

X-kromosomaalisen hyper-IgM-syndrooman aiheuttavien substituutiomutaatioiden analyysi

Pro Gradu -tutkielma
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Tampereen yliopisto
Elokuu 2005
Janita Thusberg

PRO GRADU –TUTKIELMA

Paikka: TAMPEREEN YLIOPISTO
Lääketieteellinen tiedekunta
Lääketieteellisen teknologian instituutti (IMT)
Bioinformatiikan tutkimusryhmä

Tekijä: THUSBERG, JANITA JOHANNA

Otsikko: X-kromosomaalisen hyper-IgM:n aiheuttavien substituutiomutaatioiden analyysi

Sivumäärä: 72 s. + liite 12 s.

Ohjaaja: Professori Mauno Vihinen

Tarkastajat: Professorit Markku Kulomaa ja Mauno Vihinen

Aika: Elokuu 2005

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: X-kromosomaalisesti periytyvä hyper-IgM-syndrooma (XHIGM) on immunopuutossairaus, joka johtuu B-solujen kyvyttömyydestä immunoglobuliinien raskaan ketjun luokkavaihdokseen. Potilaiden seerumin IgG-, IgA- ja IgE-pitoisuudet ovat hyvin alhaiset IgM:n ollessa normaali tai koholla, mikä johtaa toistuviin vakaviin infektioihin ja myös autoimmuuniteyppisiin hematologisiin häiriöihin. Mutaatiot CD40 ligandin (CD40L) geenissä aiheuttavat sairauden vaikuttamalla proteiinin toimintaan tai ekspressioon siten, että luokkavaihdoksen kannalta välttämätön CD40L-CD40-interaktio estyy tai heikkenee merkittävästi. Tutkimuksen tavoitteena oli analysoida CD40L:ssa todettuja XHIGM:n aiheuttavia substituutiomutaatioita syndrooman molekulaarisen perustan selvittämiseksi.

Tutkimusmenetelmät: Sekvenssianalyysillä tutkittiin proteiinin konservoituneisuutta sekä mutaatioiden vaikutusta proteiinin sekundaarirakenteisiin, aggregoitumistaipumukseen ja rakenteen järjestyneisyyteen. Rakenneanalyysillä tutkittiin mutaatioaminohappojen sopivuutta rakenteeseen rotameerianalyysillä, tutkittiin aminohappojen välisiä kontakteja ja mutaatioiden vaikutuksia niihin ja selvitettiin mutaatioiden vaikutuksia proteiinin elektrostaattiseen pintapotentiaaliin. Proteiini-proteiini-interaktioihin vaikuttavat mutaatiot selvitettiin kirjallisuuden perusteella.

Tutkimustulokset: Kaikille XHIGM:n aiheuttaville CD40L:n substituutiomutaatioille (yhteensä 30) saatiin molekyyli-tason selitys sekvenssi- ja rakenneanalyysin keinoin. Enemmistö CD40L:n mutaatioista on rakenteellisia, ja odottamattoman harvat mutaatiot sijaitsevat proteiinin konservoituneilla alueilla.

Johtopäätökset: Mutaatioiden vaikutusten tutkiminen kokeellisesti on työlästä ja aikaavievää, rakennetasolla usein lähes mahdotonta. Teoreettisilla menetelmillä saadaan sen sijaan nopeasti tarkkaa ja hyödyllistä tietoa mutaatioiden vaikutuksista proteiinin rakenteeseen ja toimintaan. Tässä tutkimuksessa saatiin selvitettyä kaikkien XHIGM:n aiheuttavien substituutiomutaatioiden vaikutuksia CD40L:iin ja siten myös syndrooman molekulaarista perustaa.

MASTER`S THESIS

Place: UNIVERSITY OF TAMPERE
Faculty of Medicine
Institute of Medical Technology (IMT)
Bioinformatics research group
Author: THUSBERG, JANITA JOHANNA
Title: Analysis of X-linked hyper-IgM syndrome causing missense mutations
Pages: 72 p. + appendix 12 p.
Supervisor: Professor Mauno Vihinen
Reviewed by: Professors Markku Kulomaa and Mauno Vihinen
Date: August 2005

ABSTRACT

Background and aims: X-linked hyper-IgM syndrome (XHIGM) is an immunodeficiency characterized by decreased levels of IgG, IgA and IgE and normal or elevated IgM level, pinpointing to a defect in the immunoglobulin class switch recombination. XHIGM patients are highly susceptible to recurrent bacterial infections and they are prone to autoimmune diseases and neutropenia. The syndrome is caused by mutations of CD40 ligand (CD40L) expressed in T-cells and the inability of the mutated protein to interact with its receptor CD40 expressed in B cells. The interaction is essential for the immunoglobulin class switching. The aim of this study was to analyze XHIGM causing missense mutations in order to elucidate the molecular basis of the disease.

Methods: Sequence analysis was used so as to study protein conservation and effects of mutations on protein secondary structure, aggregation and structural disorder tendencies. Three-dimensional (3D) structure based studies were carried out to examine the packing of mutated amino acids by rotamer and contact analysis. In addition, the effects of mutations on protein electrostatic surface potential were investigated. The effects of mutations on protein-protein interactions were elucidated with 3D structure and literature information.

Results: All missense mutations causing XHIGM (altogether 30) could be explained at the molecular level by means of sequence and structure analysis. Majority of CD40L mutations are structural, whereas unexpectedly low number appears in evolutionarily conserved regions of the protein.

Conclusions: Experimental study of effects of mutations is laborous and time-consuming and at the structural level often almost impossible. By contrast, precise and useful information about effects of mutations on protein structure and function can readily be obtained by theoretical methods. In this study, all the XHIGM causing missense mutations could be explained in terms of CD40L structure and function. Thus, the molecular basis of the syndrome could be elucidated.

SISÄLLYS

LYHENTEET	6
1. JOHDANTO	7
2. KIRJALLISUUSKATSAUS	8
2.1. Immunopuutosyndrooma	8
2.1.1. XHIGM:n molekulaarinen perusta.....	8
2.1.2. Kliininen taudinkuva.....	8
2.1.3. XHIGM:n hoito.....	9
2.2. CD40 ligandin biologinen rooli	10
2.2.1. T-solujen aktivoituminen ja CD40L:n ekspressio	10
2.2.2. B-solujen aktivoituminen ja immunoglobuliinien luokkavaihdos.....	12
2.2.3. CD40L:n signaalointi.....	14
2.3. CD40 ligandi.....	15
2.3.1. Rakenne	15
2.3.2. Geeni ja polymorfia.....	19
2.3.3. Geenin ekspression säätely	22
2.3.4. Mutaatioiden vaikutus CD40L:n toimintaan	22
2.3.5. Aiemmat tutkimukset liittyen CD40L:n mutaatioiden vaikutuksiin..	24
3. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	25
4. MENETELMÄT	26
4.1. Sekvenssianalyysi	26
4.1.1. Aminohapposekvenssit.....	26
4.1.2. Konservoituneisuus	27
4.1.3. Mutaatioiden vaikutus sekundaarirakenteisiin	27
4.1.4. Mutaatioiden vaikutus proteiimirakenteen epäjärjestyneisyyteen.....	27
4.1.5. Mutaatioiden vaikutus proteiinin β -aggregoitumistaipumukseen ...	28

4.2. Rakenneanalyysi	30
4.2.1. Kiderakenne	30
4.2.2. Rotameerianalyysi.....	30
4.2.3. Aminohappojen kontaktianalyysi	31
4.2.4. Elektrostaattinen pintapotentiali.....	32
5. TULOKSET	33
5.1. Sekvenssianalyysi	33
5.1.1. Tyypin I konservoituneisuus.....	33
5.1.2. Tyypin II konservoituneisuus	37
5.1.3. Tyypin III konservoituneisuus	39
5.1.4. Mutaatioiden vaikutus proteiinin sekundaarirakenteisiin sekvenssilähtöisten ennustusten perusteella.....	41
5.1.5. Proteiininirakenteen epäjärjestyneisyyttä lisäävät mutaatiot.....	42
5.1.6. Proteiinin β -aggreoitumistaipumukseen vaikuttavat mutaatiot	42
5.2. Rakenneanalyysi	44
5.2.1. Rotameerianalyysi ja rakenteelliset mutaatiot	44
5.2.2. Aminohappojen välisiin tärkeisiin kontakteihin vaikuttavat mutaatiot.....	49
5.2.3. Elektrostaattista pintapotentialia muuttavat mutaatiot	52
5.2.4. Proteiini-proteiini-interaktioihin vaikuttavat mutaatiot	57
5.2.5. Yhteenvedo tuloksista	59
5.2.6. SNP R181P:n vaikutus proteiinin ominaisuuksiin.....	61
6. POHDINTA	62
7. JOHTOPÄÄTÖKSET	65
LÄHDELUETTELO.....	66

Lyhenteet

AP1	Aktivaattoriproteiini 1
CD40L	CD40 ligandi
CD40R	CD40 reseptori
CsA	Syklosporiini A
ER	Endoplasminen kalvosto
FasL	Fas ligandi
GCK	Germinaalisen keskuksen kinaasi
G-CSF	Granulosyyttikasvutekijä
HMM	Kätketty Markovin malli
IFN γ	Interferoni- γ
Ig	Immunoglobuliini
IL	Interleukiini
ITAM	Immunotyrosiiniaktivaatiomotiivi
JNK	C-Jun N-terminaalikinaasi
LAT	Aktivoituneiden T-solujen linkittäjäproteiini (linker of activated T-cells)
MAPK	Mitogeenien aktivoima proteiinikinaasi (mitogen activated protein kinase)
MHC	Tärkein histokompatibiliteettikompleksi (major histocompatibility complex)
NF-AT	Aktivoituneiden T-solujen tumafaktori (nuclear factor of activated T cells)
NF κ B	Tumafaktori κ B
NM-kompleksi	NF-AT:n sitoutumiskohtaan sitoutuva kompleksi
PDB	Protein Data Bank
PI3-kinaasi	Fosfatidyli-inositoli-3-kinaasi
PLC	Fosfolipaasi C
PSIBLAST	Position specific iterated BLAST
SAS	Liuospinta-ala
SNP	Yksittäisen nukleotidin polymorfia (Single nucleotide polymorphism)
TCR	T-solureseptori
TGF	Transformoiva kasvutekijä
TNF	Tuumorinekroositekijä
TRAF	Tuumorinekroositekijään liittyvä proteiini (tumor necrosis factor associated protein)
XHIGM	X-kromosomaalisesti periytyvä hyper-IgM-syndrooma

1. Johdanto

X-kromosomaalisesti periytyvä hyper-IgM (XHIGM) on harvinainen primaarinen immunopuutosyndrooma, joka aiheuttaa potilailla vakavia komplikaatioita (*CD40L - tietokanta*, <http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>). XHIGM-potilaiden immuunijärjestelmä on puutteellinen johtuen B-solujen kyvyttömyydestä immunoglobuliinien raskaan ketjun luokkavaihdokseen, jolloin seerumin IgG-, IgA- ja IgE -pitoisuudet jäävät hyvin alhaisiksi IgM:n pitoisuuden ollessa normaali tai koholla (*Etzioni & Ochs, 2004; Razanajaona ym., 1996*). Spesifisten immunoglobuliinimolekyylien puuttuessa potilas on altis erilaisille bakteeri-infektioille, ja myös autoimmuunityypiset hematologiset häiriöt ovat tyypillisiä. Taudin ainoa parannuskeino on luuydinsiirto (*National Primary Immunodeficiency Resource Center*, <http://www.info4pi.org/>), ja hoitokeinot rajoittuvat infektioiden hoitamiseen sekä IgG:n säännölliseen infuusioon (*Wang ym., 1994*).

XHIGM johtuu mutaatioista CD40 ligandin (CD40L) geenissä (*Aruffo ym., 1993*). CD40L on T-lymfosyyttien solukalvolla ilmentyvä tyypin II transmembraaniproteiini, jolla on olennainen rooli T-solu–B-solu -interaktioissa (*Karpusas ym., 1995*). CD40L sitoutuu B-solujen solukalvolla ilmentyvään reseptoriinsa CD40:een aikaansaaden signaalinsiirtokaskadin, joka johtaa B-solun moninaiseen vasteeseen, johon liittyy muun muassa immunoglobuliinien raskaan ketjun luokkavaihdoksen indusoituminen (*Allen ym., 1993*). Mutaatiot CD40L:ssa estävät proteiinin sitoutumisen reseptoriinsa ja siten B-solujen signaalinsiirron (*Etzioni & Ochs, 2004; Razanajaona ym., 1996*).

Enemmistö CD40L:n mutaatioista sijaitsee eksoneissa. Substituutiomutaatioita, ts. sellaisia mutaatioita, jotka aiheuttavat aminohapon vaihtumisen proteiinissa toiseksi, on CD40L:ssa todettu yhteensä 30 erilaista. (*CD40L -tietokanta*, <http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>)

Suurin osa näistä mutaatioista sijaitsee reseptoriin sitoutuvassa TNF-homologiadomeenissa, mutta myös transmembraani- ja ekstrasellulaarisessa uniikissa domeenissa on todettu substituutiomutaatioita (*CD40L -tietokanta*, <http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>). Mutaatiot ovat moninaisia, ja niiden oletetaan vaikuttavan proteiinin rakenteeseen ja toimintaan monin eri tavoin (*Garber ym., 1999; Lopez-Granados ym., 2003*). Selkeää genotyyppi-fenotyyppi –korrelaatiota ei XHIGM:n kohdalla ole havaittu (*Etzioni & Ochs, 2004*).

Tutkimuksen tavoitteena oli analysoida kunkin substituutiomutaation vaikutuksia CD40L:n rakenteeseen ja toimintaan sekvenssianalyysillä sekä kiderakenteeseen perustuvien menetelmin, ja pyrkiä siten selvittämään XHIGM:n molekulaarista perustaa. Osaa CD40L:n mutaatioista on analysoitu biokemiallisin menetelmin, mutta vastaavanlaista, bioinformatiikan tutkimusmenetelmiä hyödyntävää mutaatioanalyysiä ei ole aiemmin tehty CD40L:lle.

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1. Immunopuutossyndrooma

XHIGM on harvinainen, X-kromosomaalisesti resessiivisesti periytyvä sairaus, joka kuvattiin ensimmäisen kerran vuonna 1961 (*Rosen ym., 1961*). Syndroomaa esiintyy alle 1/1000000 elävänä syntyneellä poikalapsella (*CD40L -tietokanta, <http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>*).

2.1.1. XHIGM:n molekulaarinen perusta

XHIGM johtuu mutaatioista T-lymfosyyttien pinnalla ilmentyvän CD40 ligandin (CD40L, CD154) geenissä (*Aruffo ym., 1993*). Karakterisoiduista mutaatioista osa sijaitsee introneissa, jolloin ne vaikuttavat geenin ekspressioon ja lähetti-RNA:n silmukointiin. Eksonissa on havaittu insertioita, deleetioita ja pistemutaatioita. Sellaisia pistemutaatioita CD40 ligandin geenissä, jotka saavat aikaan aminohapon muuttumisen proteiinituotteessa (missense-mutaatiot), on löydetty yhteensä 30 (*CD40L -tietokanta, <http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>*). Mutaatiot ovat moninaisia, joten niiden vaikutuksen proteiinin toiminnalliseen vikaan ja taudinkuvaan oletetaan vaihtelevan potilaiden välillä (*Garber ym., 1999*). Toiminnalliset missense-mutaatiot vaikuttavat CD40L:n trimerisaatioon tai interaktioihin CD40 reseptorin (CD40R) kanssa, ja rakenteelliset missense-mutaatiot voivat aiheuttaa proteiinin väärin poimuttumista tai rakenteen epästabiilisuutta. Muut mutaatiot voivat heikentää CD40L:n ekspressiota tai estää sen kokonaan (*Lopez-Granados ym., 2003*).

Viallinen CD40 ligandi ei pysty normaalilla tavalla sitoutumaan reseptoriinsa CD40:een ja indusoimaan signaalintapahtumia, jotka ovat välttämättömiä humoraalisen immuunijärjestelmän toiminnan kannalta. Tällöin immunoglobuliinien luokkavaihdoksen tapahtuminen sekä somaattinen hypermutaatio häiriintyvät B-soluissa, jolloin funktionaalisten, korkean affiniteetin vasta-aineiden tuotanto estyy. Potilaan seerumin IgG-, IgA- ja IgE -arvot jäävät hyvin alhaisiksi IgM:n ollessa normaali tai koholla. Eri isotyypin tuotannon ollessa vähäistä potilas on altis toistuville, opportunistisille bakteeri-infektioille, joista ensimmäiset ilmenevät jo ensimmäisen elinvuoden aikana (*Conley ym., 1999; Etzioni & Ochs, 2004*).

