

利用荧光共振能量转移技术研究活细胞 TLR4 与 MD-2 作用结构域 *

钟田雨 唐 靖 陈登宇 刘亚伟 王 蔚 刘靖华** 姜 勇**

(广东省功能蛋白质组学重点实验室, 南方医科大学, 广州 510515)

摘要 脂多糖(LPS)的识别和信号转导是宿主发生防御反应的关键, Toll 样受体 4(TLR4)与髓样分化蛋白-2(MD-2)形成复合物在 LPS 的识别及其信号转导中发挥了重要作用. 研究 TLR4 与 MD-2 结合的功能结构域, 对于深入了解 LPS 信号转导机制及其内毒素休克的防治具有重要意义. 运用基于强度的三通道荧光共振能量转移技术(FRET)及基因突变和转染技术, 研究了活细胞 TLR4 与 MD-2 作用的结构域. 结果表明: N 端 Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失使 TLR4 与 MD-2 结合能力明显下降; LPS 刺激后 TLR4 聚合迅速增加, 而缺失 Glu²⁴~Met⁴¹ 的 TLR4 不能聚合. 上述结果提示, TLR4 的 Glu²⁴~Met⁴¹ 不仅是结合 MD-2 的区域, 并且还参与了 LPS 刺激后 TLR4 的聚合作用.

关键词 TLR4, MD-2, 脂多糖(LPS), 荧光共振能量转移技术(FRET), 信号转导

学科分类号 Q288

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00246

革兰氏阴性(G-)菌感染引起的脓毒症(sepsis)是严重创伤、烧伤和手术病人常见的致死原因^[1]. 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是 G-菌细胞壁的主要成分, 也是其致病的关键结构. 由于 LPS 的识别和信号转导是宿主对 G-菌发生防御反应的关键, 所以对 LPS 信号转导的研究一直是相关领域的热点^[2]. 大量研究表明, Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)在识别和转导 LPS 信号中具有关键作用^[3,4]. 进一步研究发现 TLR4 对 LPS 的识别和信号转导依赖髓样分化蛋白-2(myeloid differentiation protein-2, MD-2)的参与^[5]. MD-2 能与 TLR4 胞外段结合, 形成复合物, 识别 LPS 信号^[6]. 但是目前对 TLR4 和 MD-2 相互结合的确切功能结构域还不清楚, 不同实验室报道的结果不同^[7,8]. 我们在以往工作的基础上, 利用目前研究活体细胞内蛋白质相互作用最可靠的方法之一——荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer, FRET), 对 TLR4 与 MD-2 之间的相互作用进行了进一步的探讨, 以期在活细胞中明确 TLR4 与 MD-2 作用的功能结构域, 丰富 LPS 受体的理论.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞. 带有 TLR4 信号肽编码序列的 pECFP-SP、pEYFP-SP、pECFP-SP-MD-2、pECFP-SP-TLR4、pEYFP-SP-TLR4 由本室构建并保存^[9]; 大肠杆菌菌株 DH5 α , HEK 293 细胞, HeLa 细胞均由本室保存.

1.1.2 试剂. DNA 纯化回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、PolyFect 转染试剂盒均购自 QIAGEN 公司; 限制性内切酶(*EcoR* I、*Bam*H I)、T4 DNA 连接酶、KOD plus 高保真 DNA 聚合酶、KOD plus-Mutagenesis Kit 购自 TOYOBO 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM 培养基购自

* 长江学者和创新团队发展计划(IRT0731), 国家自然科学基金委员会 - 广东省人民政府自然科学基金联合基金重点项目(U0632004)和国家自然科学基金面上项目(30270538, 30670829)资助.

** 通讯联系人.

刘靖华. Tel: 020-61648172-810, E-mail: liujhua@fimmu.com

姜勇. Tel: 020-61648231, E-mail: yjiang@fimmu.com

收稿日期: 2009-04-17, 接受日期: 2009-06-29

HyClone 公司; 引物由北京华大基因公司合成。

1.1.3 荧光成像系统. Zeiss Axiovert 200 M 倒置荧光显微镜(德国 Zeiss 公司), 配备 CFP(BP 436/25, FT455, BP480/40)、YFP(BP 500/25, FT515, BP535/30)、CFP-YFP-FRET(BP 436/25, FT455, BP535/30)滤光片, AxioVision FRET 4.6 软件。

