamidne elektroforeze in imunodetekcije proteinov smo preverili nivo zunajceličnega izločanja mutant. Vse mutante so se izločale v zunajcelični medij v primerljivih količinah. Z uporabo dvojnega luciferaznega testa smo spremljali celično aktivacijo z mutantami MD-2. Mutante s povečano polarnostjo na predelu alifatske zanke so bile biološko neaktivne, kar se sklada s predhodno poznanimi rezultati vezave lipida A, saj te mutante niso bile sposobne prevzeti lipida A iz kompleksa s CD14. Povečanje hidrofobnosti pa na aktivnost MD-2 ni imelo negativnega vpliva, saj so se hidrofobne interakcije med aminokislinami alifatske zanke in acilno verigo lipida A lahko ohranile. Celice smo stimulirali z različnimi tipi endotoksina. Lipid IVa in endotoksin msbB sta tudi pri mutantah ohranila antagonistični značaj, prav tako nismo opazili sprememb pri stimulaciji z endotoksinom s krajšim polisaharidnim delom. Topen MD-2 v mediju hitro izgublja aktivnost. Ugotovili smo, da so bile vse hidrofobne mutante (z izjemo mutante V82F) stabilne in so obdržale aktivnost tudi v topni obliki v supernatantu. Naši rezultati podpirajo model MD-2 z vezanim heksaaciliranim lipidom A in prispevajo k boljšemu poznavanju mehanizma vezave lipida A na MD-2, kar lahko pripomore pri razvoju antagonistov MD-2, uporabnih v kliničnem zdravljenju sepse.

**VIRI**

Akashi S., Nagai Y., Ogata H., Oikawa M., Fukase K., Kusumoto S., Kawasaki K., Nishijima M., Hayashi S., Kimoto M., Miyake K. 2001. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. International Immunology, 13, 12: 1595-1599.

Akashi S., Saitoh S., Wakabayashi Y., Kikuchi T., Takamura N., Nagai Y., Kusumoto Y., Fukase K., Kusumoto S., Adachi Y., Kosugi A., Miyake K. 2003. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. Journal of Experimental Medicine, 198, 7: 1035-1042.

Akira S., Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. Nature Reviews (Immunology), 4: 499-511.

Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 124, 4: 783-801.

Anderson K.V., Jürgens G., Nüsslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. Cell, 42, 3: 779-789.

Chaplin D. 2006. Overview of the human immune response. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 117, 2: S430-S435.

Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. Nature, 420: 885-891.

Correia J., Ulevitch R.J. 2002. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. Journal of Biological Chemistry, 277, 3: 1845-1854.

Creagh E.M., O'Neill L.A.J. 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in Immunology*, 27, 8: 352-357.

Franchi L., McDonald C., Kanneganti T.D., Amer A., Nunez G. 2006. Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense. *Journal of Immunology*, 177: 3507-3513.

Gay N.J., Gangloff M., Weber A.N.R. Toll-like receptors as molecular switches. 2006. *Nature Reviews (Immunology)*, 6: 693–698.

Gay N.J., Gangloff M. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annual Review of Biochemistry*, 76: 23.1-23.25.

Gioannini T.L., Teghanemt A., Zhang D., Coussens N.P., Dockstader W., Ramaswamy S., Weiss J.P. 2004. Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 12: 4186-4191.

Gorbet M.B., Sefton M.V. 2005. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials*, 26: 6811-6817.

Gruber A., Manček M., Wagner H., Kirschning C.J., Jerala R. 2004. Structural model of MD-2 and functional role of its basic amino acid clusters involved in cellular lipopolysaccharide recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 27: 28475-28482.

Hashimoto C., Hudson K.L., Anderson K.V. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52, 2: 269-279.

Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S. 1999. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* Gene Product. *Journal of Immunology*, 162: 3749-3752.

Iwasaki A., Medzhitov R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5: 987-995.

Kang D., Gopalkrishnan R.V., Wu Q., Jankowsky E., Pyle A.M., Fisher P.B. 2002. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 2: 637-642.

Kawai T., Akira S. 2006. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13: 816–825.