2.1.2. Kliininen taudinkuva

Useimmilla XHIGM-potilailla oireet ilmaantuvat ensimmäisen tai toisen elinvuoden aikana. Tavallisin ja merkittävin ongelma potilailla on infektioalttius.

Hengitysteiden ylä- ja alaosien erilaiset bakteeri-infektiot ovat hyvin yleisiä XHIGM-potilailla, tosin potilaat ovat alttiita myös muiden mikro-organismien aiheuttamille infektioille. Varhaislapsuuden keuhkosairaudet, etenkin *Pneumocystis carinii*'n aiheuttama keuhkokuume, herättävät usein ensimmäisen kerran epäilyjä, että lapsi sairastaa hyper-IgM-syndroomaa. (*National Primary Immunodeficiency Resource Center, <http://www.info4pi.org/>*). XHIGM:n komplikaatioina esiintyy myös enteroviruksen aiheuttamaa meningoencefaliittia (*Cunningham ym., 1999; Winkelstein ym., 2003*), sepsistä (yleisinfektio, joka johtuu bakteerien esiintymisestä veressä) ja osteomyeliittia (luuydintulehdus)(*Winkelstein ym., 2003*).

Noin 50 %:lle XHIGM-potilaista kehittyy ohimenevä tai krooninen neutropenia. Neutropeniassa veressä on normaalia vähemmän neutrofiilejä, mikä aiheuttaa suun haavaumia, proktiittia ja ihotulehduksia (*Cham ym., 2002; National Primary Immunodeficiency Resource Center, <http://www.info4pi.org/>*). Joillakin potilailla esiintyy myös ruuansulatuskanavan oireilua, kuten ripulia tai imeytymishäiriöitä. Näiden oireiden pääasiallinen aiheuttaja on *Cryptosporidium*, joka voi aiheuttaa myös sklerosoivan kolangiitin (krooninen sappitietulehdus, joka saattaa johtaa maksakirroosiin ja maksan vajaatoimintaan). XHIGM-potilaille voi kehittyä myös autoimmuunisairauksia, jotka ilmenevät reumatoidina artriittina, trombosytopeniana, hemolyyttisena anemiana, hypotyroidismina ja munuaissairauksina (*Notarangelo ym., 1992; National Primary Immunodeficiency Resource Center, <http://www.info4pi.org/>*).

XHIGM:n kliininen taudinkuva poikkeaa muista primaareista vasta-ainepuutossairauksista monin tavoin. Ruuansulatuselimistön komplikaatiot ovat pahempia, ja jatkuvat aivokalvojen ja aivojen tulehdukset aiheuttavat neurologista rappiota. Muissa sairauksissa tyypillisten lymfoomien lisäksi XHIGM-potilailla esiintyy myös adenokarsinomia maksassa ja sappitiehyissä. Sairastuvuus ja kuolleisuus ovat korkeampia kuin muissa vasta-ainepuutossairauksissa (*O'Neill Shigeoka, 2002*), ja vain harvoissa tapauksissa potilas saavuttaa kolmenkymmenen vuoden iän (*Tahara ym., 2004; Etzioni & Ochs, 2004*).

2.1.3. XHIGM:n hoito

Hyper-IgM-syndroomaan ei ole olemassa riittävän hyvää hoitoa (*Villa ym., 1994*). Oireiden hoitaminen ja infektioiden ennaltaehkäisy on kuitenkin jossain määrin mahdollista.

Immunoglobuliinien infuusiota käytetään 3-4 viikon välein vähentämään infektioita, ja monesti infuusio auttaa myös normalisoimaan veren IgM-pitoisuutta. Infuusio myös parantaa neutropeniaa joissain tapauksissa. Kroonisen neutropenian hoitoon käytetään myös granulosityttikasvutekijää (G-CSF) (*Wang ym., 1994*).

Koska XHIGM-potilaat ovat alttiita *Pneumocystis carinii* -infektioille, keuhkokuumetta hoidetaan ennaltaehkäisevästi trimetoprimisulfametoksatsolilla.

XHIGM on sairaus, joka pystytään nykyisin parantamaan vain luuydinsiirrolla (*National Primary Immunodeficiency Resource Center, <http://www.info4pi.org/>*). Myös onnistuneita kantasoluhoitoja on tehty (*Jacobsohn ym., 2004*).

2.2. CD40 ligandin biologinen rooli

CD40 reseptori – ligandi-interaktio on ratkaiseva tapahtuma B-solujen aktivoinnissa ja humoraalisten immuunireaktioiden säätelyssä (Hollenbaugh ym, 1994; Noelle ym, 1992). Aktivoitunut auttaja-T-solut ilmentävät solukalvolla CD40 ligandia, joka kykenee vuorovaikutukseen B-solujen solukalvon CD40 reseptorin kanssa. CD40R-CD40L -vuorovaikutus saa B-solussa aikaan signaalintikaskadin, joka vaikuttaa geeniekspression muuttumisen kautta B-solun proliferaatioon ja vasta-ainetuotantoon. (Allen ym, 1993). Fyysisen solukontaktin myötä syntyvän signaalin lisäksi B-solut tarvitsevat stimuloitua T-solujen erittämien sytokiinien välittämän niinsanotun toisen signaalin (Nonoyama ym, 1993).

2.2.1. T-solujen aktivoituminen ja CD40 ligandin ekspressio

T-solujen aktivoituminen johtaa solujen proliferaatioon ja erilaistumiseen sytokiineja erittäviksi soluiksi (CD4⁺ T-solut). Osa aktivoituneista T-soluista erilaistuu sytotoksisiksi efektorisoluiksi (CD8⁺ T-solut). T-solujen aktivoitumiseen liittyy niiden rakenteen uudelleenorganisointi, jolloin solukalvon komponentit järjestyvät siten, että lipidilautat kerääntyvät immunologisen synapsin ympäristöön kooten mukanaan yhteen solunsisäisiä signaalintikomplekseja. Uudelleenjärjestymisen myötä myös synapsissa tarpeettomat komponentit liikkuvat pois päin sen ympäristöstä (Kupfer & Singer, 1998).

B-solut toimivat antigeenin esittelijöinä CD4⁺ T-soluille. Luokan II MHC -molekyylit siirtyvät B-solun solukalvolle sitouduttuaan solussa prosessoidusta antigeenistä peräisin olevaan peptidiin. T-solun solukalvon reseptori pystyy tunnistamaan MHC-peptidi -kompleksin ja sitoutumaan siihen. MHC-peptidi-kompleksin ja T-solureseptorin (TCR) vaihtelevien alueiden (V_α ja V_β) välinen interaktio on ensimmäinen, mutta ei riittävä signaali T-solujen aktivoimiseksi (Norcross, 1984). Immunologisen synapsin peruselementit on esitetty kuvassa 1.

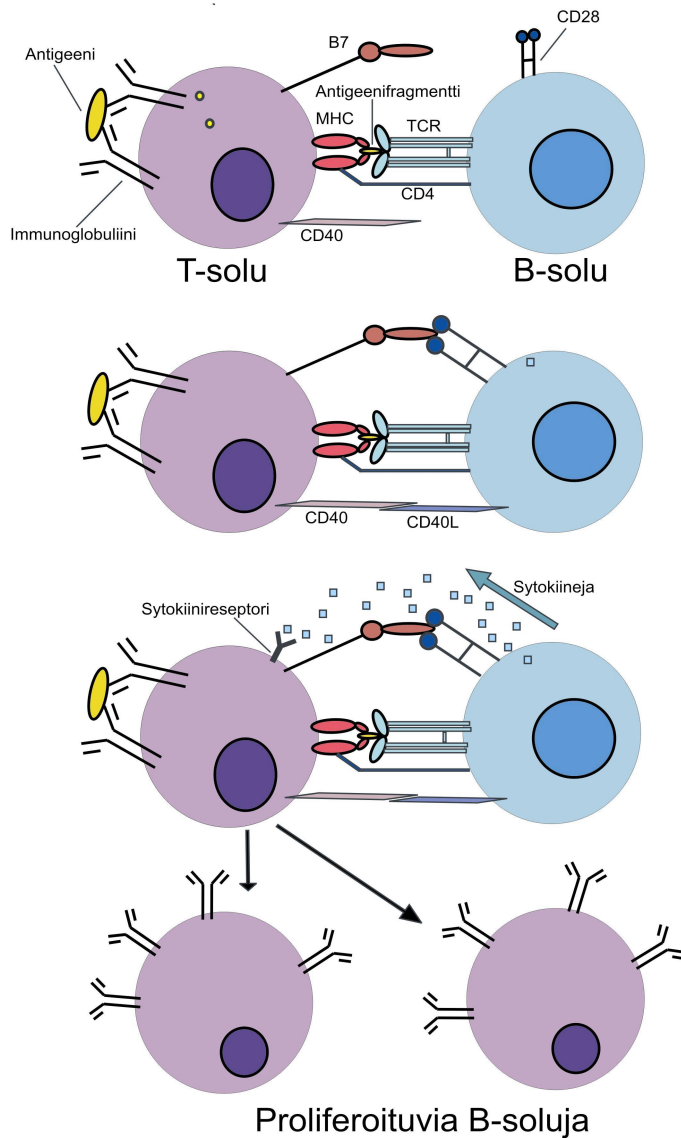
Luokan II MHC -molekyylin ei-polymorfisen alueen ja T-solun CD4-koreseptorin välinen interaktio on mahdollinen MHC-peptidi-TCR -interaktion tapahduttua, kun CD4 liikkuu solukalvolla lähemmäs T-solureseptoria. CD4-MHCII -interaktio parantaa T-solun kykyä reagoida antigeeniin moninkertaisesti, sillä CD4:n ryhmittäminen TCR:n läheisyyteen liittyy CD4:n sytoplasmiseen osaan yhdistyvän tyrosiinikinaasin signaalinsiirtokompleksiin (Patel ym., 1984).

Kostimulatoriset signaalit vahvistavat ja ylläpitävät MHC-peptidi – TCR -interaktion aikaansaamia signaaleja. Näitä sekundaarisia signaaleita ei välttämättä tarvita, jos T-solu on aktivoitu ennenkin, mutta naiivien T-solujen aktivoimiseksi ne ovat välttämättömiä. Kostimulatorisia vuorovaikutuksia tapahtuu antigeenin esittelijäsolujen pinnalla ilmentyvien B7 -molekyyliperheen jäsenten ja pysyvästi T-solujen solukalvolla olevien CD28 -proteiinien tai T-solujen aktivoitumisen myötä ekspressoituvien CD152 -proteiinien välillä (Schwartz, 1990).

MHC-peptidi – TCR -vuorovaikutus aktivoi kolmen transkriptiofaktorin sitoutumisen DNA:han. Geeniekspression säätelyn lisäksi signaalinsiirtokaskadin välituotteilla ja reitin sivuhaarojen tuotteilla on vaikutuksensa immunologisen synapsin

ylläpitoon ja siten signaalinsiirron jatkuvuuteen (*Grakouri ym., 1999*). TCR:n ligaatio aktivoi aluksi tyrosiinikinaasikaskadin, jonka muodostumiseksi vaaditaan src-, syk- ja tec -perheiden tyrosiinikinaaseja. Src- ja syk -perheiden kinaasit fosforyloivat TCR:n sytoplasmiseen domeeniin liittyviä immunotyrosiiniaktivaatiomotiiveja (ITAM), ja fosforylaatiotapahtumat mahdollistavat solukalvon adapteriproteiinin (LAT, linker of activated T cells) fosforylaation (*Schaeffer & Schwartzberg, 2000*). FosfoLAT:iin liittyvät entsyymit fosfolipaasi C γ (PLC γ), Grb2/SOS-kompleksi, fosfatidyylinositoli-3-kinaasi (PI3-kinaasi) ja GADS/ SLP-76/NCK/VAV -kompleksi jatkavat signaalinsiirtoa. PLC γ :n aloittama signaaliketjun haara johtaa Ca²⁺:n vapautumiseen endoplasmisesta kalvostosta (ER) ja siten kalsineuriinin aktivaation kautta NFAT -transkriptiofaktorin siirtymiseen tumaan. Grb2/SOS-kompleksin aloittama signaalireitti johtaa aktivaattoriproteiini 1:n (AP1) aktivaatioon, ja kolmas transkriptiofaktori NF κ B aktivoituu GADS/SLP-76/NCK/VAV-kompleksin aloittaman kaskadin myötä (*Dustin, 2001*). Transkriptiofaktorit NFAT, AP1 ja NF κ B säätelevät useita T-solujen immuunireaktioihin liittyviä geenejä. Muun muassa eri interleukiinityyppien, TNF α :n, interferoni γ :n (IFN γ) sekä solun pinnan molekyylien, kuten Fas ligandin (FasL), CTLA4:n ja CD40L:n ekspresio indusoituu näiden transkriptiofaktoreiden aktivoitumisen johdosta (*Rao ym., 1997; Masuda ym., 1998*).

Vain aktivoituneet T-solut ilmentävät CD40 ligandia (*Armitage ym., 1992*), kun taas B-solut ilmentävät CD40 reseptoria jatkuvasti (*Clark ym., 1986*). Myös CD40L:n interaktio B-solun CD40 reseptorin kanssa toimii kostimulatorisessa roolissa lisäten edelleen CD40L:n ekpressiota autologisen säätelyn tapaan (*Pinchuk ym., 1996*). Vuorovaikutus stimuloi B7-proteiinien ekpressiota B-solujen solukalvolla lisäten B7-CD28 -interaktioita B- ja T-solujen välillä. Lisäksi aktivoituneen T-solun CD40 ligandin ja B-solun CD40 reseptorin välisellä vuorovaikutuksella on merkitystä B-solun vasta-ainetuotannossa (*Coico ym., 2003*).



Kuva 1. Immunologinen synapsi. B-solun ja T-solun vastavuoroinen aktivaatio johtaa B-solujen proliferaatioon. Kuvassa ei ole huomioitu adheesiomolekyylejä. Kuva mukailtu S.F. Gilbertin artikkelista (Gilbert ym., 2003).

Adheesiomolekyylejä tarvitaan vahvistamaan ja ylläpitämään T- ja B-solujen välisiä kontakteja (immunologista synapsia) T-solun aktivoimiseen tarvittavan ajan. Adheesioproteiinit CD54 ja CD58 B-solussa ovat vuorovaikutuksessa T-solun vastaavien CD18 ja CD2 -proteiinien kanssa (Coico ym., 2003).

2.2.2 B-solujen aktivoituminen ja immunoglobuliinien luokkavaihdos

Antigeenin vuorovaikutus kypsän B-solun antigeenireseptorin kanssa riittää B-solun aktivoitumiseen. Jotta B-solu alkaisi tuottaa vasta-aineita, tarvitaan kuitenkin T_H -solujen apua, eli immunologisen synapsin muodostumista, etenkin useimpien proteiinantigeenien kohdalla. Aktivoiduttuaan B-solut proliferoituvat, ja jotkut niistä erilaistuvat vasta-aineita syntetisoiviksi ja erittäviksi plasmak soluiksi (Coico ym., 2003).

Vasta-aineet ovat ainutlaatuisia paitsi antigeenin sitoutumiskohdan diversiteetin vuoksi, myös niiden efektoriominaisuuksien monipuolisuuden johdosta. Vasta-aineen spesifisyys määräytyy antigeenin sitoutumiskohdan perusteella, joka koostuu kahdesta vaihtelevasta V-domeenista V_H ja V_L . Efektorifunktiot riippuvat sen sijaan raskaan ketjun C-alueen isotyypistä. Tietty V-domeeni voidaan yhdistää minkä tahansa isotyypin C-alueen kanssa isotyyppien luokkavaihdoksen johdosta. DNA:n uudelleenjärjestelyt, joita isotyyppien luokkavaihdos vaatii, tapahtuvat aktivoitujen T-solujen tuottamien sytokiinien ohjaamina (*Finkelman ym., 1990*).

Immuunireaktion alkuvaiheessa tuotetaan ainoastaan IgM:a, sillä isotyyppiä voidaan tuottaa ilman luokkavaihdosta. Alun perin antigeeniin reagoineiden solujen jälkeläiset voivat myöhemmin geneettisen uudelleenjärjestelyn myötä alkaa tuottaa muita isotyyppejä IgG, IgA, IgD ja IgE. Raskaan ketjun isotyyppivaihdos johtuu T-B interaktiosta, ja CD40-CD40L -vuorovaikutus on isotyyppivaihdoksen tapahtumiseksi välttämätön (*Kroczyk ym., 1994*). T-solun tuottama sytokiini määrää, mitä immunoglobuliinin isotyyppiä B-solu alkaa tuottaa; esimerkiksi IL4 saa B-solun tuottamaan enimmäkseen IgG:a ja IgE:a, TGF β stimuloi IgA:n ilmentämistä ja IFN γ stimuloi B-solua tuottamaan komplementtia aktivoivia IgG-isotyyppejä (*Finkelman ym., 1990*). Sytokiinit indusoivat isotyyppivaihdoksen stimuloimalla lähetti-RNA:n (mRNA) transkriptiota ja silmikointia raskaan ketjun C-alueen geenin 5' päässä olevista rekombinaatiokohdista (*Finkelman ym., 1990*).