1.2 质粒构建

以往的研究表明, 将青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)和黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)以 15 个中性氨基酸连接(CY-15P)时获得的 FRET 值最高^[10]。为了了解 Zeiss Axiovert 200 M 活细胞荧光显微系统在 FRET 研究中的特性, 确保后续研究结果的准确可靠, 本研究首先构建了 CY-15P 质粒, 用转染并表达 CY-15P 融合蛋白的细胞作为检测目标, 以分别表达 CFP 和 YFP 蛋白的细胞作为系统的阴性对照, 建立了 FRET 系统(见 2.1)。CY-15P 重组质粒是以 pEYFP-SP 为模板, 通过 PCR 扩增 YFP 全长编码序列, 并插入到 pECFP-SP 多克隆位点 *EcoR* I 和 *Bam*H I 两个酶切位点之中, 在扩增 YFP 序列的同时, 利用突变技术在 CFP 与 YFP 之前插入编码丙氨酸、缬氨酸和甲硫氨酸 3 个中性氨基酸的碱基序列(GCAGTCATG), 使得表达 CFP 和 YFP 两个荧光蛋白之间有一段 15 个氨基酸(SGLRSRAQA-SNSAVM)的连接肽(图 1)。PCR 上游引物为, 5' CGGAATTCTGCAGTCATGGTGAGCAAGGGC-GAGGAGC 3', GAATTC 为 *EcoR* I 酶切位点, T 为防止阅读框移码加入的碱基, 接着是丙氨酸、缬氨酸和甲硫氨酸的编码序列, 随后为编码 YFP 的前 19 个碱基序列; PCR 下游引物为, 5' G-GGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA-G 3', GGATCC 为 *Bam*H I 酶切位点, 随后为编码 YFP 的后 26 个碱基互补序列。利用 KOD plus 聚合酶进行 PCR 反应, 反应条件为: 94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 68℃ 1 min, 30 个循环; 68℃ 5 min。扩增的目的片段大小为 723 bp。将 PCR 产物用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后回收, 与经同样酶切回收后的载体 pECFP-SP, 用 T4 连接酶在 16℃ 进行连接反应 10 h, 然后将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。pECFP-SP-TLR4 Δ 24~41 和 pEYFP-SP-TLR4 Δ 24~41 分别以 pECFP-SP-TLR4 和 pEYFP-SP-TLR4 为模板, 通过定位突变技术将 TLR4 N 端的 Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失。上游引物为, 5' GAGCTGAATTTCTACAAAATC 3', 下游引物

为, 5' TCAGATAGATGTTGCTTCCTGCCAAT 3'。用 KOD plus 高保真聚合酶进行 PCR 反应, 反应条件为: 94℃ 2 min, 98℃ 10 s, 55℃ 6 min, 反应 27 个循环。扩增反应结束后, 首先用 *Dpn* I 处理 PCR 产物, 然后加入高效连接试剂和 T4 多核苷酸激酶进行连接反应, 最后连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。对阳性克隆进行 DNA 测序鉴定。

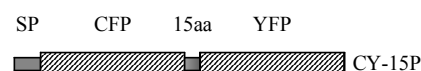


Fig. 1 Schematic plot of CY-15P

SP: Signal peptide; CFP: Cyan fluorescent protein; YFP: Yellow fluorescent protein; aa: Amino acid.

1.3 细胞培养和转染

HEK293 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。转染前一天, 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化, 铺入 Petri 皿中, 1 × 10⁴ 个 / 皿。待细胞生长融合至 50%~70%时, 按照 polyfect 转染试剂盒操作说明, 转染 1 μg CY-15P 质粒, 或同时转染 pECFP-SP 和 pEYFP-SP 各 500 ng, 或将 400 ng pECFP-SP-MD-2 分别与 600 ng pEYFP-SP-TLR4 或 600 ng pEYFP-SP-TLR4 Δ 24~41 共转染。转染 48 h 后, 用 Zeiss Axiovert 200M 倒置荧光显微镜观察荧光蛋白的表达并进行 FRET 检测。

HeLa 细胞用含 5% FBS、1%非必需氨基酸的 DMEM 培养基, 于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。转染前一天, 细胞以 0.25%胰蛋白酶消化传代, 将 2 × 10⁴ 个细胞铺入 Petri 皿中, 细胞生长融合至 50%~70%时, 用 polyfect 转染试剂将 pECFP-SP-TLR4 与 pEYFP-SP-TLR4 或 pECFP-SP-TLR4 Δ 24~41 与 pEYFP-SP-TLR4 Δ 24~41 各 500 ng 共转染细胞。转染 48 h 后, 弃去培养基, 更换为含 CD14(100 μg/L)的 PBS, 置 Zeiss Axiovert 200M 倒置荧光显微镜观察, 对同时表达 CFP-TLR4 和 YFP-TLR4 的细胞进行 FRET 检测, 并加入终浓度为 500 μg/L 的 LPS 刺激, 动态观察 FRET 变化。在加入 LPS 刺激后每分钟采集图片一组, 总共采集 5 min。