Kennedy M.N., Mullen G.E.D., Leifer C.A., Lee C.W., Mazzoni A., Dileepan K.K., Segal D.M. 2004. A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 33: 34698-34704.

Kim H.M., Park B.S., Kim J.I., Kim S.E., Lee J., Oh S.C., Enkhbayar P., Matsushima N., Lee H., Yoo O.J., Lee J.O. 2007. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist eritoran. *Cell*, 130: 906-917.

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.

Kotani S., Takada H., Tsujimoto M., Ogawa T., Takahashi I., Ikeda T., Otsuka K., Shimauchi H., Kasai N., Mashimo J., Nagao S., Tanaka A., Tanaka S., Harada K., Nagaki K., Kitamura H., Shiba T., Kusumoto S., Imoto M., Yoshimura H. 1985. Synthetic lipid A with endotoxic and related biological activities comparable to those of a natural lipid A from an *Escherichia coli* Re-mutant. *Infection and Immunity*, 49, 1: 225-237.

Lee M.S., Kim Y.J. 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annual Review of Biochemistry*, 76: 13.1-13.34.

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86: 973-983.

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388 6640: 394-397.

Miyake K. 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends in Microbiology*, 12, 4: 186-192.

Mullarkey M., Rose J.R., Bristol J., Kawata T., Kimura A., Kobayashi S., Przetak M., Chow J., Gusovsky F., Christ W.J., Rossignol D.P. 2003. Inhibition of endotoxin response by E5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304, 3: 1093-1102.

Mullen G.E.D., Kennedy M.N., Visintin A., Mazzoni A., Leifer C.A., Davies D.R., Segal D.M. 2003. The role of disulfide bonds in the assembly and function of MD-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7: 3919-3924.

Nagai Y., Akashi S., Nagafuku M., Ogata M., Iwakura Y., Akira S., Kitamura T., Kosugi A., Kimoto M., Miyake K. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature Immunology*, 3, 7: 667-72.

Ohto U., Fukase K., Miyake K., Satow Y. 2007. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science*, 316: 1632-1634.

Parkin J., Cohen B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet*, 357: 1777-1789.

Raetz C.R.H., Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. Annual Review of Biochemistry, 71: 635-700.

Re F., Strominger J.L. 2002. Monomeric recombinant MD-2 binds Toll-like receptor 4 tightly and confers lipopolysaccharide responsiveness. Journal of Biological Chemistry, 277, 26: 23427-23432.

Saitoh S., Akashi S., Yamada T., Tanimura N., Kobayashi M., Konno K., Matsumoto F., Fukase K., Kusumoto S., Nagai Y., Kusumoto Y., Kosugi A., Miyake K. 2004. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. International Immunology, 16, 7: 961-969.

Schumann R.R., Leong S.R., Flaggs G.W., Gray P.W., Wright S.D., Mathison J.C., Tobias P.S., Ulevitch R.J. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. Science, 249, 4975: 1429–1431.

Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. Journal of Experimental Medicine, 189, 11: 1777-1782.

Somerville Jr. J.E., Cassiano L., Bainbridge B., Cunningham M.D., Darveau R.P. 1996. A novel *Escherichia coli* lipid A mutant that produces an antiinflammatory lipopolysaccharide. Journal of Clinical Investigation, 97, 2: 359-365.

Teghanemt A., Zhang D., Levis E.N., Weiss J.P., Gioannini T.L. 2005. Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. Journal of Immunology, 175: 4669-4676.

Trent M.S., Stead C.M., Tran A.X., Hankins J.V. 2006. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. Journal of Endotoxin Research, 12, 4: 205-223.

Ulmer A.J., Deist W., Heine H., Kirikae T., Kirikae F., Kusumoto S., Kusama T., Brade H., Schade U., Eietschel E.T., Flad H.D. 1992. Modulation of endotoxin-induced monokine release in human monocytes by lipid A partial structures that inhibit binding of  $^{125}\text{I}$ -lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 60, 12: 5145-5152.

Van Amersfoort E.S., Van Berkel T.J.C., Kuiper J. 2003. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 3: 379-414.

Viriyakosol S., Tobias P.S., Kitchens R.L. 2001. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 4: 38044-38051.