Eri isotyyppien vasta-aineet ovat mukautuneet toimimaan kehon eri osissa. Koska mikä tahansa V-alue voi yhdistyä mihin tahansa C-alueeseen, B-solut voivat tuottaa samalle antigeenille spesifisiä vasta-aineita, jotka erilaisten C-alueidensa puolesta voivat toimia eri osissa kehoa. Aikaiset, IgM-tyypin vasta-aineet muodostavat pentameerejä, ja kykenevät siten sitoutumaan multivalentteihin antigeeneihin. IgM: ä tuotetaan kuitenkin ennen somaattisen hypermutaation tapahtumista, joten molekyylien affiniteetti on yleensä alhainen. Suuren kokonsa vuoksi IgM: ä esiintyy enimmäkseen veressä ja vähemmässä määrin imunesteessä. Muiden isotyyppien vasta-aineet – IgG, IgA ja IgE – ovat pienempikokoisia ja diffusoituvat helposti verenkierrosta kudoksiin. IgA voi muodostaa dimeerejä, mutta IgG ja IgE ovat aina monomeerisiä. IgG on pääasiainen vasta-ainetyyppi veressä ja solunulkoisessa nesteessä, ja IgA: ta esiintyy eritteissä. IgE esiintyy alhaisina konsentraatioina veressä ja solunulkoisessa nesteessä; se sijaitsee pääosin syöttösolujen pinnalla aiheuttaen välittömiä poistoreaktioita, kuten aivastelua, yskimistä ja oksentelua antigeenin sitoutuessa siihen. IgA voi muodostaa dimeerejä, mutta IgG ja IgE ovat aina monomeerisiä (*Janeway ym., 2001*).

CD40-CD40L -interaktiolla on todettu olevan vaikutusta myös B-solujen sytokiinituotantoon, B7-proteiinien ja adheesiomolekyylien ilmentämiseen ja siten T-solukontaktin ja -kostimulaation tehokkuuteen (*Bishop & Hostager, 2003*). CD40:n ligaatio stimuloi mm. IL2:n, IL6:n, IL10:n, TNF α :n, lymfotoksiini α :n ja TGF β :n synteesiä B-soluissa (*Clark & Shu., 1990; Burdin ym., 1995; Kindler ym., 1995; Worm & Geha., 1995; Zan ym., 1995; Worm ym., 1998*). Vuorovaikutus ei ole merkittävä ainoastaan B-solujen alkuvaiheen toiminnan stimuloinnissa, vaan CD40-CD40L -kontaktilla on todettu olevan olennainen vaikutus myös B-muistisolujen muodostumisessa (*Foy ym., 1994*).

2.2.3. CD40:n signalointi

AP1:n ja NF κ B:n on todettu olevan olennaisia transkriptiofaktoreita sytokiini geenien ekspression induktiossa B-soluissa. Niiden aktivoitumiseen johtavia signaalireittejä ei vielä kokonaisuudessaan tunneta, mutta niiden tiedetään saavan alkunsa CD40:n solunsisäisen osan ja sen kanssa vuorovaikutuksessa olevien TRAF-proteiinien (Tumor Necrosis Factor Associated Protein) välityksellä (Harigai ym., 2004).

B-solun solukalvolla jatkuvasti läsnä oleva CD40 klusteroituu trimeerisen CD40 ligandin sitoutumisen myötä, mistä seuraa myös CD40:een liittyneiden sytoplasmisten TRAF-adaptoriproteiinien kerääntyminen paikalle. Kerääntymisen myötä TRAF-proteiinit kykenevät vuorovaikutukseen signalointiproteiinien kanssa ja aloittamaan signalointikaskadin B-solussa. TRAF-proteiinit liittyvät useisiin eri CD40-signaaliketjuihin; eräs niistä johtaa JNK:n (C-Jun N-terminaalikinaasi) aktivaatioon, toinen p38 -proteiinikinaasin ja kolmas NF κ B:n aktivaatioon. Muut kinaasit saattavat olla osana näitä tai muita CD40:stä alkunsa saavia signaalikaskadeja (Bishop & Hostager, 2003). MAP-kinaasiperheen proteiineilla, kuten JNK:lla ja p38:lla on B-soluissa tärkeä rooli AP1-transkriptiofaktorin aktivaatiossa ja siten sytokiinituotannon induktiossa (Karin, 1995).

GCK (Germinal Center Kinase) voi olla yhteydessä TRAF2-proteiinin TRAF-domeeniin ja olla mukana CD40:stä alkunsa saavassa JNK:n aktivaatioon johtavassa signaalireitissä. TRAF2 voi myös olla vuorovaikutuksessa ASK1 MAP-kinaasin kanssa, joka indusoi JNK:n ja p38:n aktivaation. MAP-kinaasivälitteinen signaali voisi kulkea myös GCK:n välityksellä, sillä GCK pystyy sitoutumaan MAP-kinaasi MEKK1:een, joka on ylävirrassa JNK:n signaalipolulla (Yuasa ym., 1998). B-solujen signalointitapahtumia ei kuitenkaan ole vielä tutkittu (Bishop & Hostager, 2003).

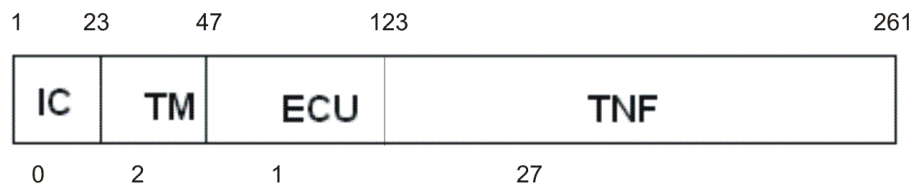
NF κ B:n aktivoitumiseen johtavan CD40-signaalinsiirtokaskadin komponentteja ei ole vielä varmistettu B-soluissa (Bishop & Hostager, 2003), mutta MAP3K NIK on oletettavasti siinä osallisena, sillä se kykenee aktivoimaan I κ B -kinaasikompleksin, joka fosforyloi NF κ B inhibiittoriproteiineja (Ling ym., 1998). Myöhemmissä tutkimuksissa on kuitenkin todettu, että NIK ei ole välttämätön CD40-signaloinnille, (Yin ym., 2001) joten NIK on signaalinsiirrossa todennäköisesti epäsuorasti mukana (Bishop & Hostager, 2003).

CD40:n signaalinsiirtoon B-solussa on liitetty myös useita muita entsyymejä, kuten Lyn (Src perheeseen kuuluva kinaasi), fosfatidyli-inositoli-3-kinaasi, fosfolipaasi C γ 2 ja seriini-treoniinikinaasi Pim-1. Näiden entsyymien toiminta ja järjestyminen koko CD40 -signaalinsiirtokaskadin kontekstissa on kuitenkin vielä epäselvä (Bishop & Hostager, 2003).

2.3. CD40 ligandi

2.3.1. Rakenne

CD40 ligandi on TNF (tumor necrosis factor) -perheeseen kuuluva tyypin 2 kalvogykoproteiini, jonka massa on 39 kDa. Biologisesti aktiivinen CD40L esiintyy homotrimeereinä. Proteiini (monomeeri) voidaan rakenteensa perusteella jakaa neljään osaan: solunsisäiseen N-terminaaliosaan (aminohapot 1-22), lyhyeen transmembraaniosaan (aminohapot 23-46), ekstrasellulaariseen uniikkiin osaan, eli ”varteen” (65 aminohappoa, aminohapot 47-122) ja C-terminaaliseen TNF-domeeniin (139 aminohappoa, aminohapot 123-261). TNF-domeeni on proteiinin osista parhaiten karakterisoitu – sen rakenne on määritetty röntgensädekristallografisesti 2 Å resoluutiolla (Karpusas ym., 2001 ja Karpusas ym., 1995). (Kiderakenne alkaa aminohaposta 116 ja TNF-domeeni aminohaposta 123.)



Kuva 2. Kaavioesitys CD40L -proteiinin rakenteesta ja substituutiomutaatioiden esiintyminen. IC - intracellulaariosa; TM - transmembraaniosa; ECU - ekstrasellulaarinen uniikki osa; TNF – TNF-homologiaosa. Kuvan alla olevat luvut kuvaavat mutaatioiden määrää, yllä sekvenssialue proteiinissa.

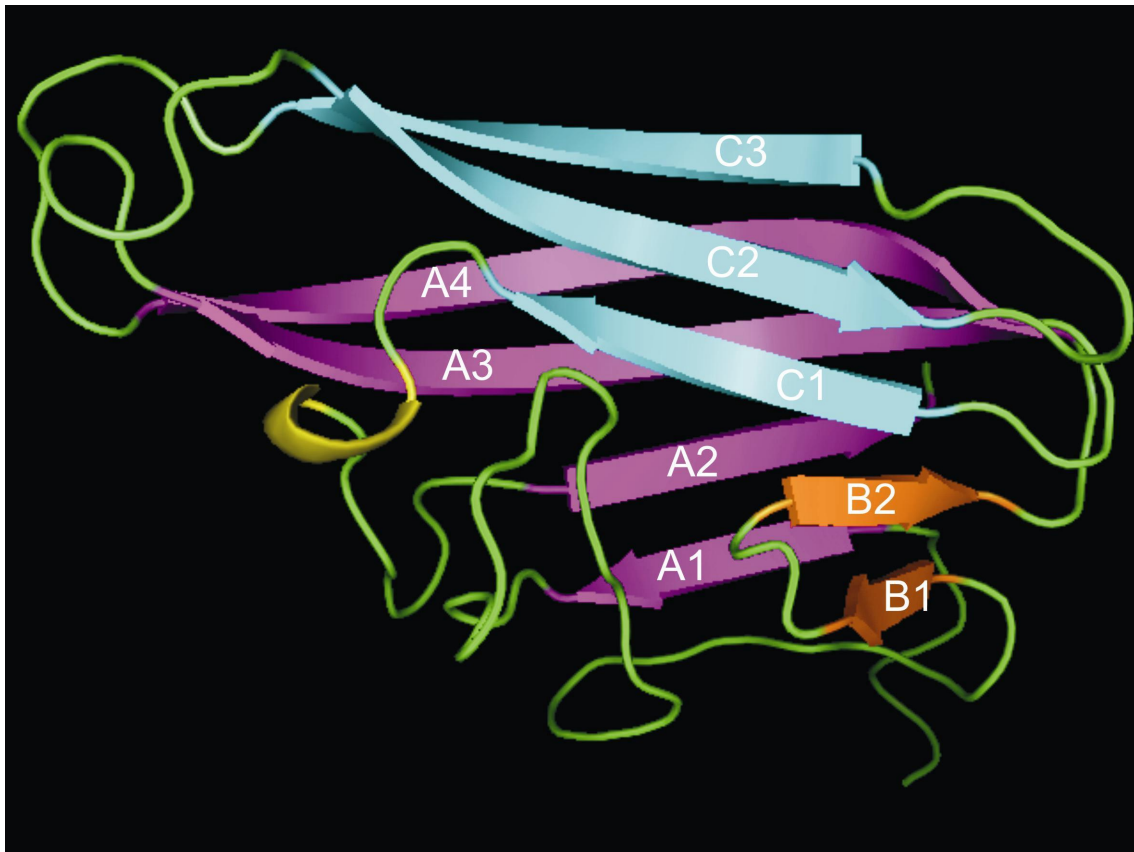
Solukalvolla esiintyvän, täysimittaisen (39 kDa) CD40 ligandin lisäksi on kuvattu erilaisia liukoisia muotoja samasta proteiinista, massoiltaan 31, 18 ja 14 kDa (Graf ym., 1995). 18 kDa:n proteiini on todettu funktionaaliseksi, ja sitä pidetään CD40 ligandin liukoisena muotona (Ludewig ym., 1996; Wykes ym., 1998). Vielä ei ole tutkittu, onko CD40L:n liukoisen muodon tuottavalla entsyymaattisella reaktiolla yhteyttä muiden TNF-perheen proteiinien, kuten FasL:n ja TNF α :n vastaaviin tapahtumiin (Schönbeck & Libby, 2000), jotka on kuvattu yksityiskohtaisesti (Gearing ym., 1994; McGeehan ym., 1994).

TNF-superperheen jäseniä on tällä hetkellä tunnistettu ihmisellä yhteensä 47 erilaista, joista 29 kuuluu TNF reseptoreihin ja 18 TNF ligandeihin (Locksley ym., 2001; Zhang ym., 2004). Kaikki tiedossa olevat TNF-perheeseen kuuluvat proteiinit muodostavat trimeerejä, ja kukin monomeeri on rakenteellisesti konservoitunut, β -säikeistä ja silmukoista ”kääretorttu” (jelly roll) -topologian mukaisesti laskostuva rakenne (Zhang, 2004). Rakenteellinen konservoituneisuus on superperheessä ilmeistä,

mutta sekvenssihomologia jäsenten välillä vaihtelee suhteellisen alhaisessa, noin 20-30 prosentin haarukassa (Karpusas ym., 1995).

Samankaltaisesta tertiaari- ja kvartaarirakenteesta huolimatta TNF-perheen eri jäsenet ovat spesifisyydeltään hyvin erilaisia. Proteiini-proteiini-kontaktien spesifisyys reseptoriin/ligandiin sitoutumisessa pohjautuukin pääosin β -säikeitä yhdistävien silmukoiden ominaisuuksiin, jotka eivät muuta yleistä laskostumista muuten kuin paikallisesti (β -säikeiden topologia ja β -levyjen orientaatio ovat TNF-perheessä säilyneet). Useat CD40L:n silmukat poimuttuvat merkittävästi muiden TNF-perheen proteiinien silmukoista poikkeavalla tavalla (Karpusas ym., 1995).

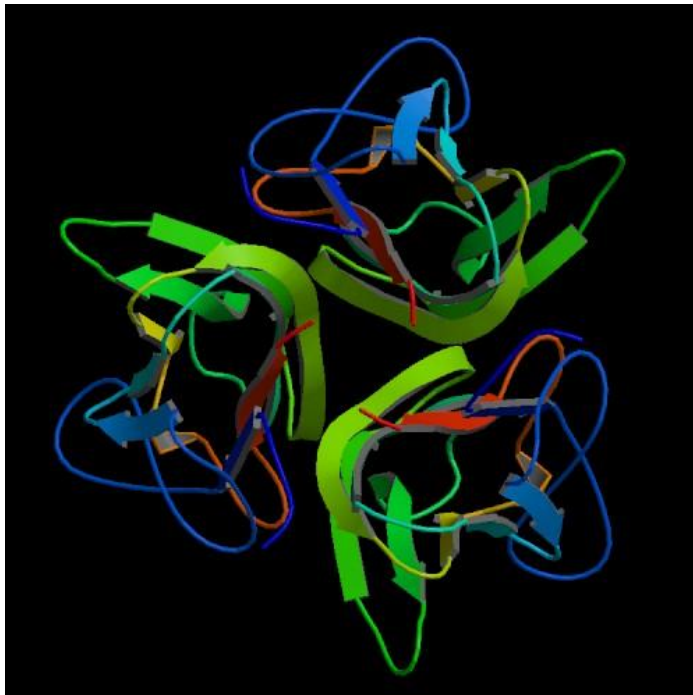
CD40 ligandi (aminohapot 116-261) rakentuu yhdeksän β -säikeen muodostamasta kolmesta β -levystä ja yhdestä lyhyestä α -kierteestä joka sijaitsee β -säikeiden C1 ja A2 välissä. (Kuva 3).



Kuva 3. CD40 ligandin röntgensädekristallografisesti määritetty rakenne (aminohapot 116-261). β -säikeet on numeroitu, ja niiden muodostamat β -levyt A, B ja C on esitetty kuvassa eri värein. α -kierre on kuvassa keltainen. Rakenteen PDB-koodi on 1ALY.

Proteiinissa on yksi disulfidisidos, kysteiinien 178 ja 218 välillä, joka kiinnittää β -säikeet A3 ja A4 toisiinsa. Asparagiini 240, joka sijaitsee säikeessä C1, on N-glykosyloitu (Karpusas ym., 1995). Hiilihydraatin rakennetta ei tunneta rakenteen perusteella, ja sen merkitystä CD40L:n toiminnan kannalta ei tunneta (Khandekar ym., 2001). Hiilihydraatilla ei ole osuutta reseptoriin sitoutumisessa, sillä N240:n mutatoiminen alaniiniksi ei vaikuta CD40L-CD40 -interaktioon (Bajorath ym., 1995).