1.4 荧光成像及 FRET 检测

1.4.1 校正因子计算. 在 Zeiss Axiovert 200 M 倒置荧光显微镜上, 采用 100×/1.40 油镜, 分别选取 CFP(BP 436/25, FT 455, BP 480/40)、YFP(BP 500/25, FT 515, BP 535/30)、CFP-YFP-FRET(BP 436/25, FT 455, BP 535/30) 3 个滤光片作为供体、受体、FRET 3 个通道的滤光片。为了校正串色对 FRET 的影

响, 用单独转染并表达 pECFP-SP 的细胞来检测并计算供体的校正因子(correction factor), 用单独转染并表达 pEYFP-SP 来检测并计算受体的校正因子. 具体过程如下, 在单独表达 CFP 的细胞, 以 CFP 滤光片作为曝光参照, 自动测量最佳曝光时间. 以测得的曝光时间连续采集 3 个通道的图片. 选取 FRET 通道图片, 先在无细胞区域测量背景值, 再选取数个感兴趣区域(region of interest, ROI)检测其荧光强度, 运用 AxioVision FRET 4.6 软件计算供体校正因子. 用同样的方法检测并计算受体校正因子.

1.4.2 FRET 检测.

以 CFP 滤光片作为曝光参照, 打开激发光, 自动测量最佳曝光时间. 以测得的曝光时间连续采集供体、受体和 FRET 3 个通道的图片; 选取 FRET 通道图片, 先在无细胞区域测量背景值, 再选取 ROI 区域并检测其荧光强度, 将前面计算出的供体校正因子和受体校正因子输入 AxioVision FRET 4.6 软件, 运用 Xia 的方法计算出 FRET 净值(Net FRET), 并用色彩标记的 FRET 图像(color coded FRET image)显示 FRET 效率.

Xia 的计算公式如下:

$$\text{Net FRET} = Fc / \sqrt{(don_{gv} - bg_{don}) \times (acc_{gv} - bg_{acc})}$$

$$Fc = (fret_{gv} - bg_{fret}) - cf_{don} \times (don_{gv} - bg_{don}) - cf_{acc} \times (acc_{gv} - bg_{acc})$$

$fret$ = fret image, cf = correction factor, gv = intensity as gray value, bg = background intensity, don = Donor image, acc = Acceptor image

Xia 的方法是以 Youvan 等^[11]的方法为基础, 先计算去除背景和串色的 FRET 值(Fc), 再将得到

的结果除以供体和受体信号的平方根, 这能有效消除供体和受体表达量对 FRET 的影响, 得到 Net FRET 值^[10].

1.5 统计学分析

HEK293 细胞每组有 20 个重复样品, 计算 FRET 值. HeLa 细胞动态实验每组重复 3 次. 应用 SPSS13.0 统计分析软件进行统计学处理, Net FRET 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用两独立样本 t 检验(Independend-Samples t Test)分析. $P < 0.05$ 表明有统计学意义.

2 结 果

2.1 CY-15P 的表达、FRET 值检测及计算

在共转染 pECFP-SP 和 pEYFP-SP 的细胞可见青色荧光蛋白的表达(图 2a)及黄色荧光蛋白的表达(图 2b), 但在 FRET 通道未见荧光(图 2c); 转染 CY-15P 的细胞除了能在 CFP 和 YFP 通道看到相应的荧光外(图 2e, f), 还在 FRET 通道能看到明显的黄色荧光(FRET 现象, 图 2g), 并且色彩标记的 FRET 图像也显示有较高的 FRET 值(图 2h), CY-15P 组的 Net FRET 值与 CFP 和 YFP 组的 Net FRET 比较 $P < 0.05$, 有统计学意义(表 1).

Table 1 Net FRET of CFP and YFP, CY-15P, TLR4 wild type group and mutant group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Net FRET
CFP + YFP	20	0.029 ± 0.023
CY-15P	20	0.332 ± 0.052*
MD-2 + TLR4	20	0.145 ± 0.025*
MD-2 + TLR4Δ24~41	20	0.036 ± 0.027

* $P < 0.05$, vs. CFP + YFP group.