Viriyakosol S., Tobias P.S., Kirkland T.N. 2006. Mutational analysis of membrane and soluble forms of human MD-2. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 17: 11955-11964.

Visintin A., Iliev D.B., Monks B.G., Halmen K.A., Golenbock D.T. 2006a. MD-2. *Immunobiology*, 211: 437-447.

Visintin A., Halmen K.A., Khan N., Monks B.G., Golenbock D.T., Lien E. 2006b. MD-2 expression is not required for cell surface targeting of Toll-like receptor 4 (TLR4). *Journal of Leukocyte Biology*, 80, 6: 1584-1592.

Wright C.S., Li S.C., Rastinejad F. 2000. Crystal structure of human GM2-activator protein with a novel  $\beta$ -cup topology. *Journal of Molecular Biology*, 304, 3: 411-422.

Wright C.S., Zhao Q., Rastinejad F. 2003. Structural analysis of lipid complexes of GM2-activator protein. *Journal of Molecular Biology*, 311, 4: 951-964.

Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 4975: 1431-1433.

Yoneyama M., Kikuchi M., Natsukawa T., Shinobu N., Imaizumi T., Miyagishi M., Taira K., Akira S., Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology*, 5, 7: 730-737.

Zhang Y., Gaekwad J., Wolfert M.A., Boons G.J. 2007. Innate immune responses of synthetic lipid A derivatives of *Neisseria meningitidis*. *Chemistry – a European Journal*, 14, 2: 558-569.

Zughaier S.M., Tzeng Y.L., Zimmer S.M., Datta A., Carlson R.W., Stephens D.S. 2004. *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide structure-dependent activation of the macrophage CD14/Toll-like receptor 4 pathway. *Infection and Immunity*, 72, 1: 371-380.

## ZAHVALA

Diplomsko delo sem opravila v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu, Ljubljana, v študijskem letu 2007/2008.

Zahvaljujem se somentorju prof. dr. Romanu Jerali za vodenje dela, nasvete in pregled diplomske naloge. Omogočil mi je delo na področju, ki me izredno zanima in bil neusahljiv vir novih idej ter rešitev.

Iskrena hvala dr. Jožici Vašl za pomoč pri eksperimentalnem delu ter pri izdelavi diplomske naloge. Hvala za vse nasvete, potrežljivost in spodbudo.

Mentorju prof. dr. Gregorju Anderluhu se zahvaljujem za temeljit pregled diplomske naloge.

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem prof. dr. Tomu Turku.

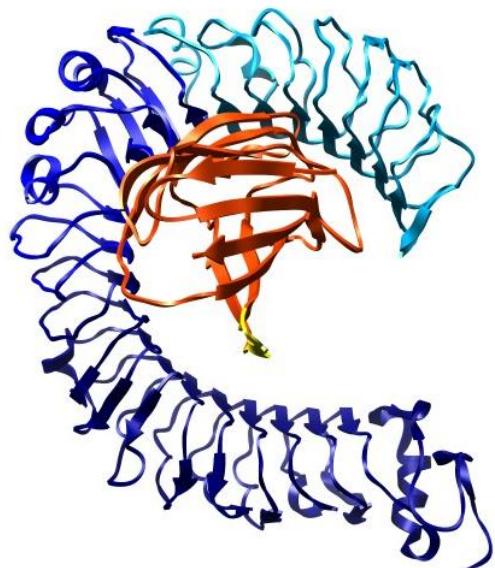
Hvala vsem sodelavcem iz Laboratorija za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu. Prijetno delovno okolje, ki ga ustvarjajo, pomaga premagati slabo voljo po spodletelih poskusih.

Zahvala gre tudi družini in prijateljem za vso podporo in spodbudo v času študija.