Kohta, joka sitoutuu reseptoriin, on ennustettu lymfotoksiini α -TNFR -interaktion perusteella. Se sijaitsee kahden monomeerin väliin jäävässä kapeassa raossa, jossa suorassa kontaktissa reseptorin kanssa olevat CD40L:n aminohapot K143, R203 ja R207 (*Singh ym., 1998*) sijoittuvat A1-B1 –silmukkaan (K143) ja C3-säikeeseen (R203 ja R207). Lisäksi CD40L:n aminohapot I127, S128, E129, E142, G144, Y145, Y146, C178, S185, Q186, A187, R200, F201, C218, Q220, S248, H249, G250, T251 ja G252 osallistuvat reseptoriin sitoutumiseen muodostaen hydrofobisen seinämän suorassa kontaktissa keskenään olevien reseptorin ja ligandin polaaristen aminohappojen ympärille. Näillä alueilla ei ole juuri lainkaan sekvenssitason konservoituneisuutta eri TNF-perheen jäsenten välillä. (*Karpusas ym., 1995*)

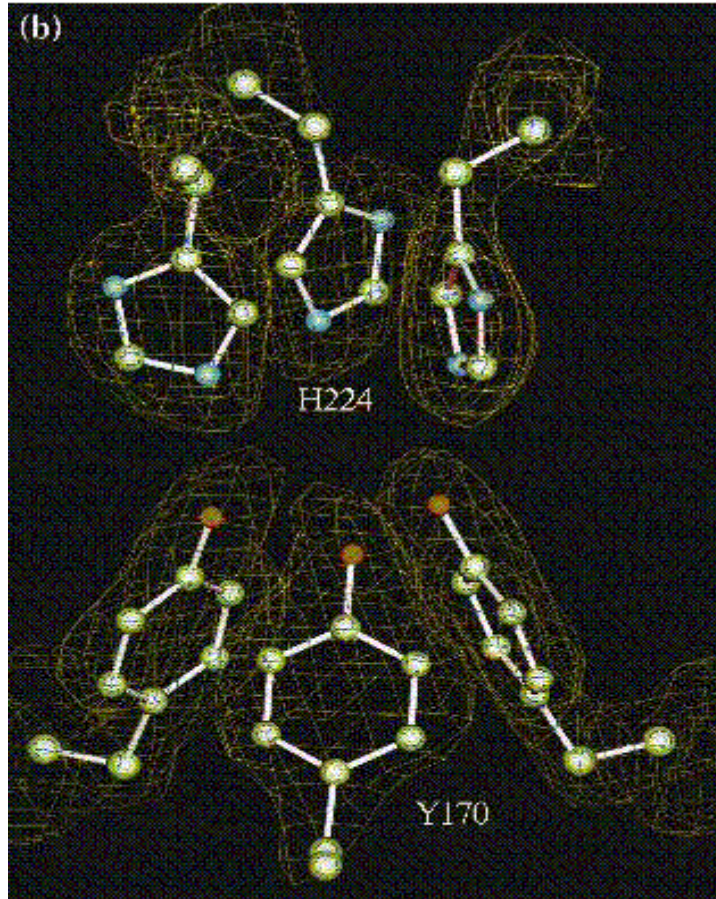


Kuva 4. CD40L –homotrimeeri, CD40 ligandin biologisesti toiminnallinen muoto. Kuva: PDB Structure Explorer. Kuvassa vihreät β -levyt, jotka ovat kontaktissa muiden monomeerien kanssa, vastaavat kuvan 2 β -levy A:ta

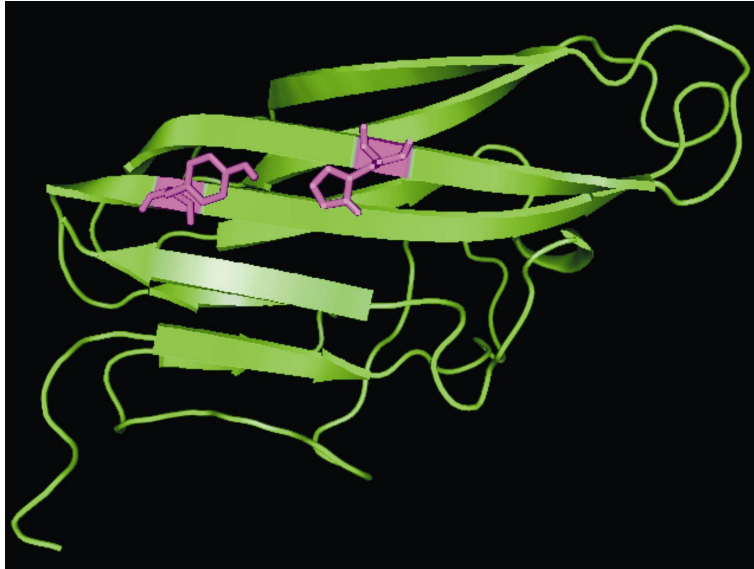
CD40L-monomeerien trimerisaatio (Kuva 4) tapahtuu jokaisen monomeerin tyrosiini 170:n ja histidiini 224:n välityksellä, jotka muodostavat kahden aminohappotriadin klusterin pyramidin muotoisen trimeerin kolminkertaisen symmetria-akselin suuntaisesti (Kuva 5). Trimeerin symmetria-akseli kulkee lähes samansuuntaisesti kunkin monomeerin β -säikeiden kanssa (*Karpusas ym., 1995*). Trimerisoinnissa olennaiset aminohapot Y170 ja H224 on visualisoitu CD40L -monomeeriin kuvassa 6.

Triadin muodostavien suorassa kontaktissa toisiinsa olevien aminohappojen lisäksi monilla ympäristön aminohapoilla on tärkeä osa kompleksin stabiloinnissa. Trimeeriä stabiloivia aminohappoja ovat Q121, H125, Y145, T147, Y172, Q174, L195, R203, L205, L206, R207, A208, A209, N210, T211, A215, G219, Q220, Q221, S222, L225,

G226, G227, V228, F229, E230, T251, G252, F253, L259 ja L261 (Bader *ym.*, 2003; Karpusas *ym.*, 2001). Suurin osa trimerisoitumiseen osallistuvista aminohapoissa sijaitsee β -levy A:ssa.



Kuva 5. Kolmen tyrosiinin ja kolmen histidiini klusteri, joka muodostuu CD40L-trimeerin keskiosaan. Symmetria-akseli on kuvassa vertikaalinen. Kuva: Karpusas *ym.*, 1995.



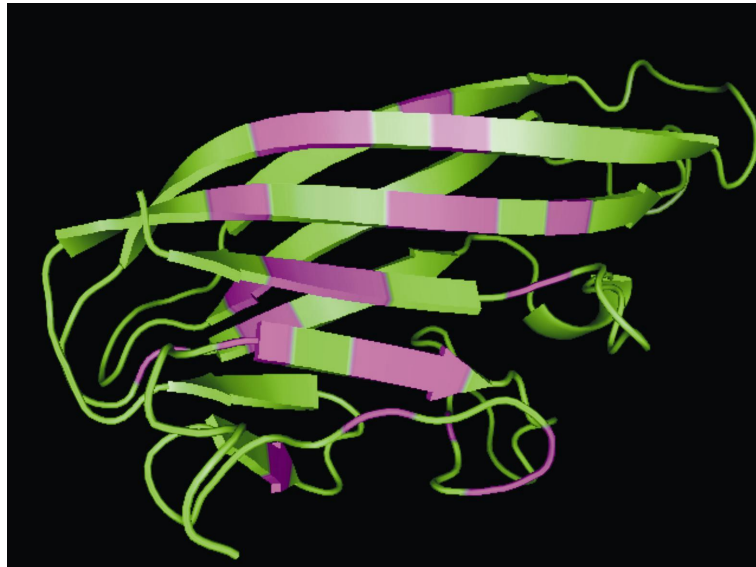
Kuva 6. Trimerisaatiossa olennaiset aminohapot Y170 ja H224 CD40L:ssa. Y170 sijaitsee säikeessä A3 ja H224 säikeessä A4.

2.3.2. Geeni ja polymorfiat

CD40 ligandin 12,18 kiloemäksen pituinen geeni sijaitsee X-kromosomissa, q-käsivarren proksimaalisella alueella (Xq26.3-27.1) (Aruffo *ym.*, 1993). Lokuksen paikka on DXS144E:n ja DXS300:n välissä, ja geenin transkriptio tapahtuu suunnassa 5' sentromeerinen – 3' telomeerinen (Pilia *ym.*, 1994). Transkription aloituskohdan oletetaan sijaitsevan 67kb ylävirtaan translaation aloituskodonista (ATG) (Tsitsikov *ym.*, 1994). Geenissä on viisi eksonia ja neljä intronia (Tsitsikov *ym.*, 1994; Seyama *ym.*, 1996). Geeni ohjaa 2,3 kiloemäksen lähetti-RNA:n transkriptiota, ja lähetti-RNA transloidaan 261 aminohapon pituiseksi polypeptidiksi (Schönbeck & Libby, 2000).

Ensimmäinen eksoni käsittää CD40L:n intrasellulaari- ja transmembraaniosan sekä ekstrasellulaarisen uniikin osan (ECU) kuusi ensimmäistä aminohappoa. Seuraavat kaksi eksonia sisältävät informaation ECU-domeenin loppuosasta sekä 13:sta TNF-homologiadomeenin aminohaposta, ja eksoni 4 koodaa C-terminaaliosan 125 aminohappoa, eli lähes koko TNF-homologiadomeenin (Villa *ym.*, 1994).

CD40 ligandin geenistä on löydetty 106 erilaista XHIGM:n aiheuttavaa mutaatiota (CD40Lbase, <http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase>). Mutaatioista 34 sijaitsee introneissa muuttaen todennäköisesti transkriptin silmikointia ja siten aiheuttaen puutteellisen transkriptin ja ekspresion estymisen tai viallisen proteiinin ekspresion. Kaikista introneista on löydetty mutaatioita, mutta enemmistö niistä on keskittynyt introni 3:een, jossa on 18 mutaatiota. Eksoneissa mutaatioita on 72, joista 30 on missense-mutaatioita, eli aminohapon toiseksi proteiinin sekvenssissä muuttavia mutaatioita. Loput 42 mutaatiota ovat insertioita, deleetioita ja nonsense-mutaatioita, eli pysähdyskodonin aiheuttavia ja transkription pysäyttäviä mutaatioita. Eksonimutaatioita on koko sekvenssin alueella, mutta niistä suurin osa sijaitsee TNF-homologiadomeenin alueella. Enemmistö CD40L:n substituutiomutaatioista sijaitsee β -säikeissä (Kuva 7; taulukko 1).



Kuva 7. *Substituutiomutaatioiden sijainnit CD40L:n TNF-homologiadomeenissa. Aminohappojen, joissa on todettu olevan XHIGM:n aiheuttavia mutaatioita, sijainnit on merkitty kuvaan punaisella.*

SNP:t (single nucleotide polymorphism) ovat normaaleja DNA-sekvenssin variaatioita, joissa yksittäinen nukleotidi on muuttunut toiseksi (*The SNP Consortium Ltd, <http://snp.cshl.org/>*). Polymorfiat eivät aiheuta sairausfenotyyppiä. CD40 ligandin geenissä tunnetaan 34 SNP:a, joista suurin osa (28) sijaitsee introneissa. Kaksi SNP:a sijaitsee geenin ei-transloidulla alueella, ja neljä eksoneissa. Eksoneiden SNP:eista vain yksi aiheuttaa aminohapon substituution (P181R), ja muut kolme ovat hiljaisia, sillä yhden nukleotidin muutos ei näissä tapauksissa muuta kodonia siten, että se aiheuttaisi translaatiossa erilaisen aminohapon lisäämisen polypeptidiin (*dbSNP -tietokanta, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>*).

SNP:ien suhde mutaatioiden kokonaismäärään on yleensä $\leq 0,68-0,74$ (*Chasman & Adams, 2001*), ja CD40L:n kohdalla suhde on 0,32. CD40L:ssa tunnetaan siis suhteellisen vähän sellaisia polymorfioita, jotka eivät aiheuta sairausfenotyyppiä.

Mutaatio	Domeeni	Sijainti
M36R	TM	-
G38R	TM	-
G116R	ECU	-
A123E	TNFH	β A1
H125R	TNFH	β A1
V126A	TNFH	β A1
V126D	TNFH	β A1
W140R	TNFH	A1-B1
W140G	TNFH	A1-B1
W140C	TNFH	A1-B1
K143T	TNFH	A1-B1
G144E	TNFH	A1-B1
T147N	TNFH	A1-B1
L155P	TNFH	β B1
Y170C	TNFH	β A3
A173D	TNFH	β A3
Q174R	TNFH	β A3
T176I	TNFH	β A3
L195P	TNFH	β C2
A208D	TNFH	β C3
H224Y	TNFH	β A4
G226A	TNFH	β A4
G227V	TNFH	β A4
L231S	TNFH	β A4
A235P	TNFH	A4-C1
V237E	TNFH	β C1
T254M	TNFH	C1-A2
G257S	TNFH	β A2
G257D	TNFH	β A2
L258S	TNFH	β A2

Taulukko 1. Substituutiomutaatiot CD40L:ssa ja niiden sijainnit. β -säikeet ja silmukat on nimetty kuten kuvassa 2. TM – transmembraanidomeeni; ECU – ekstrasellulaarinen uniikki domeeni; TNFH – TNF –homologiadomeeni.

2.3.3. Geenin ekspression säätely

CD40L -geeniä ilmentetään sekä CD4- että CD8 -positiivisissa T-lymfosyyteissä, mutta ei B-soluissa tai monosyyteissä (*Gauchat ym., 1993*). Lisäksi verihitaleet tuottavat liukoista CD40 ligandia (*Hollenbaugh ym., 1992*). Geenin ekspression säätelymekanismit ovat vielä enimmäkseen tuntemattomia, mutta säätelyn tiedetään olevan riippuvainen proteiinikinaasi C:n aktivaatiosta ja solunsisäisen Ca^{2+} -konsentraation kasvusta (*Fuleihan ym., 1994*). Koska CD40 ligandi voi ilmentyä T-solun solukalvolle jo viiden minuutin kuluttua aktivaation jälkeen, solu kykenee aktivoituttuaan siirtämään aiemmin syntesoidun CD40L:n solukalvolleen (*Casamayor-Palleja ym., 1995*). Ekspressio on väliaikaista; se on korkeimmillaan noin kuusi tuntia T-solun aktivoitumisen jälkeen ja vähenee seuraavien 12-24 tunnin aikana (*Roy ym., 1993; Castle ym 1993*).

Syklosporiini A (CsA) ja CsA-analogit inhiboivat CD40L:n ekspressiota. Koska CsA-analogien tiedetään inhiboivan kalsineuriiniin (joka on kalsiumista/kalmoduliinista riippuva seriini/treoniinifosfataasi) fosfataasiaktiivisuutta, voidaan päätellä kalsineuriiniin liittyvän CD40L:n geenin aktivointiin. CsA estää myös CD40L-riippuvaisen immunoglobuliinien luokkavaihdoksen, mikä tukee oletusta kalsineuriiniin mukanaolosta CD40L:n geenin aktivaatiossa (*Fuleihan ym., 1994*). Lisäksi Tsytsykova ym. ovat osoittaneet, että NM-kompleksien (NF-AT-sitoutumiskohtiin sitoutuvat kompleksit) sitoutuminen promoottoriin estyy CsA:n vaikutuksesta, ja että Ca^{2+} :n mobilisaatio ja siitä seuraava kalsineuriiniin aktivaatio aikaansaavat NM-kompleksien muodostumisen (*Tsytsykova ym., 1996*).

DNA-sekvenssissä CD40 ligandin geenin 5'-päästä ylävirtaan sijaitsee useita säätelyelementtejä, kuten TATA-box, Sp1-box (*Tsitsikov ym., 1994*) ja neljä NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells) -sitoutumiskohtaa. NF-AT -transkriptiofarktorit sitoutuvat säätelyalueelle, ja ne yhdessä AP1-proteiinien (transkriptiofaktoreita, jotka muodostuvat c-Jun/c-Fos-dimeereistä) kanssa muodostavat aktiivisen transkriptiokompleksin (*Tsytsykova ym., 1996*). Geenin 5'-säätelyalueen on kuitenkin todettu olevan heikko promoottori, mikä viittaa muiden transkriptiotehokkuuteen vaikuttavien alueiden olemassaoloon (*Schubert ym., 2001*).