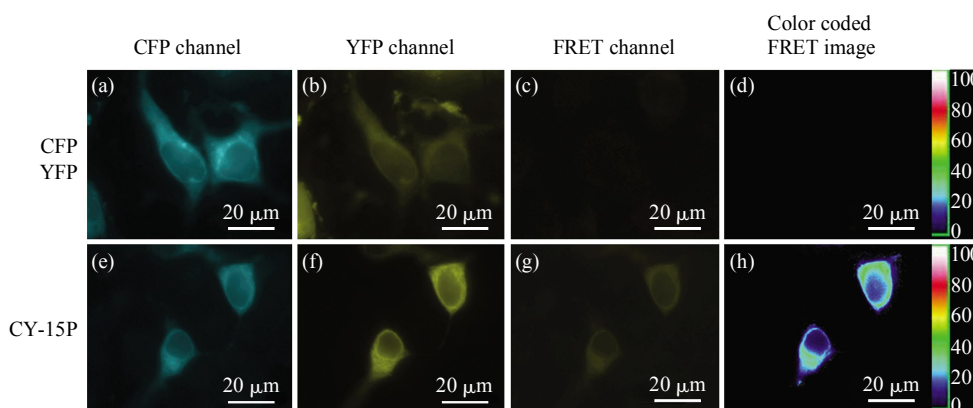


Fig. 2 Intensity of CY-15P color coded FRET and three channel image

(a ~ d) Image of CFP and YFP in HEK293 cells (a, b) and measurement of FRET (c, d); (e ~ h) Image of CY-15P in HEK293 cells (e, f) and measurement of FRET (g, h). $\times 1000$.

2.2 N 端 Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失突变对 TLR4 与 MD-2 结合的影响

转染 TLR4 N 端 Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失突变体 pEYFP-SP-TLR4 $\Delta 24\sim 41$ 质粒的细胞有黄色荧光表达(图 3f), 其分布与野生型 TLR4(图 3b)相比无明显差别, 但是色彩标记的 FRET 值在两组之间有明显的差别, 在表达 MD-2 和野生型 TLR4 细胞

膜可见较强的显示 FRET 值的色彩标记. MD-2 和 TLR4 的 Net FRET 值与对照 CFP 和 YFP 组相比有显著性差异($P < 0.05$, 表 1), 而 MD-2 和 TLR4 $\Delta 24\sim 41$ 的 Net FRET 值与对照相比无统计学差异($P=0.073$). 上述结果提示 TLR4 N 端 Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失突变体不能与 MD-2 在细胞膜上结合.

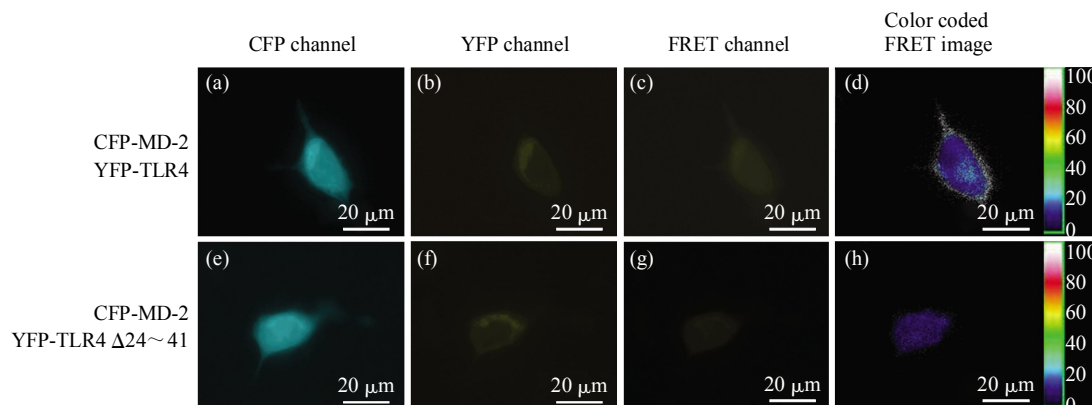


Fig. 3 FRET and three channel image of CFP-MD-2 and YFP-TLR4 or YFP-TLR4 $\Delta 24\sim 41$ in HEK293 cells

(a~d) Image of co-expression of CFP-MD-2 and YFP-TLR4 in HEK293 cells and measurement of FRET; (e~h) Image of co-expression of CFP-MD-2 and YFP-TLR4 $\Delta 24\sim 41$ in HEK293 cells and measurement of FRET. $\times 1\ 000$.