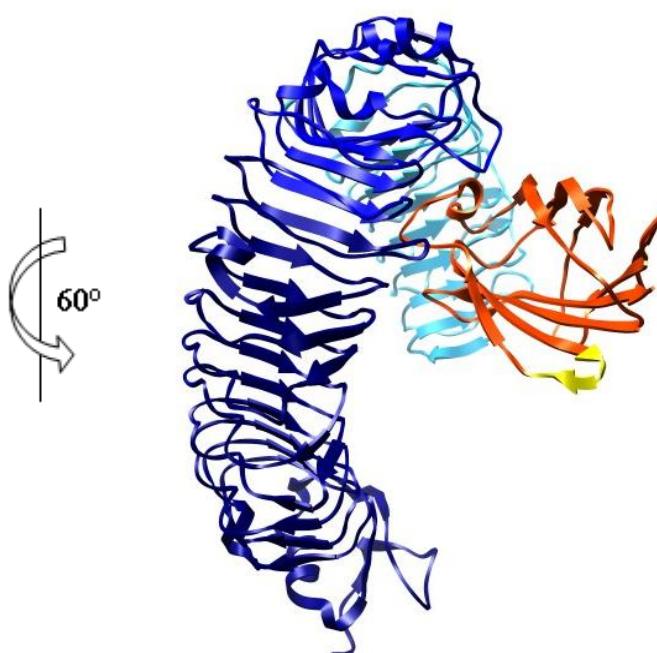
## PRILOGE

**Priloga A:** Struktura zunajcelične domene mišjega TLR4 v kompleksu z mišjim MD-2. (A-D) Struktura kompleksa mTLR4/mMD2 v različnih zornih kotih. V modri barvi je prikazana struktura zunajcelične domene mTLR4 (N-terminalni del; svetlo modro; C-terminalni del, temno modro), v oranžni pa mMD-2. (B) Struktura kompleksa mTLR4/mMD2 je obrnjena tako, da je viden vhod v hidrofobni žep MD-2. Z rumeno je označen predel aminokislin 82-87, kamor smo uvedli mutacije na človeškem homologu.