2.3.4. Mutaatioiden vaikutus CD40 ligandin toimintaan

Erilaiset mutaatiot voivat vaikuttaa proteiinin toimintaan monin tavoin. Varhaiset pysäytyskodonit sekvenssissä aiheuttavat lyhyen transkriptin, jota ei välttämättä translaoida lainkaan. Myöhemmät pysäytyskodonit aiheuttavat liian lyhyen polypeptidin translaation, ja proteiini ei lokalisoitu solukalvolle tai ei pysty sitoutumaan CD40 reseptoriin. Myös deleetiot voivat aiheuttaa liian lyhyen polypeptidin tuoton, muuttaa lukukehystä tai poistaa proteiinituotteesta laskostumisen tai rakenteen ja toiminnan kannalta olennaisia aminohappoja. Insertiot aiheuttavat lukukehysten muutoksia ja sitä kautta vaikuttavat monin tavoin transkriptin ominaisuuksiin. Intronien pistemutaatiot vaikuttavat usein lähetti-RNA:n silmikoimiseen, samoin kuin eksonien ensimmäisten ja viimeisten kodonien pistemutaatiot.

Eksonien substituutiomutaatioiden vaikutukset proteiinin rakenteeseen ja toimintaan ovat moninaisia. Ne voivat olla rakenteellisia mutaatioita, jolloin proteiinin oikea

laskostuminen häiriintyy tai rakenne muuttuu siten, että proteiinin toiminnallisuus vähenee tai estyy. Pääsääntöisesti oikein laskostuneen ja ilmentyvän proteiinin toiminta voi estyä tai heikentyä proteiinin toiminnan kannalta olennaisten aminohappojen, kuten proteiini-proteiini-interaktioihin osallistuvien ja entsyymien kohdalla aktiivisen kohdan aminohappojen orientaation muutoksien johdosta. Funktionaalisten aminohappojen läheisyydessä olevien aminohappojen mutaatiot voivat muuttaa rakennetta paikallisesti, jolloin spesifiset interaktiot saattavat estyä, vaikka suoriin kontakteihin osallistuvat aminohapot eivät olisikaan mutatoituneita. Rakenteen paikallinen muuttuminen voi johtua mutatoitujen sivuketjujen fyysisestä sopimattomuudesta rakenteeseen (erityisesti tapauksissa, joissa mutaatio tuottaa huomattavasti alkuperäistä suuremman tai pienemmän aminohapon), aminohappojen keskinäisten interaktioiden muuttumisesta (kun aminohapon fysikokemialliset ominaisuudet, kuten varaus tai kyky muodostaa vetysidoksia tai muita interaktioita, muuttuvat) tai pääketjun orientaation muutoksista, johon vaikuttavat edellä mainittujen muutosten lisäksi mutaatiot, joissa alkuperäinen aminohappo korvautuu proliinilla. Proliinin sivuketju muodostaa rengasrakenteen yhtyen pääketjuun, jolloin pääketjun orientaatio muuttuu.

Rakenteelliset mutaatiot voivat aiheuttaa myös rakenteen stabiilisuuden vähenemistä, ja väärin laskostuneet tai laskostumattomat proteiinit ovat herkempiä hajoamaan (solun proteolyttisten hajotusmekanismien toimesta) ja aggregoitumaan kuin funktionaaliset proteiinit (*Bross ym., 1999*). Laskostuessaan proteiinit käyvät asteittain läpi erilaisia konformaatioita laskostumattomasta muodosta useiden eri energiatilojen konformaatioiden kautta lopulliseen, funktionaaliseen konformaatioonsa (*Dill & Chan, 1997*). Laskostumistaipumus on polypeptidin itseisominaisuus, jota mutaatiot voivat häiritä. Mutanttipolypeptidillä voi kulua laskostumiseen enemmän aikaa kuin villityypin vastaavalla polypeptidillä, jolloin välivaiheen konformaatiot ovat kauemman aikaa alttiina solunsisäisille proteaaseille. Mutaatiot voivat myös muuttaa vuorovaikutuksia funktionaalisessa konformaatioissa siten, että proteiinin vapaa energia jää suureksi. Tällöin proteiinin laskoksilla on suurempi todennäköisyys purkautua (*Bross ym., 1999*).

Perinteisesti konformaationaalisiksi sairauksiksi on määritelty sellaiset sairaudet, joissa mutaatiot aiheuttavat proteiinien aggregoitumista laskostumisprosessin häiriöiden vuoksi (*Carrell & Lomas, 1997*). Uuden määritelmän mukaan sairauksia, joiden taustalla on proteiinien laskostumisprosessin häiriö - aiheuttipa väärä laskostuminen aggregoitumista tai ei - kutsutaan konformaationaalisiksi sairauksiksi (*Beissinger & Buchner, 1998*). Jos jotkin CD40 ligandin mutaatiot vaikuttavat proteiinin laskostumis- ja aggregoitumisominaisuuksiin olennaisessa määrin, XHIGM voidaan niiden mutaatioiden kohdalla luokitella konformaationaalisiksi sairauksiksi. Koska proteiinien laskostumismekanismia ja aminohapposekvenssin vaikutuksia niihin ei kuitenkaan yksityiskohtaisesti tunneta, on vaikeaa ennustaa tai arvioida tietyn mutaation vaikutusta polypeptidin laskostumiseen (*Bross ym., 1999*).

Toiminnalliset mutaatiot ovat (CD40L:ssa) sellaisia eksonien missense-mutaatioita, jotka estävät tai heikentävät spesifisten kontaktien tapahtumista proteiini-proteiini-interaktioissa joko muuttamalla proteiinin sitoutumispaikan rakennetta ja ominaisuuksia tai muuttamalla ligandin ja reseptorin välisessä interaktiossa suorassa kontaktissa olevia aminohappoja. Toiminnallisten mutaatioiden osuus geneettisissä sairauksissa on yleensä ottaen pienempi kuin rakenteellisten mutaatioiden (*Wang & Moulton, 2001*).

2.3.5. Aiemmat tutkimukset liittyen CD40L:n mutaatioiden vaikutuksiin

CD40L:n mutaatioiden vaikutuksia proteiinin ekspressioon ja toimintaan on tutkittu biokemiallisin menetelmin sekä kokeellisesti määritettyyn rakenteeseen perustuen, mutta laajaa substituutiomutaatioiden analyysiä, joka ottaisi huomioon useampia näkökulmia, ei ole tehty. Myöskään kaikkia nykyään tiedossa olevia CD40L:n substituutiomutaatioita ei ole analysoitu.

Karpusas ym. analysoivat muutamien mutaatioiden rakenteellisia vaikutuksia CD40L:n kiderakenteen julkaisemisen yhteydessä (*Karpusas ym., 1995; Karpusas ym., 2001*). Garber ym. ovat tutkineet kymmenen eri substituutiomutaation vaikutuksia CD40L:n trimerisoitumiseen sekä ekspressoitumiseen solun pinnalla biokemiallisin menetelmin (*Garber ym., 1999*). Bajorath ym. selvittivät kohdennetun mutageneesin jälkeen sitoutumiskokein, mitkä aminohapot ovat olennaisia CD40L-CD40 -kompleksin muodostumisessa (*Bajorath ym., 1997*). Ligandi-reseptori –interaktiota ja polaaristen aminohappojen merkitystä sitoutumisessa tutkivat myös kohdennetulla mutageneesillä Singh ym. (*Singh ym., 1998*). XHIGM:lle on myös kehitetty eläinmalli (*Xu ym., 1994*).

3. Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää hyper-IgM-syndroomaa aiheuttavien CD40 ligandin substituutiomutaatioiden vaikutuksia proteiinin rakenteeseen ja toimintaan sekä tutkia CD40L:n sekvenssin konservoituneisuutta. Näillä keinoin hyper-IgM-syndrooman fenotyypille pyrittiin saamaan molekulaarinen perusta. Tavoitteena oli myös tutkia erilaisten ohjelmien soveltuvuutta mutaatioiden vaikutusten tukimiseen. Lisäksi tutkimukseen liittyi CD40Lbase-mutaatitietokannan (<http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>) päivittäminen uusilla mutaatioilla, ja polymorfioiden (SNP) lisääminen tietokantaan.

4. Menetelmät

4.1. Sekvenssianalyysi

Sekvenssianalyysissä tutkittiin CD40 ligandin ominaisuuksia proteiinin aminohapposekvenssin eli primaarirakenteen perusteella. Tutkittavia ominaisuuksia olivat sekvenssin evolutiivinen konservoituneisuus, sekvenssin muutosten (substituutiomutaatioiden) vaikutus proteiinin sekundaarirakenteisiin, mutaatioiden vaikutus proteiinin järjestyneeseen laskostumiseen ja proteiinin aggregoitumistaipumuksen muutokset sekvenssin muuttumisen myötä.

4.1.1. Aminohapposekvenssit

CD40 ligandin aminohapposekvenssi ja tiedossa olevat mutaatiot saatiin CD40L-tietokannasta (<http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>). Tietokantaan on listattu kaikki tunnetut CD40L:n XHIGM:n aiheuttavat mutaatiot, ja lisäksi sinne kerätään tietoa potilaiden kliinisestä taudinkuvasta, immunologisesta fenotyypistä, taudin ennusteesta ja hoidon tehokkuudesta (Notarangelo ym., 1996).

Homologisekvenssit haettiin PSIBLAST -ohjelmalla (Position Specific Iterated BLAST), joka vertaa annettua sekvenssiä tietokantojen sekvensseihin ja etsii samankaltaisia sekvenssejä (Altschul ym., 1997). Kynnysarvona käytettiin ohjelman tarjoamaa oletusasetusta $E = 0,005$, jolla ohjelma löysi yhteensä n samankaltaista sekvenssiä. Otoksessa useaan kertaan toistuvat sekvenssit poistettiin, jolloin jäljelle jäi 33 sekvenssiä koko CD40L:n aminohapposekvenssillä haettuna.

TNF-domeenin aminohapposekvenssille haettiin Pfam-tietokannasta (Bateman ym., 2004) seed-rinnastuksella 52 homologisekvenssiä sekvenssirinnastuksia varten ja full-rinnastuksella 175 homologisekvenssiä ProCon -ohjelmaa (Shen & Vihinen, 2004) varten. Pfam on proteiiniperhetietokanta, jossa proteiinit on jaoteltu sekvenssien perusteella perheisiin. Tietokanta sisältää sekvenssirinnastuksia kullekin perheelle, joiden perusteella luodulla kätkeyllä Markovin mallilla (HMM) voidaan verrata muita sekvenssejä perheen sekvensseihin, ja luokitella sekvenssejä tiettyihin perheisiin kuuluviksi.

Sekvenssirinnastukset tehtiin ClustalW-ohjelmalla (Thompson ym., 1994) käyttäen oletusparametrejä (Avatutuvan aukon rangaistus 10,0; aukon laajenemisen rangaistus 0,2; Proteiinimatriisi: Gonnet). Sekvenssirinnastukset visualisoitiin käyttämällä MultiDisp-ohjelmaa (Riikonen & Vihinen, 2004) konservoituneisuuden havaitsemiseksi. Ohjelman avulla saatiin myös tietoa sekvenssien erovaisuusasteesta sekä varauksen ja hydrofobisuuden jakaumista sekvenssirinnastuksessa.

4.1.2. Konservoituneisuus

Useat tutkimusryhmät ovat osoittaneet, että evolutiivisesti konservoituneet ja fysikokemialliset ominaisuutensa säilyttäneet aminohapot ovat systemaattisesti hyvin herkkiä mutaatioille (*Poteete ym., 1992; Markiewicz ym., 1994; Suckow ym., 1996*). Toisin sanoen konservoituneiden aminohappojen mutaatiot aiheuttavat useimmiten haitallisia seurauksia proteiinin rakenteelle ja toiminnalle.

Sekvenssien evolutiivista konsevoituneisuutta tutkittiin sekvenssirinnastusten visualisointien lisäksi ProCon-ohjelmalla, jonka toiminta perustuu sekvenssin aminohappojen mutuaali-informaatio- (tyypin III konservoituneisuus) ja entropialaskentaan (tyypin I ja II konservoituneisuus) sekä visualisointiin (*Shen & Vihinen, 2004*). Entropialaskennan tarkoituksena oli mitata aminohappojakauman diversiteettiä sekvenssirinnastuksessa konservoituneisuuden havaitsemiseksi. Mutuaali-informaatiolaskennalla määritettiin aminohappojen positionaalista konservoituneisuutta. Entropialaskennassa käytettiin oletusparametrejä, jolloin $p_1 = 0,01$ ja $p_2 = 0,05$. Mutuaali-informaation laskemista varten p-arvoja muutettiin pienemmiksi järkevän tulossarjan saamiseksi, jolloin $p_1 = 0,005$ ja $p_2 = 0,020$.

Kolmantena menetelmänä (tyypin 1) konservoituneisuuden lokalisoimiseen ja visualisoimiseen käytettiin ConSeq-palvelinta (*Berezin ym, 2004*). Ohjelma hakee automaattisesti annetulle sekvenssille homologisekvenssejä, ja rinnastaa ne. Ohjelma laskee substituutifrekvenssin jokaiselle aminohapolle sekvenssirinnastuksessa ottaen huomioon homologisekvenssien väliset evolutiiviset suhteet. Lisäksi palvelin ennustaa aminohappojen sijainnin proteiinissa (rakenteen pinnalla tai sisällä) neuroverkko-ohjelmalla (*Berezin ym, 2004*).

4.1.3. Mutaatioiden vaikutus sekundaarirakenteisiin

Sekvenssin muutosten vaikutusta proteiinin sekundaarirakenteisiin tutkittiin ajamalla kaikki mutaatiosekvenssit ja villityypin aminohapposekvenssi yksitellen PSIPRED- (*Jones, 1999; McGuffin, ym., 2000*) ja Jpred -ohjelmilla (*Cuff ym., 1998*). Eri mutaatiosekvenssien tuottamia ennustuksia verrattiin villityypin ennustettuun sekundaarirakenteeseen.

Kumpikin ohjelma ennustaa proteiinin sekundaarirakenteet aminohapposekvenssin perusteella. PSIPRED hakee annetulle sekvenssille homologisekvenssejä PSIBLAST-ohjelmalla ja käyttää sekundaarirakenteen ennustamiseen kahta hermoverkkoa (*Cuff & Barton, 2000; Cuff ym, 1998*). Jpred toimii samankaltaisesti tuottaen ensin sekvenssirinnastuksen, jonka perusteella kaksitasoinen hermoverkko ennustaa aminohapposekvenssille sekundaarirakenteen (*Jones, 1999*).

4.1.4. Mutaatioiden vaikutus proteiinirakenteen epäjärjestyneisyyteen

Proteiinirakenteen epäjärjestyneisyydellä tarkoitetaan säännöllisen sekundaarirakenteen puutetta ja polypeptidiketjun hyvin suurta rakenteellista joustavuutta (*Wright & Dyson, 1999*). Epäjärjestyneisyydellä on merkitystä, sillä epäjärjestyneet alueet saattavat

aiheuttaa ongelmia proteiinin ekspressiossa (*Linding ym, 2003^(a)*), ja proteiineissa, jotka ohjautuvat solussa nopeasti hajotettavaksi, on yleensä epäjärjestyneitä alueita (*Wright & Dyson, 1999*). Proteiimirakenteen epäjärjestyneisyydellä on tärkeä osa sairauksien biologiassa, joka ilmenee proteiinien väärin laskostumisena ja aggregoitumisena (*Linding ym, 2003^(b), Ramos & Ferreira, 2005*). Jos siis jokin mutaatio CD40 ligandissa aiheuttaisi merkittävää rakenteen epäjärjestymisen lisääntymistä, siitä seuraava proteiinin ekspression väheneminen voisi selittää mutaation vaikutusta XHIGM-fenotyypin.

Epäjärjestyneille polypeptidiketjun alueille on tyypillistä aminohapposekvenssin yksipuolisuus - aminohappokoostumus on vinoutunut siten, että etenkin aromaattisia aminohappoja on sekvenssissä ylenmäärin. Myös aminohappojen ominaisuuksista johtuva polypeptidin lisääntynyt taipuisuus on epäjärjestyneille alueille tavallista (*Romero ym., 1997; Dunker ym., 2002*). Mutaatioiden vaikutusta proteiimirakenteen epäjärjestyneisyyteen tutkittiin jokaisen mutaatiosekvenssin osalta erikseen seuraavilla ohjelmilla: DisEMBL (*Linding ym, 2003⁽¹⁾*), Disopred (*Ward ym., 2004*), Globplot (*Linding ym., 2003⁽²⁾*) ja PONDR (*Romero ym., 1997; Li ym., 1999; Romero ym., 2001*).

DisEMBL käyttää epäjärjestyneisyyden eri tasojen ennustamiseen kehitettyä hermoverkkoa. Ohjelma ennustaa ja esittää todennäköisyyden aminohapposekvenssin osien epäjärjestymiselle. Koska epäjärjestyneisyydelle ei ole yksittäistä määritelmää, ohjelman tekijät ovat todennäköisyyslaskentaa varten määritelleet epäjärjestyneisyyden kolmeen tasoon: silmukat, korkean liikkuvuusasteen silmukat ("hot loops"), eli korkean B-faktorin silmukat, ja kiderakenteesta puuttuvien koordinaattien alueet. Kullekin epäjärjestyneisyyttä kuvaavalle ryhmälle haettiin datasarja, ja kolme datasarjaa jaettiin aluksi viidelle neuroverkolle. Käytävissä olevassa ohjelmassa epäjärjestyneisyyden ennustaminen tapahtuu kolmella neuroverkolla (*Linding ym, 2003^(a)*).