2.3 N 端 Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失突变对 TLR4 聚合的影响

TLR4 N 端 Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失突变体无论是与青色荧光蛋白融合还是与黄色荧光蛋白融合其表达与分布(图 4e, f)与野生型 TLR4(图 4a, b)基本一致, 主要分布在 HeLa 细胞膜和细胞浆. 表达与野生型 TLR4 融合的 CFP-TLR4 和 YFP-TLR4 细胞在 LPS 刺激前就有 FRET 现象(图 4c)和一定的 FRET 值

(图 4d), 在 LPS 刺激后 1~2 min FRET 值迅速增强, 随后减弱, 在 4 min 左右消失(图 5a), 而 N 端 Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失的 TLR4 突变体在 LPS 刺激前没有观察到 FRET 现象(图 4g)和检测到 FRET 值(图 4h), 并且 LPS 刺激后 FRET 也没有发生改变(图 5b). 上述结果表明 LPS 刺激后 TLR4 的聚合增强, 并持续较短的时间.

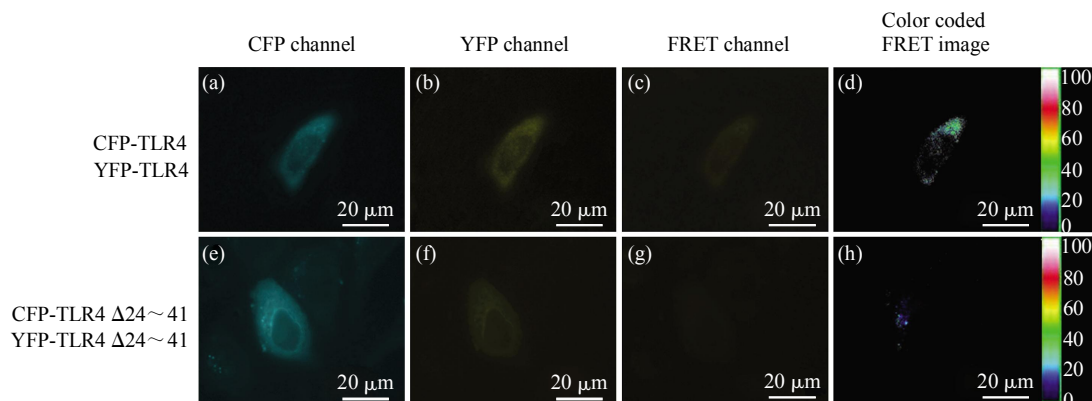


Fig. 4 FRET and three channel image of CFP-TLR4 and YFP-TLR4 or CFP-TLR4 $\Delta 24\sim 41$ and YFP-TLR4 $\Delta 24\sim 41$ in HeLa cells

(a~d) Image of co-expression of CFP-TLR4 and YFP-TLR4 in HeLa cells (a, b) and measurement of FRET(c, d); (e~h) Image of co-expression of CFP-TLR4 $\Delta 24\sim 41$ and YFP-TLR4 $\Delta 24\sim 41$ (e, f) and measurement of FRET(g, h). $\times 1\ 000$.

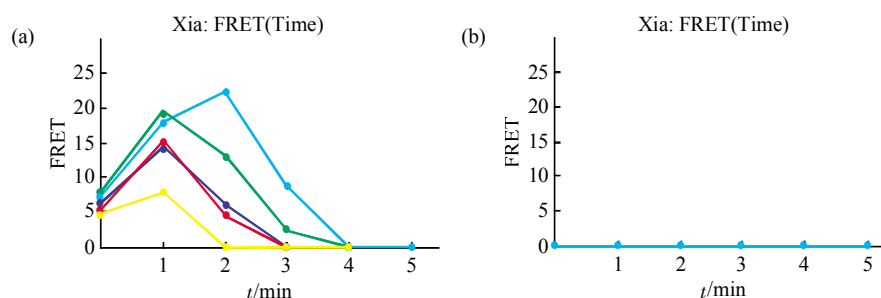


Fig. 5 Dynamics of FRET after LPS stimulation

Dynamics of FRET in CFP-TLR4 and YFP-TLR4 expression cells (a) and in CFP-TLR4 Δ 24~41 and YFP-TLR4 Δ 24~41 expression cells(b). Different colors are presentation of different region of interest (Roi) in HeLa cell membrane($\times 1\ 000$). —●—: Roi#1; —●—: Roi#2; —●—: Roi#3; —●—: Roi#4; —●—: Roi#5.