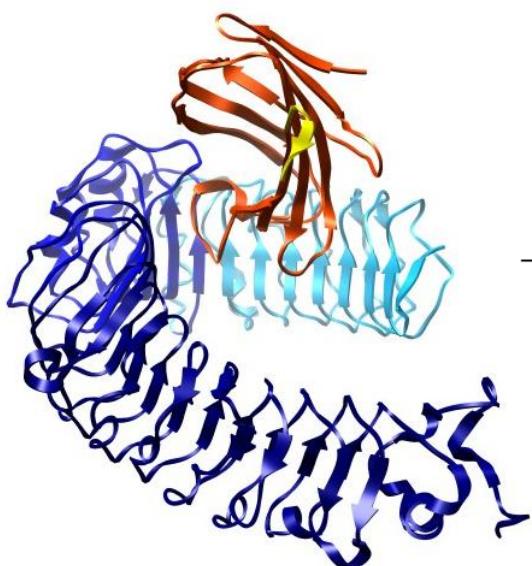
A



B

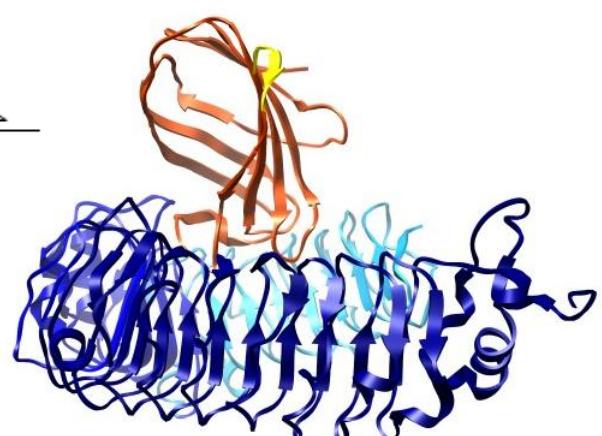


60°



C

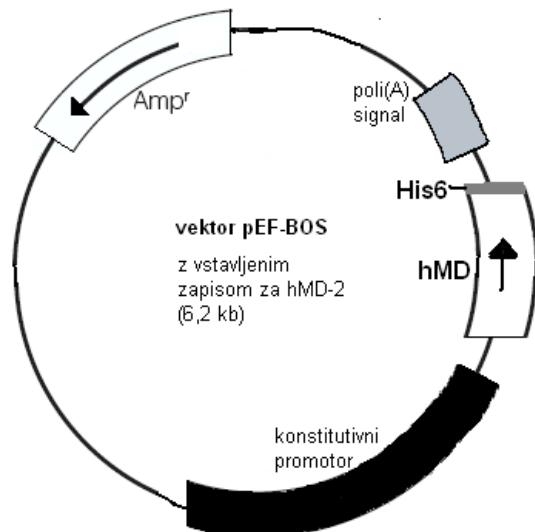
45°



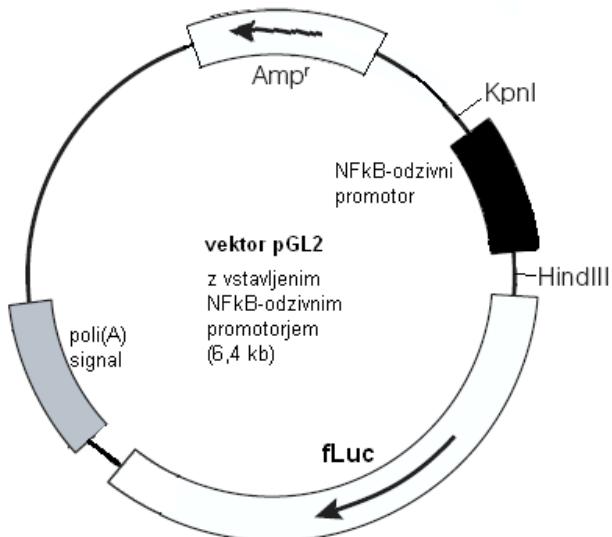
D

**Priloga B:** Sheme uporabljenih plazmidov. (A) pEF-BOS. (B) pGL2. (C) phRL-TK.

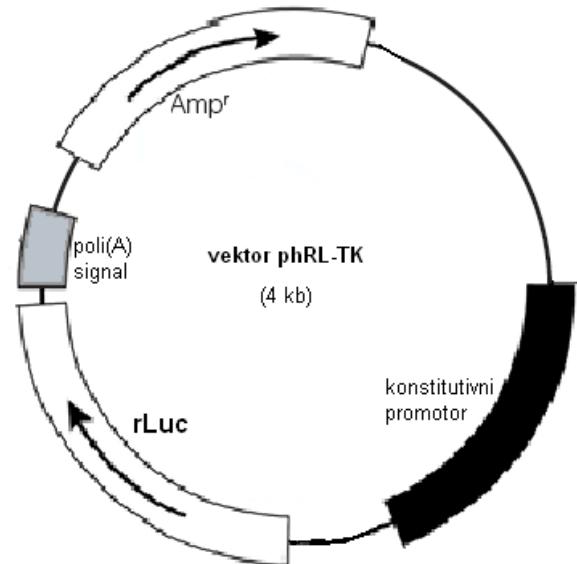
**A**



**B**



**C**



**Priloga C:** Uporabljene statistične metode.

Pri merjenju luciferazne aktivnosti smo poskus izvajali v treh paralelkah. Rezultati, predstavljeni grafično, predstavljajo povprečje oz. aritmetično sredino treh meritev ter pripadajoče standardne odklone. Celotno statistično obdelavo podatkov smo izvedli s pomočjo programa Microsoft® Excel.

**POVPREČJE**

Pri izračunu povprečja smo uporabili izraz za aritmetično sredino (1) (Košmelj, 2001).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots(1)$$

**STANDARDNI ODKLON**

Vzorčna varianca je povprečni kvadrirani odklon od aritmetične sredine podatkov vzorca (2).

Če vzorčno varianco korenimo, dobimo vzorčni standardni odklon (3) (Košmelj, 2001).

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \dots(2)$$

$$s = \sqrt{s^2} \quad \dots(3)$$

**PREIZKUŠANJE STATISTIČNIH DOMNEV**

Pri preizkušanju statističnih domnev smo uporabili izračun p-vrednosti, ki je v uporabi pri računalniški analizi. p-vrednost je verjetnost, da ob predpostavki, da je ničelna domneva pravilna, dobimo za testno statistiko vrednosti, ki so bolj »ekstremne« od izračunane vrednosti testne statistike (Košmelj, 2001).