Globplot ennustaa rakenteen epäjärjestyneisyyttä jokaiselle aminohapolle erikseen asetetun Russell/Linding -epäjärjestyneisyystaipumusarvon (P) perusteella, joita ohjelmassa on seitsemän erilaista (*Linding ym., 2003^(b)*).

PONDR:n osalta tässä tutkimuksessa käytettiin ohjelmistopakettia VL-XT -ennustusohjelmaa, jossa yhdistyvät kolme neuroverkkoa: VL1, jonka ovat kehittäneet Romero ym. (*Romero ym., 2001*), sekä XT, joka sisältää C- ja N-terminaaliosien epäjärjestyneisyyttä ennustavat neuroverkot (*Li ym., 1999*). Kaikki neuroverkot ennustavat epäjärjestyneisyyttä rakenteellisen tiedon perusteella, sillä ne on opetettu puuttuvien elektronitiheysalueiden tunnistamiseen joko röntgensädekristallografisella tai NMR-datalla (*Romero ym., 1997; Li ym., 1999; Romero ym., 2001*).

Disopred-ohjelman neuroverkko on opetettu tunnistamaan proteiimirakenteen epäjärjestyneisyyttä röntgensädekristallografiadatasta puuttuvien koordinaattien perusteella, samalla tavoin kuin PONDR (*Ward ym., 2004*).

4.1.5. Mutaatioiden vaikutus proteiinin β -aggregaatiotaipumukseen

Aggregoitumisen uskotaan olevan proteiineille yleinen polypeptidiketjun ominaisuus, joka ei ole riippuvainen spesifisestä aminohapposekvenssistä. Aggregaattien toksiset vaikutukset johtuvat yleisistä rakenteellisista ominaisuuksista erityisten aminohapposivuketjujen järjestymisen sijaan. Näiden havaintojen perusteella on esitetty

hypoteeseja, että mikä tahansa polypeptidi voi aggregoitua sopivien, epästabiloivien olosuhteiden vallitessa. Näin ollen proteiinien evoluutiossa oletetaan tapahtuneen negatiivista selektiota sellaisia sekvenssejä vastaan, joilla on suuri aggregoitumistaipumus (Stefani, 2004). Substituutiomutaatiot aminohapposekvenssissä saattavat aiheuttaa polypeptidin aggregoitumistaipumuksen lisääntymistä. Hyvin tunnettujen amyloidoosien (kuten Alzheimerin ja Parkinsonin taudit) lisäksi on muita proteiinien väärin laskostumiseen ja aggregoitumiseen liittyviä sairauksia.

Aggregoituminen saa alkunsa rakennetta epävakauttavista mutaatioista, jotka lisäävät β -rakenteen muodostumistaipumusta. Ylimääräiset β -säikeet voivat sijoittaa itsensä toisiin, identtisiin molekyyliin. Näiden rakenteellisten modifikaatioiden edetessä syntyy solunsisäisiä proteiinipolymeerejä, jotka ovat solun toiminnalle haitallisia yhtäältä alkuperäisen proteiinin toiminnallisuuden puutteen, toisaalta proteiiniaggregaattien sytotoksisuuden vuoksi. Useimmiten solunsisäiset viallisten proteiinien poistomekansimit kykenevät estämään varsinaisten aggregaattien kerääntymisen soluun aggregaattiprekursoreita poistamalla. Tällöin aggregoituva proteiini ei pääse toteuttamaan biologista rooliaan, mikä johtaa sairausfenotyypin ilmenemiseen. Monissa molekyylylasolla perustaltaan tuntemattomissa sairauksissa sairausfenotyypin aiheuttajana voi olla aggregaatteja muodostava, viallinen proteiini (Stefani, 2004).

Mutaatiosekvenssien aggregaatiotaipumusta tutkittiin TANGO -ohjelmalla (Fernandez-Escamilla ym., 2004; Linding ym., 2004). Proteiinien aggregaatiotaipumusta pystytään ennustamaan, sillä aggregoituminen alkaa sellaisissa aminohapposekvensseissä, joilla on tietynlaiset fysikokemialliset ominaisuudet liittyen sekundaarirakenteen muodostamiseen, hydrofobisuuteen ja varaukseen (Linding ym., 2004).

TANGO-ohjelma analysoi tilastollisesti aminohappojen fysikokemiallisia ominaisuuksia ja niiden taipumusta muodostaa β -säikeitä. Lisäoletuksena laskennassa on, että aggregaatin ydinalueet ovat täysin rakenteen sisällä siten, että ne eivät ole lainkaan kosketuksissa liuottimen kanssa. Ohjelma mallintaa proteiinin määrittäen kunkin aminohapon johonkin neljästä eri tilasta: laskostumaton, kierteinen, käännöksen muodostava tai aggregoitunut, ja laskee systeemille jakaumafunktion. Kullekin aminohapolle haetaan tilastollinen painoarvo PDB:stä perustuen eri tilojen todennäköisyyteen (Pande, 2004). TANGO pystyy myös erottamaan β -säikeen muodostustaipumuksen aggregoitumistaipumuksesta (Fernandez-Escamilla ym., 2004).

4.2. Rakenneanalyysi

Analyysin tarkoituksena oli selvittää CD40L:n rakenteellisia ominaisuuksia ja tutkia mutaatioiden vaikutuksia niihin. Tutkittavia mutaatioiden vaikutuksia olivat muuttuneen aminohapon kyky mahtua rakenteeseen, aminohappojen välisten kemiallisten kontaktien muuttuminen mutaation myötä sekä proteiinin elektrostaattisen pintapotentialin muutokset aminohapon muuttuessa. Rakenneanalyysiin kuului myös reseptoriin sitoumisen ja trimerisoitumisen kannalta olennaisten aminohappojen selvittäminen kirjallisuudesta.

4.2.1. Kiderakenne

Ihmisen CD40 ligandin kolmiulotteinen rakenne on osittain (aminohapot 116-261) määritetty röntgensädekristallografialla 2Å tarkkuudella (*Karpusas ym., 1995*). Rakenteen koordinaatit haettiin PDB:sta (Protein Data Bank) (*Berman ym., 2000*). Ihmisen CD40L:n PDB-tunniste on 1ALY.

4.2.2. Rotameerianalyysi

Rotameerianalyysiä käytettiin mutaatioaminohapon sovittamiseksi rakenteeseen parhaalla mahdollisella tavalla, ja jotta voitaisiin selvittää, voiko mutatoitunut aminohappo mahtua rakenteeseen aiheuttamatta suuria konformaationaalisia rasitteita tai muutoksia.

PDB-rakenne visualisoitiin ja mutaatiot tehtiin rakenteeseen PyMOL-ohjelmalla (*DeLano, 2002*). Rakenteisiin lisättiin vedyt Reduce-ohjelmalla (*Word ym., 1999b*), joka myös optimoi rotatoitavien, polaaristen vetyatomien sijainnit paikallisten vetysidosverkostojen perusteella. Mutatoitujen aminohappojen sivuketjujen χ -kulmat rotatoitiin 10 asteen välein PROBE:n Autobondrot-ohjelmalla (*Word ym., 1999a; Word ym., 2000*). PROBE laskee jokaiselle konformaatiolle kontaktipinta-alat sivuketjun ja läheisten atomien välille, ja ilmoittaa vetysidoksiin, van der Waals -vuorovaikutuksiin ja päällekkäisyyksiin (kahden atomin etäisyys alle 5 Å) perustuvan numeerisen arvon kullekin sivuketjun konformaatiolle (PROBE-pisteytys). Kaikkien atomikontaktien analyysi PROBE:ssa kuvaa pintojen komplementaarisuutta, ja PROBE-pisteytyksen kasvaessa pakkautuminen paranee. Parhaat rotameerit valittiin PROBE-pisteytyksen perusteella, ja niitä käytettiin mutaatioaminohappojen malleina jatkoanalyysissä.

Mutaatorakenteet verifioitiin MolProbity-web-palvelimella (*Richardson Laboratory, Duke University <http://kinemage.biochem.duke.edu/>*), jolla myös muutettiin PDB-muodossa olleet mutaatorakenteet Kinemage-muotoon. MolProbity lisää kinemage-koordinaatteihin myös kaikki atomikontaktit, ja kääntää asparagiinien ja glutamiinien sivuketjut tarvittaessa. Sivuketjuja joudutaan joskus kääntämään, sillä hiilen, typen ja hapen elektronitiheydet ovat hyvin samanlaiset ja vaikea erottaa toisistaan kristallografiassa. Niinpä em. aminohappojen NH₂- ja O-ryhmät saattavat olla rakenteessa väärin päin (*Word ym., 1999b*). Rakenteet visualisoitiin uudelleen King -ohjelmalla (*Richardson Laboratory, Duke University <http://kinemage.biochem.duke.edu/>*),

jolla saatiin näkyviin atomien kontaktit ja törmäykset. Valmiiden mutaatorakenteiden visualisoimiseen käytettiin PyMol-ohjelmaa (DeLano, 2002).

4.2.3. Aminohappojen kontaktianalyysi

Kaikki atomikontaktit ovat tärkeitä proteiinin oikean laskostumisen, yksityiskohtaisen rakenteen ja toiminnan sekä rakenteen stabiilisuuden kannalta, ja niiden muuttuminen mutaation myötä saattaa aiheuttaa olennaisia muutoksia proteiinin toimintaan. Liuospinta-alat kertovat aminohapon sijainnista proteiinimolekyylissä ja antavat myös osviittaa sen roolista proteiinin toiminnassa (hyvin vähän tai ei lainkaan liuottimen kanssa kosketuksissa olevat aminohapot ovat useimmiten olennaisia hydrofobisen ytimen ja siten koko molekyylin stabiilisuuden kannalta). Analysoimalla kontaktien lujutta voidaan paikallistaa rakenteen tai toiminnan kannalta olennaisia aminohappoja (Shen & Vihinen, 2004), sillä aminohappojen väliset voimakkaat kontaktit ovat tärkeitä rakenteellisen stabiilisuuden kannalta, kun taas heikot kontaktit viittaavat kyseessä olevien aminohappojen mahdolliseen toiminnalliseen luonteeseen (Beadle & Shoichet, 2002).

Aminohappojen väliset kontaktit sekä liuospinta-alat selvitettiin CSU-palvelimella (Sobolev ym., 1999), joka käyttää WHATIF-ohjelmasta peräisin olevaa algoritmia (Vriend., 1999) atomien kontakti- ja liuospinta-alojen laskemiseen. Kahden atomin A ja B välinen kontaktipinta-ala määritellään pallon pinta-alaksi, kun pallon keskus on atomi A: n keskus ja säde atomi A:n ja liuotinmolekyylin van der Waals-säteiden summa (Sobolev & Edelman, 1995). Liuospinta-ala määritellään myös atomien van der Waals -säteiden perusteella (Lee & Richards, 1971). Pinta-alojen lisäksi ohjelma ilmoittaa jokaisen aminohapon muodostamien kontaktien laadun (vetysidos, hydrofobinen kontakti jne.) (Sobolev ym., 1999).

Mutaatioaminohappojen muodostamat kontaktit visualisoitiin King-ohjelmalla, ja kaikki mutaatorakenteiden atomikontaktit laskettiin MolProbity-ohjelmalla, kuten luvussa 4.2.2. on kuvattu.

Aminohappojen kontaktienergioita analysoitiin RankViaContact-ohjelmalla (Shen & Vihinen, 2003). Ohjelma laskee aminohappojen väliset kontaktienergiat ja visualisoi interaktiot. Ohjelman toiminta perustuu karkeaan malliin, jossa aminohapot on määritelty vuorovaikutuksessa oleviksi partikkeleiksi. Kontaktienergioiden laskennassa käytetyt parametrit riippuvat ympäristöstä ja ovat sekundaarirakennespesifisiä. Voimakkaat kontaktit aminohappojen välillä viittaavat kyseisten aminohappojen rooliin proteiinin stabiilin rakenteen ylläpidossa. Heikot kontaktit sen sijaan ovat ominaisia toiminnallisille aminohapoille. Kontaktienergioiden perusteella voidaan siis paikallistaa rakenteen tai toiminnan kannalta olennaisia aminohappoja ja tutkia mutaatioiden vaikutuksia (Shen & Vihinen, 2003).

Villityypin proteiinirakennetta analysoimalla selvitettiin rakenteen kannalta tärkeät, matalan kontaktienergian aminohapot (joilla on vahvat kontaktit), ja mallitettuja mutaatorakenteita analysoimalla tutkittiin mutaatioiden vaikutuksia kontaktien energiaan.

4.2.4. Elektrostaattinen pintapotentiali

Elektrostaattisilla interaktioilla – vastakkaisten varausten vetovoimalla tai samanlaisten varausten repulsiolla – on tärkeä osa biologisissa prosesseissa. Polypeptidiketjujen laskostuminen tapahtuu osittain elektrostaattisten interaktioiden ohjaamana, ja laskostuneessa proteiinissa elektrostaattinen pinta on määrittävä tekijä proteiinin interaktioissa muiden molekyylien kanssa. Myös liuottimen vesimolekyylien ja ionien elektrostaattiset interaktiot proteiinin kanssa vaikuttavat edellä mainittuihin prosesseihin.

Niin villityypin CD40 ligandin kuin mutaatorakenteidenkin elektrostaattiset pintapotentialit laskettiin ja visualisoitiin PyMOL-ohjelmalla (*DeLano, 2002*), ja laskemiseen käytettiin ohjelman tarjoamaa absoluuttista proteiinin elektrostaattista potentialia vakuudessa.

5. Tulokset

5.1. Sekvenssianalyysi

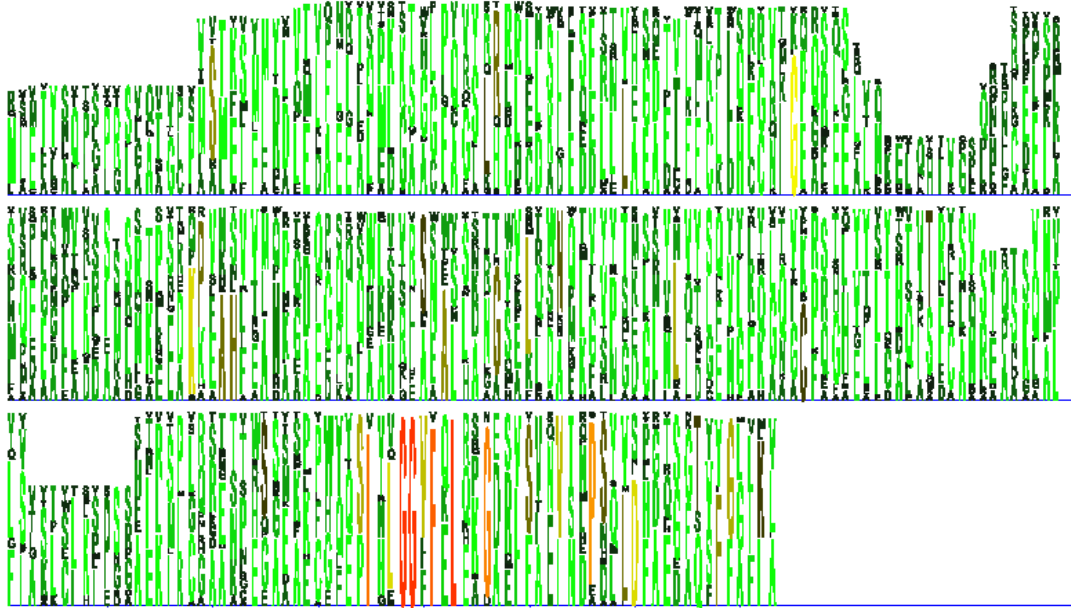
TNF-perheen proteiinit muodostavat rakenteellisesti konservoituneen ryhmän, jolle yhteistä on ”kääretorttu” (jelly roll) -tyyppinen β -levyrakenne ja trimerisoituminen (Peitsch & Jongeneel, 1993). Perheen konservoituneisuus sekvenssitasolla on vähäisempää, sekvenssihomologia vaihtelee noin 25 ja 40% välillä TNF-perheen jäsenten kesken. Sairauksia aiheuttavat mutaatiot osuvat tyypillisesti proteiiniperheessä konservoituneisiin aminohappoihin, jotka yleensä ovat proteiinin rakenteen ja/tai toiminnan kannalta olennaisia (Miller & Kumar, 2001).