3 讨 论

FRET 是指当两荧光基团距离足够近时(通常在 10 nm 以内), 激发供体荧光基团, 能量将转移到受体荧光基团, 使受体发射出荧光. 根据这一原理, 将目标蛋白与荧光蛋白融合表达, 运用 FRET 技术在活细胞研究蛋白质之间的相互作用^[9]. 一对理想的 FRET 荧光基团, 要求供体的发射光谱和受体的吸收光谱有明显的重叠, 同时供体的发射光谱和受体的发射光谱要完全分开. 青色荧光蛋白 (cyan fluorescent protein, CFP) 和黄色荧光蛋白 (yellow fluorescent protein, YFP) 是目前常用的一对用于 FRET 研究的荧光基团. Xia 等^[10]的研究结果表明, 将 CFP 和 YFP 以 15 个中性氨基酸连接时获得的 FRET 值最高. 为了了解 Zeiss Axiovert 200M 活细胞荧光显微系统在 FRET 研究中的能力和特性, 我们参照 Xia 等的方法, 构建了以 15 个中性氨基酸连接的 CFP 和 YFP 融合蛋白 CY-15P 的表达质粒. 为了更好地研究膜蛋白的 FRET 现象(相互作用), 本研究在构建 CY-15P 融合蛋白的表达质粒时在 CY-15P 的序列前加入了信号肽, 使其能有效地在细胞膜上表达. 最后用转染并表达 CY-15P 融合蛋白的细胞作为检测目标, 以分别表达 CFP 和 YFP 蛋白的细胞作为系统的阴性对照, 建立了 FRET 系统.

用显微镜研究 FRET 的方法可以分为两大类: 一类是基于强度的方法, 另一类是基于荧光动态衰减的方法. 我们采用的是基于强度的三通道 FRET 计算, 这主要适用于活细胞的 FRET 研究. 准确进行三通道 FRET 定量测量必须要进行一定的校正, 以排除荧光串色及供体受体表达浓度的影响^[13]. 我们根据 Youvan 等^[11]的方法, 以分别单独表达供体

或受体的细胞, 计算出供体和受体的校正因子, 有效消除了串色的影响. 为了比较不同细胞间的 FRET 值, 消除供体受体表达浓度对 FRET 计算的影响, 我们采用了 Xia 等^[10]的方法进行 FRET 标准化计算. 这种方法首先用测得的 FRET 灰度值减去背景和供体及受体的串色, 将得到的 FRET 值除以供体和受体信号的平方根, 得出的结果能有效消除供体和受体的表达浓度对 FRET 的影响, 便于不同细胞间的比较. 此外, 我们采用基于 Zeiss Axiovert 200M 活细胞荧光显微系统的 AxioVision FRET 4.6 软件, 摆脱了 FRET 繁琐的计算^[14]. 按照上述方法和过程, 本实验所获得的 CY-15P 组的 FRET 值显著高于共表达 CFP 和 YFP 组的 FRET 值, 表明 FRET 系统建立成功, 为后续研究奠定了基础.

TLR4 和 MD-2 结合在细胞表面形成的受体复合物在 LPS 诱导的免疫应答中具有关键作用^[15]. 研究 TLR4 与 MD-2 结合的功能结构域, 对于深入了解 LPS 的信号转导机制具有重要意义. 由于与 TLR4 同样具有 LRR 结构的 TLR2 和 CD14 不能结合 MD-2, 因此 TLR4 与 MD-2 结合的区域很可能是 N 端的非 LRR 区^[16]. 我们将 TLR4 N 端包含 Cys²⁹ 和 Cys⁴⁰ 两个半胱氨酸残基的 Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失, 研究这段结构域对 TLR4 结合 MD-2 的影响. 为了排除内源性 TLR4 和 MD-2 的影响, 选择了无 TLR4 和 MD-2 表达的 HEK293 细胞研究 TLR4 与 MD-2 的相互作用. 结果表明, Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失虽不影响 TLR4 和 MD-2 的表达, 但两者之间的结合能力明显下降, TLR4 的 Glu²⁴~Met⁴¹ 很可能是结合 MD-2 的区域. Nishitani 等^[17]的体外结合实验发现, 合成的 TLR4N 端 Glu²⁴~Lys⁴⁷ 肽段能与 MD-2 结合; 进一步用定点突变技术发现 TLR4 的 Cys²⁹ 和 Cys⁴⁰ 在与 MD-2 结合中具有重要作用. 最近的晶

体结构研究表明, TLR4 的 Glu²⁴~Met⁴¹ 具有避免 LRR 疏水核暴露的作用, 可能有助于 TLR4 与 MD-2 的结合^[18]. 这些研究都支持我们的活细胞 FRET 实验结果.