5.1.1. Tyypin I konservoituneisuus

Tyypin I konservoituneisuudella tarkoitetaan sekvenssien identtisenä pysymistä, eli aminohapon säilymistä samana tietystä kohtaa sekvenssiä. Tyypin I konservoituneisuutta tutkittiin sekvenssirinnastuksilla ja niiden visualisoinnilla, informaatioteoreettisella laskennalla (ProCon-ohjelma) sekä sekvenssihomologiaan perustuvalla Conseq-ohjelmalla, joka laskee kullekin sekvenssin aminohapolle substituutiofrekvenssin. Kuvat sekvenssirinnastuksista ovat liitteessä 1.

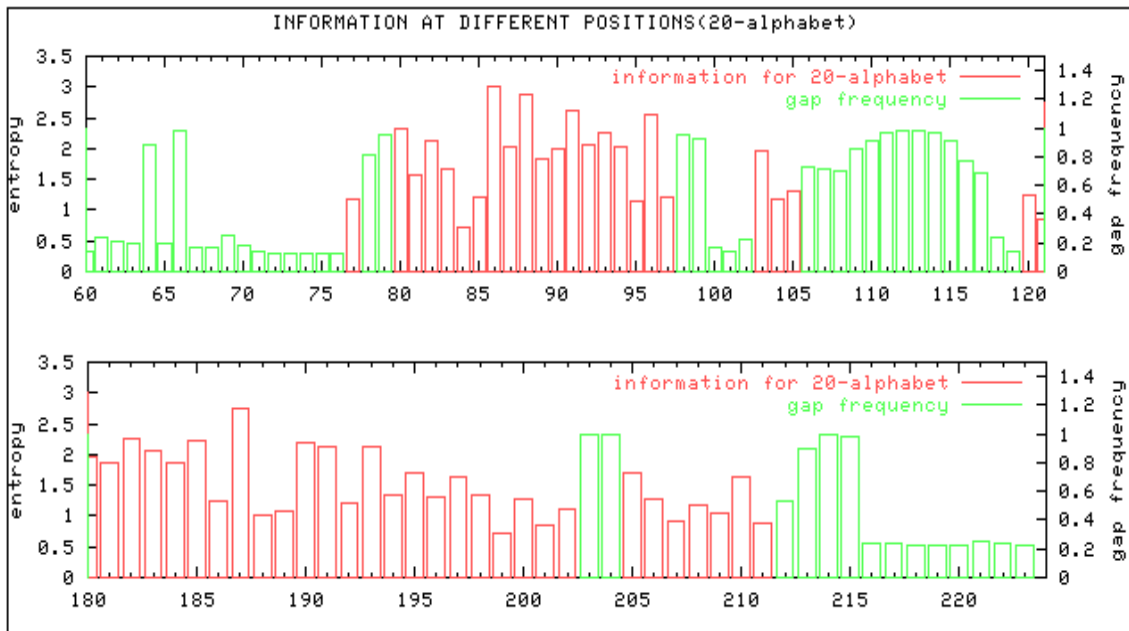
Aminohapposekvenssin konservoituneisuusasteessa on eroa riippuen siitä, tehdäänkö homologisekvenssihaut ja rinnastukset koko sekvenssille (aminohapot 1-261) vai TNF-domeenin sekvenssille aminohapot (123-261). Tämä johtuu siitä, että CD40L:n TNF-domeenille löytyy enemmän homologisekvenssejä kuin koko proteiinille, sillä CD40L:n IC-, TM- ja ECU-alueet poikkeavat muiden TNF-perheen jäsenistä merkittävästi. Sekvenssin alkuosan (aminohapot 1-123) eroavaisuus pysyy keskisuurena – tämä voidaan selvittää sekvenssin alun suurella aukkofrekvenssillä. Sekvenssien eroavaisuus aminohaposta 123 eteenpäin on vähäisempää TNF-domeenirinnastuksessa, mikä johtuu kuvaavammasta aineistosta (sekvenssin alkuosa ei häiritse homologihakua) ja suuremmasta sekvenssimäärästä (jolloin tilastollisen tarkastelun luotettavuus kasvaa).

Sekvenssirinnastuksen perusteella täysin konservoituneita aminohappoja homologisekvensseissä on kolme, G226, G227 ja L231 (Kuva 8), joista kaikissa on todettu mutaatioita (G226A, G227V, L231S).

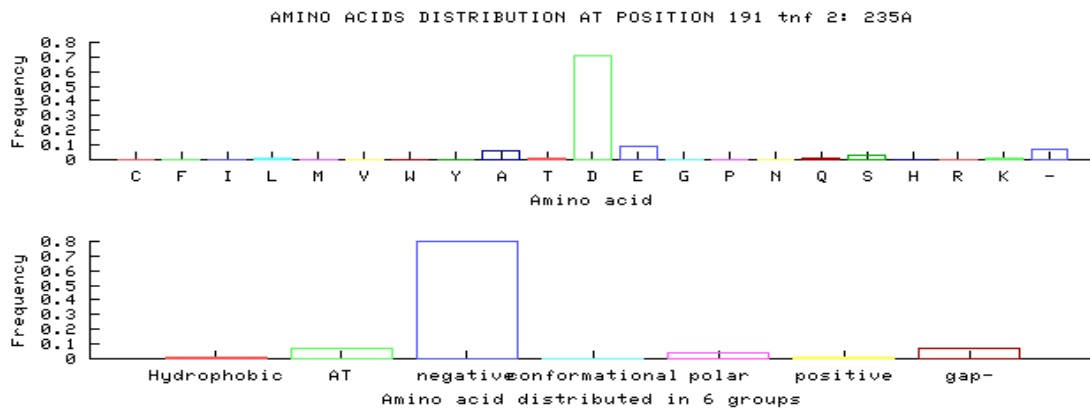


Kuva 8. *MultiDisp-visualisointi koko proteiinisekvenssin konservoituneisuudesta. Värät ja kirjainten koot kuvastavat konservoituneisuusastetta.*

TNF-proteiiniperheen analyysissä tyypin I konservoituneisuus sekvenssissä on yleistä, mutta vain harvoilla korkean informaation alueilla esiintyy mutaatioita CD40 ligandissa. Korkean informaation alueilla sijaitsevat mutaatiot ovat aminohapoissa Q174, G226, G227 ja L231 (kuva 9). Sellaiset alhaisen entropian (korkean informaation) aminohapot, joissa on mutaatioita CD40 ligandissa, mutta joiden kohdalla oli hajontaa sekvenssirinnastuksessa, jätettiin pois, samoin kuin sellaiset korkean informaation aminohapot, joiden informaatio oli kuuden aminohapon aakkostolla laskettuna korkeampi (jolloin kyse voi olla tyypin II konservoituneisuudesta). Osa korkean informaation aminohapoista on myös CD40 ligandissa muuttunut toiseksi kuin TNF-proteiiniperheessä konservoitunut aminohappo (Esimerkki: kuva 10), jolloin entropialaskennan tulosta ei otettu huomioon tässä sekvenssianalyysissä.



Kuva 9. Aminohapposekvenssin informaatio. Korkean informaation aminohapot, joissa esiintyy mutaatioita, eli Q174, G226, G227 ja L231 sijaitsevat kuvassa kohdissa 93, 182, 183 ja 187. Informaatio on kuvattu punaisella, aukkojen frekvenssi vihreällä värillä.

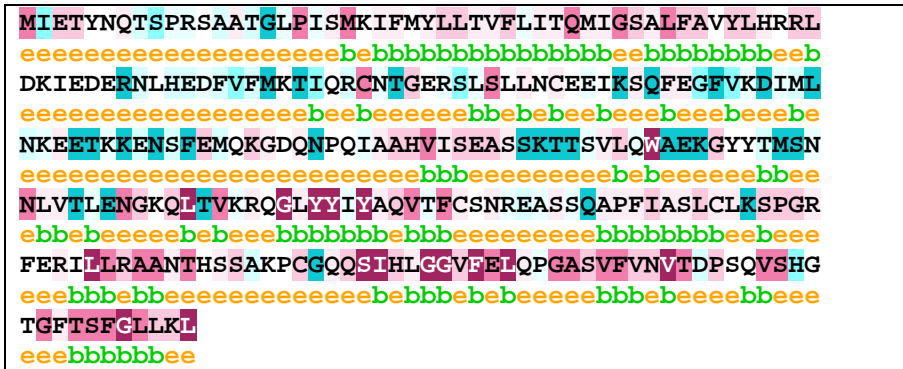


Kuva 10. CD40 ligandin alaniini 235 vastaava aminohappo on useissa muissa TNF-perheen proteiineissa aspartaatti.

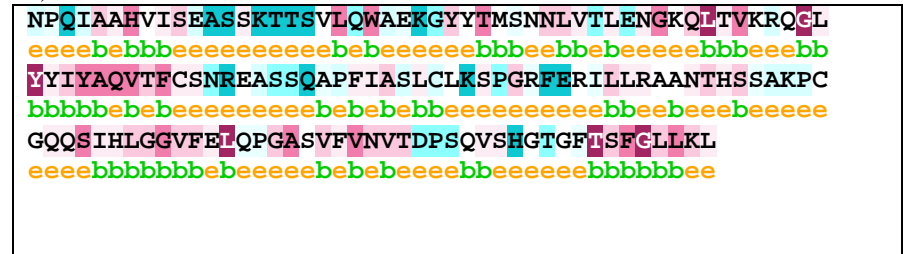
ConSeq-ohjelmalla saatiin toisistaan poikkeavat tulokset käyttämällä TNF-homologirinnastusta ja CD40L-homologirinnastusta (kuva 11). Tämä johtuu siitä, että sekvenssejä on kussakin rinnastuksessa eri määrä (TNF-rinnastuksessa n. kolminkertainen määrä CD40L:n koko sekvenssin rinnastukseen verrattuna). TNF-

rinnastusta käyttämällä tulos on luotettavampi, mutta sillä ei saada tietoa aminohappojen 1-119 konservoituneisuudesta.

a)



b)

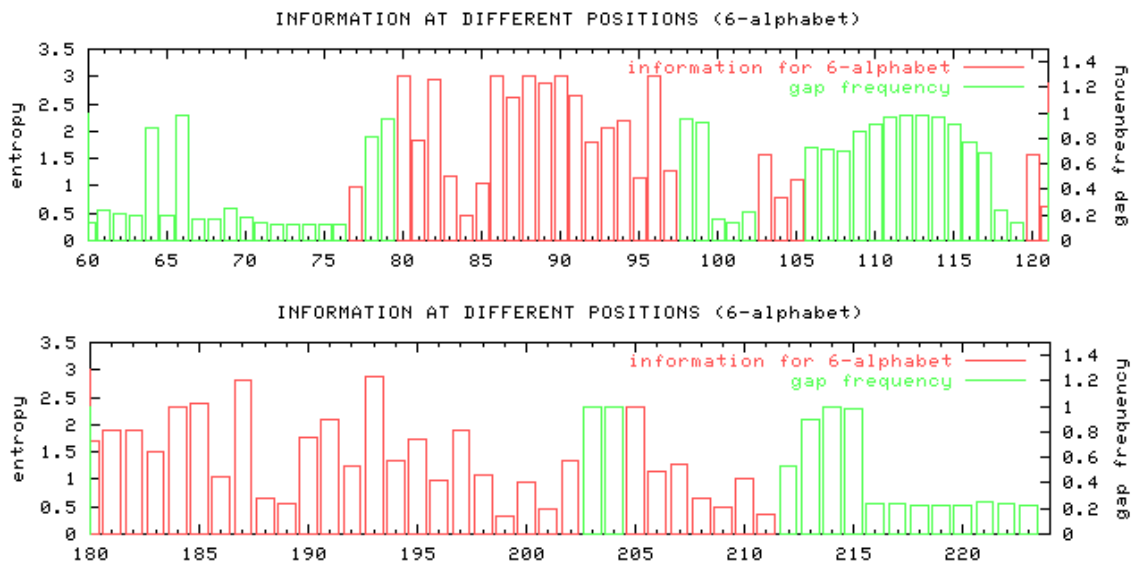


Kuva 11. a) CD40 ligandin ja b) saman proteiinin TNF-homologiaosan sekvenssi ja primaarirakenteen konservoituneisuus ConSeq -ohjelman ennustamana. e: rakenteen pinnalla oleva aminohappotähde (ennustettu) b: rakenteen sisäosiin asettuva aminohappo (ennustettu)

Pienempi homologisekvenssien määrä näkyy ennustuksessa konservoituneisuuden korostumisena (kuva 11a). Useamman sekvenssin ollessa vertailtavana variaatioita löytyy niissä kohdissa, jotka näyttävät kuvassa a olevan vahvasti konservoituneita. Molemmissa kuvissa voimakkaasti konservoituneena esiintyvät aminohapot, kuten W140, L161, G169, L231, T254 ja G257 ovat myös todellisuudessa säilyneitä. Näistä neljässä on todettu hyper-IgM-syndroomaan johtavia mutaatioita.

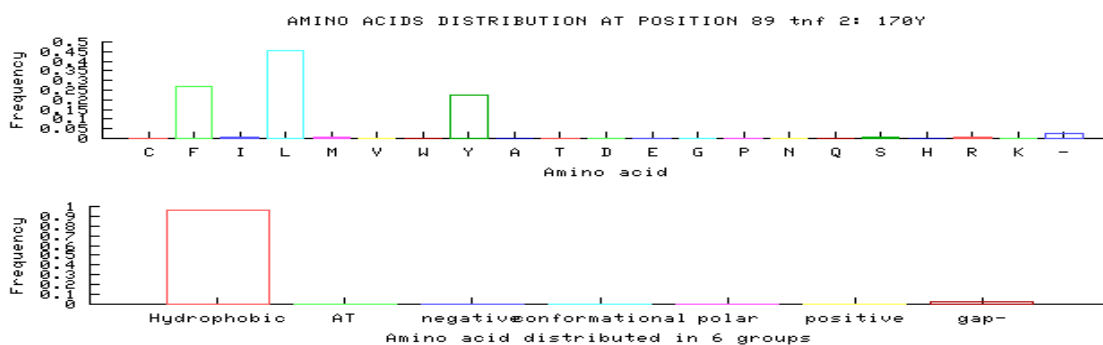
5.1.2. Tyypin II konservoituneisuus

Kun sekvenssi muuttuu aminohapon muututtua toiseksi aminohapon alkuperäisten fysikokemiallisten ominaisuuksien säilyessä samankaltaisina, puhutaan tyypin II konservoituneisuudesta (Shen & Vihinen, 2004). Tyypin II konservoituneisuutta tutkittiin käyttämällä entropialaskennassa yksinkertaistettua aminohappoaakkostoa, jossa aminohapot on jaettu kuuteen ryhmään niiden fysikokemiallisten ominaisuuksien perusteella (kuva 12).

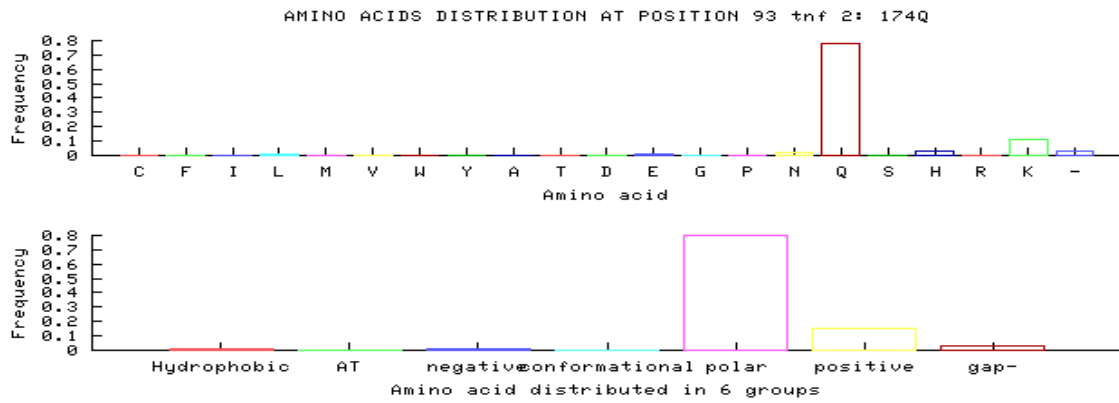


Kuva 12. Aminohapposekvenssin informaatio fysikokemiallisiin ominaisuuksiin pohjaten ProCon-ohjelmalla laskettuna Korkean informaation aminohapot, joissa on todettu mutaatioita, eli Y170, Q174 ja V237 sijaitsevat kohdissa 89, 93 ja 193. Värit samat kuin kuvassa 9.