膜受体的聚合是信号转导调控的重要方式之一. 例如单体型的受体酪氨酸激酶(PTK)只有很弱的基础活性, 在与胞外的配体结合发生二聚化后才表现出充分的活性. 一些本身没有激酶域的受体, 如细胞因子受体, 结合配体发生的受体二聚作用同时也将与受体结合的激酶(如 JAK 家族激酶)拉近, 产生了激酶的相互磷酸化, 把激酶激活, 进而激活下游的信号通路. 所以配体诱导的受体聚合作用至少有两个作用: 拉近激酶并使之相互磷酸化; 形成一个能够与受体或激酶下游分子结合的支架. TLR4/MD-2 复合物与 LPS 结合后活化的机制目前还不清楚^[19]. Nishiya 等^[20]发现, 用 TLR4 的单克隆抗体人为造成 TLR4 的聚合可以激活 TLR4 介导的细胞内信号转导通路, 使细胞 IL-8 和 TNF α 的释放增加, 与 LPS 激活细胞的效应一致, 因此推测 TLR4 介导的 LPS 信号跨膜转导可能是通过 TLR4 聚合激发下游信号. 为了证实上述推测, 我们用 FRET 技术对转染并表达了 TLR4 的黄色和青色荧光蛋白融合蛋白的 HeLa 细胞进行了动态观察和研究. 之所以选用 HeLa 细胞作为研究对象是由于该细胞表达 MD-2, 而 MD-2 在 TLR4 的聚合中发挥关键作用. 实验结果首次在活细胞证实, LPS 刺激后 TLR4 的聚合在短时间内迅速增强, 随后减弱, 在 4 min 左右消失. 相比野生型 TLR4, N 端 Glu²⁴~Met⁴¹ 缺失的 TLR4 突变体在 LPS 刺激下未发生聚合作用, 提示 TLR4 N 端的 Glu²⁴~Met⁴¹ 在自身的聚合中也发挥了重要的作用. 我们还观察到, 在 LPS 刺激前 CFP-TLR4 和 YFP-TLR4 就有一定的 FRET 值, 这可能是 TLR4 在刺激前就有部分聚合, 也可能由于我们导入的外源基因过表达所致.

综上所述, TLR4 N 端的 Glu²⁴~Met⁴¹ 不仅参与了与 MD-2 的相互作用, 而且在自身的聚合从而在 LPS 信号的跨膜转导中发挥了重要的作用. 明确 TLR4 与 MD-2 相互作用的功能结构域, 对于深入了解 LPS 信号转导机制, 防治细菌性感染和内毒素休克具有重要意义.

参 考 文 献

1 Miller S I, Ernst R K, Bader M W. LPS, TLR4 and infectious disease

- diversity. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3**(1): 36~46
- 2 Liu J H, Zhao K S. TLR and control of innate immunity. *Immunological J*, 2001, **17**(3): S17~S27
- 3 Poltorak A, He X, Smirnova I, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in TLR4 gene. *Science*, 1998, **282**(11): 2085~2088
- 4 Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*, 2004, **12**(4): 186~192
- 5 Shimazu R, Akashi S, Ogata H, *et al.* MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 1999, **189**(11): 1777~1782
- 6 Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, *et al.* Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*, 2002, **3**(7): 667~672
- 7 Viriyakosol S, Tobias P S, Kirkland T N, *et al.* Mutational analysis of membrane and soluble forms of human MD-2. *J Biol Chem*, 2006, **281**(17): 11955~11964
- 8 钟田雨, 刘靖华, 姜 勇. 髓样分化蛋白-2 在识别和转导内毒素信号中的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(5): 460~464
- 9 Zhong T Y, Liu J H, Jiang Y. *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(5): 460~464
- 9 刘亚伟, 刘靖华, 唐 靖, 等. 用 FRET 技术研究 TLR4 和 MD-2 的相互作用. *南方医科大学学报*, 2006, **26**(8): 1101~1105
- 10 Liu Y W, Liu J H, Tang J, *et al.* *Journal of Southern Medical University*, 2006, **26**(8): 1101~1105
- 10 Xia Z, Liu Y. Reliable and global measurement of fluorescence resonance energy transfer using fluorescence microscopes. *Biophys J*, 2001, **81**(4): 2395~2402
- 11 Youvan D C, Silva C M, Bylina E J, *et al.* Calibration of fluorescence resonance energy transfer in microscopy using genetically engineered GFP derivatives on nickel chelating beads. *Biotechnology*, 1997, **9**(3): 1~18
- 12 Siegel R M, Chan F K, Zacharias D A, *et al.* Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein. *Sci STKE*, 2000, **6**(38): 631~634
- 13 Gordon G W, Berry G, Liang X H, *et al.* Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J*, 1998, **74**(5): 2702~2713
- 14 Operaña T N, Tukey R H. Oligomerization of the UDP-glucuronosyltransferase 1A proteins: homo- and heterodimerization analysis by fluorescence resonance energy transfer and co-immunoprecipitation. *J Biol Chem*, 2007, **282**(7): 4821~4829
- 15 Walsh C, Gangloff M, Monie T, *et al.* Elucidation of the MD-2/TLR4 interface required for signaling by lipid IVa. *J Immunol*, 2008, **181**(2): 1245~1254
- 16 Fujimoto T, Yamazaki S, Eto-Kimura A, *et al.* The amino-terminal region of toll-like receptor 4 is essential for binding to MD-2 and receptor translocation to the cell surface. *J Biol Chem*, 2004, **279**(46): 47431~47437.
- 17 Nishitani C, Mitsuzawa H, Sano H, *et al.* Toll-like receptor 4 region Glu²⁴~Lys⁴⁷ is a site for MD-2 binding: importance of Cys²⁹ and

- Cys⁴⁰. J Biol Chem, 2006, **281**(50): 38322~38329
- 18 Kim H M, Park B S, Kim J I, *et al.* Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. Cell, 2007, **130**(5): 906~917
- 19 Fitzgerald K A, Rowe D C, Golenbock D T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2-complex. Microbes Infect, 2004, **6**(15): 1361~1367
- 20 Nishiya T, Kajita E, Miwa S. Ligand-independent oligomerization of TLR4 regulated by a short hydrophobic region adjacent to the transmembrane domain. Biochem Biophys Res Commun, 2006, **341**(4): 1128~1134

Using FRET to Study The Interaction Domain of TLR4 Binding to MD-2 in Living Cells*

ZHONG Tian-Yu, TANG Jing, CHEN Deng-Yu, LIU Ya-Wei, WANG Wei, LIU Jing-Hua**, JIANG Yong**

(Key Laboratory of Functional Proteomics of Guangdong Province, Southern Medical University, Guangdong 510515, China)

Abstract TLR4-MD-2 complex plays a key role in LPS recognition and its signal transduction. These steps are the vital elements of the host's defensive reaction. Studying the functional domain of TLR4 and MD-2 is very important to further understand the mechanism of LPS signal transduction. It was studied the interaction domain of TLR4 and MD-2 in living cells based on gene mutation, gene transfection and fluorescence resonance energy transfer(FRET) which is considered as one of the best methods used for intracellular protein-protein interaction study. CY-15P which was fused by CFP and YFP through 15 neutral amino acids was used as positive control, while co-expressed CFP and YFP proteins were used as negative control. The results showed that the ability of TLR4 binding to MD-2 decreased dramatically after the deletion of Glu²⁴~Met⁴¹ in N terminal of TLR4. Aggregation of TLR4 to LPS stimulation was observed, however, TLR4 without the Glu²⁴~Met⁴¹ mutation did not aggregate. All these results indicated that TLR4 Glu²⁴~Met⁴¹ might be the interaction domain of TLR4 binding to MD-2 and participate in the aggregation effect of TLR4 upon LPS stimulation.

Key words MD-2, TLR4, LPS, fluorescence resonance energy transfer(FRET), signal transduction

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00246

*This work was supported by grants from Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (PCSIRT) (IRT0731), Joint Fund of NSFC with the Government of Guangdong Province (U0632004) and The National Natural Science Foundation of China (30270538, 30670829).

**Corresponding author.

LIU Jing-Hua. Tel: 86-20-61648172-810, E-mail: liujhua@fimmu.com

JIANG Yong. Tel: 86-20-61648231, E-mail: yjiang@fimmu.com

Received: April 17, 2009 Accepted: June 29, 2009