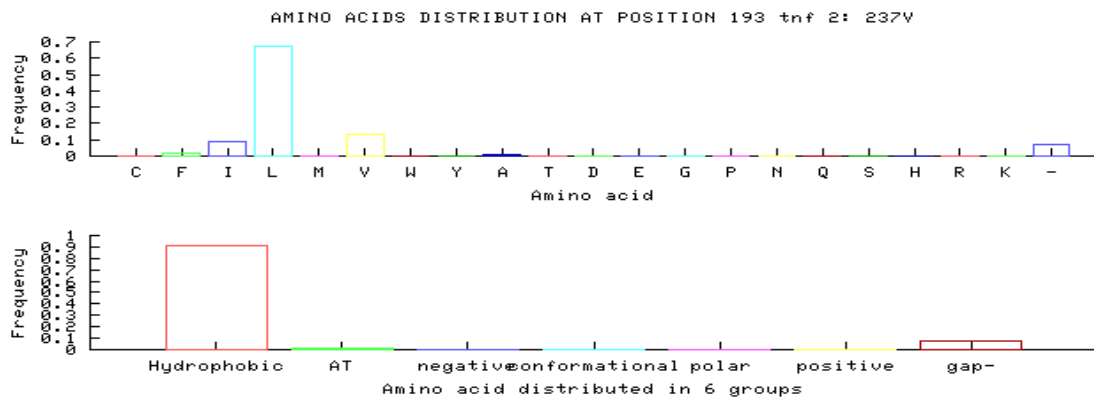
Tyypin II konservoituneita aminohappoja, joista on löydetty mutaatioita, ovat Q174 (kuva 12), jonka kohdalla polaarisuus on konservoitunut ominaisuus (kuva 14), sekä Y170 ja V237 (kuva 12), joissa säilynyt ominaisuus on hydrofobisuus (kuvat 13 ja 15).



Kuva 13. Aminohappojen esiintyminen positiossa 89 (170Y CD40L:ssa) ja fysikokemiallisten ominaisuuksien säilyminen. Laskettu ProCon-ohjelmalla.

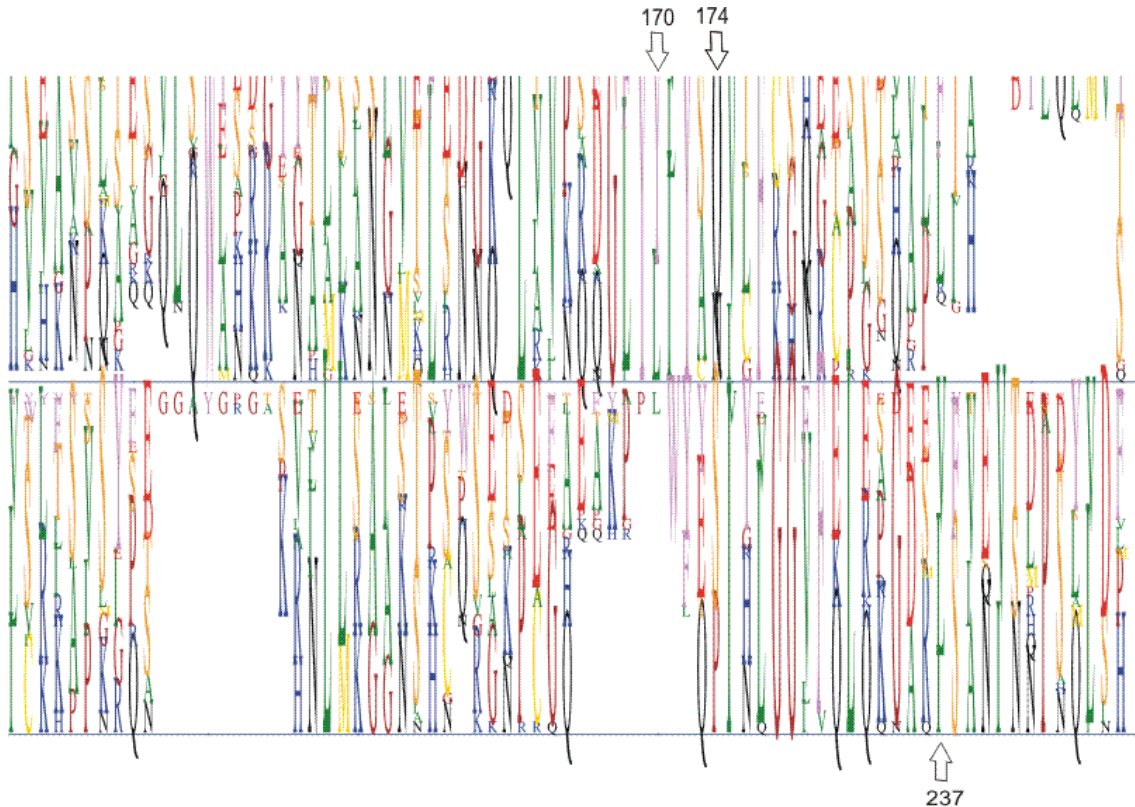


Kuva 14. Aminohappojen esiintyminen positiossa 93 (174Q CD40L:ssa) ja fysikokemiallisten ominaisuuksien säilyminen.



Kuva 15. Aminohappojen esiintyminen positiossa 193 (237V CD40L:ssa) ja fysikokemiallisten ominaisuuksien säilyminen.

Tyyppin II konservoituneisuus näkyy myös sekvenssirinnastuksessa (kuva 16).



Kuva 16. MultiDisp-visualisointi sekvenssirinnastuksesta. Värät kuvaavat samaan fysikokemialliseen ryhmään kuuluvia aminohappoja. CD40 ligandin aminohapotähteet 170, 174 ja 237 on merkitty kuvaan nuolilla. Aminohappo 170:n kohdalla näkyvissä on kahta väriä: vaaleanpunainen tyrosiinille ja vihreä leusiinille. Tyrosiini voidaan kuitenkin mieltää vihreäänkin ryhmään kuuluvaksi, sillä se on osittain hydrofobinen, usein proteiinin rakenteen sisäosiin sijoittuva aminohappo (Betts & Russell, 2003).

5.1.3. Tyypin III konservoituneisuus

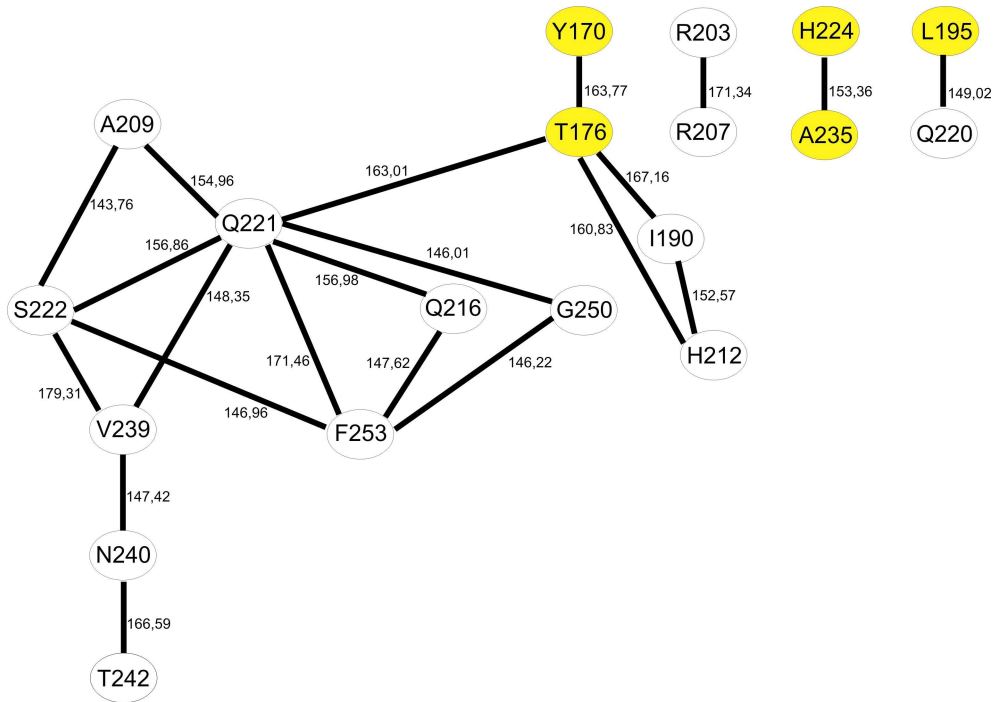
Kovariaatio eli tyypin III konservoituneisuus tarkoittaa, että molemmat osapuolet toiminnallisissa tai sidoksen jakavissa aminohappopareissa muuttuvat siten, että funktio tai vuorovaikutus säilyy.

Monissa proteiini-perheissä on kovarioivia aminohappoja (Clarke, 1995; Afonnikov, 1997), jotka saattavat muodostaa rakenteen stabiilisuutta ylläpitäviä kontakteja, muodostaa sitoutumiskohtia tai olla muuten tärkeitä rakenteen tai toiminnan kannalta (Shen & Vihinen, 2004). Toinen mutaatio voi kompensoida muun muassa mutaation aiheuttamaa laskostuneen proteiinin epästabiiliutta (Dima & Thirumalai, 2004). Sekvenssirinnastuksen aminohapoille laskettu mutuaali-informaatio, joka määritellään yhden satunnaisen muuttujan sisältämän informaation määräksi suhteessa toisen satunnaisen muuttujan informaation määrään, kuvaa kovarianssia (Shen & Vihinen, 2004).

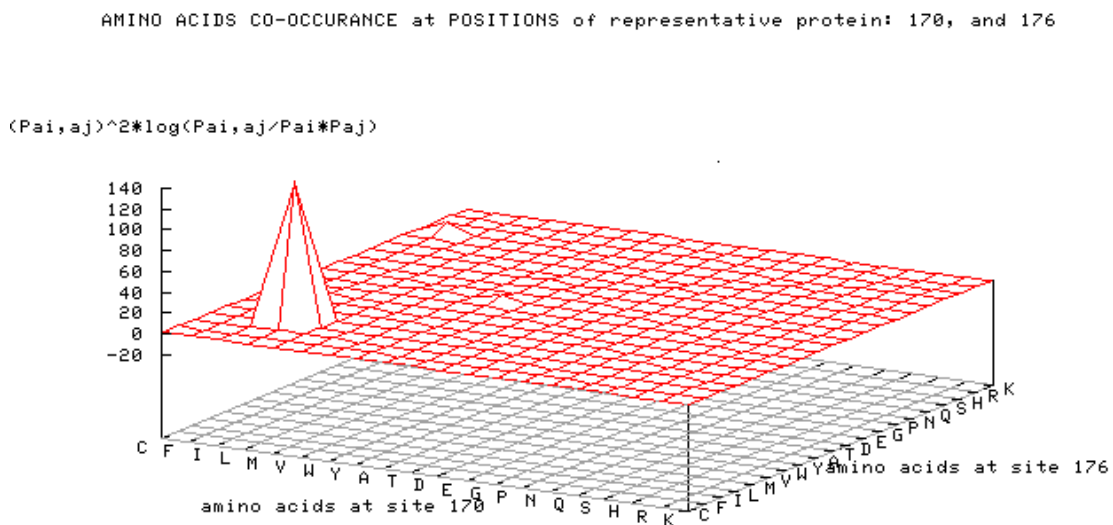
TNF-perheen merkittävät kovarioivat parit on selvitetty ProCon-ohjelmalla (Shen & Vihinen, 2004), ja tulokset on esitetty kuvassa 17.

Tyypin III konservoituneisuus on TNF-perheessä yleistä, mutta sekvenssirinnastuksen perusteella kovarioivat aminohapot eivät ole samoja CD40L:ssa (Esimerkki: Kuva 18). Tämä koskee lähes kaikkia kuvassa 17 esitettyjä kovarioivia aminohappoja – vain

positioissa 222, 239 ja 240 kovarioiva aminohappo on sama kuin CD40L:ssa. CD40 ligandin tyypin III konservoituneissa aminohapoissa ei tunneta mutaatioita.



Kuva 17. Merkittävät kovarioivat parit TNF-perheessä. ($p \leq 0,005$). Aminohapot, joissa esiintyy mutaatioita CD40L:ssa, on korostettu keltaisella. Kuvan aminohapot ja niiden positiot ovat CD40L:n sekvenssin mukaisia. Kovarioivat parit on selvitetty ProCon-ohjelmalla (Shen & Vihinen, 2004).



Kuva 18. Aminohappojen esiintyminen positioissa 170 ja 176.

Positioiden 170 ja 176 välinen kovarianssi on ilmeinen TNF-perheessä, mutta CD40L:n aminohapot eivät vastaa muissa sekvensseissä kovarioivia aminohappoja (Kuva 18). CD40L:ssa positiossa 170 aminohappo on tyrosiini (Y) ja positiossa 176 treoniini (T), kun vastaavissa (sekvenssirinnastuksen) positioissa TNF-perheessä ovat yleisemmin leusiini ja leusiini. TNF-perheessä tyypin III konservoituneet aminohapot muodostavat hydrofobisen parin, kun taas CD40L:n vastaavat aminohapot Y ja T ovat molemmat polaarisia, eivätkä kovarioi.

5.1.4. Mutaatioiden vaikutus proteiinin sekundaarirakenteeseen sekvenssilähtöisten ennustusten perusteella

Ennustettaessa proteiinin sekundaarirakennetta Psipred-ohjelmalla kaikki mutaatiot muuttivat sekundaarirakennetta koko sekvenssin alueella verrattuna villityypin sekundaarirakenteeseen. Yhdelläkään mutaatioista ei kuitenkaan ollut selvää paikallista vaikutusta sekundaarirakenteeseen siten, että se olisi merkittävästi muuttanut sekundaarirakennetta kyseisen aminohapon kohdalla. Mutaatiot jaettiin kolmeen ryhmään sekundaarirakenteen muuttumisen perusteella.

Sekvenssin loppuosassa – aminohaposta 143 aminohappoon 258 – olevat mutaatiot vaikuttivat kaikki sekundaarirakenteeseen hyvin samankaltaisesti. Tämän ryhmän mutaatiot K143T, G144E, L155P, T147N, Y170C, A173D, Q174R, T176I, L195P, A208D, G226A, G227V, L231S, A235P, V237E, T254M, G257D, G257S ja L258S aiheuttivat villityyppiin verrattuna enemmän proteiinin PDB-rakennetta muistuttavan sekundaarirakenteen. Ennustetuissa mutaatiosekvenssien sekundaarirakenteissa on enemmän β -rakennetta sekvenssialueella 201-240 kuin villityypin ennusteessa, samoin ohjelma ennustaa samanlaisen β -säikeen katkaiseman α -kierteen sekvenssialueelle 18-70. Ohjelma ennustaa ryhmän sekvensseille myös lyhyen α -kierteen alueelle 244-246. Myös ennustetun sekvenssin alueella 84-93 sijaitsevan α -kierteen paikka ja pituus on ryhmän sekvensseillä ennustettu samaksi.

Toiseen ryhmään kuuluvilla mutaatiosekvensseillä ei ollut niin yhtäläistä vaikutusta ennustettuun sekundaarirakenteeseen kuin ensimmäisellä ryhmällä. Ryhmään 2 luettiin kuuluvaksi TNF-domeenin alkuosassa sijaitsevat mutaatiot G116R, A123E, H125R, V126A ja V126D, sillä ne vaikuttivat samoin ennustetun, proteiinin ensimmäisen α -kierteen rakenteeseen. Näillä mutaatiosekvensseillä ennustettuna sekvenssialueella 18-70 sijaitseva α -kierre muistuttaa villityypin vastaavaa lukuunottamatta mutaatiosekvenssien kierteen katkoa kohdassa 61-62. Ryhmän sekvenssit ennustivat TNF-domeenin sekundaarirakenteen β -levyjen osalta myös keskenään samankaltaisesti ja villityypin ennustusta muistuttaen. Kolmannen ryhmän mutaatiot – W140R, W140G ja W140C - vaikuttavat sekundaarirakenteeseen kukin omalla tavallaan ilman että niitä olisi voinut osoittaa kumpaankaan edelliseen ryhmään kuuluvaksi. Jpred-ohjelmaa käytettäessä tulokset olivat samanlaisia.

Koska lähes kaikki mutaatiosekvensseillä tehdyt sekundaarirakenteen-ennustukset lähestyivät villityypin ennustukseen (joka poikkeaa todellisesta, tunnetusta rakenteesta merkittävästi) verrattuna tiedossa olevaa proteiinin rakennetta, mutaatioita ja niiden vaikutuksia proteiinin sekundaarirakenteisiin ei voitu PsiPred ja Jpred -ennustusohjelmilla analysoida tämän tutkimuksen tarkoituksen mukaisesti.

5.1.5. Proteiinin rakenteen epäjärjestyneisyyttä lisäävät mutaatiot

Yksikään CD40L:n mutaatioista ei aiheuttanut epäjärjestyä kaikilla ohjelmilla (DISEMBL, PONDR, DISOPRED, GlobPlot) ennustettuna (Taulukko 2).

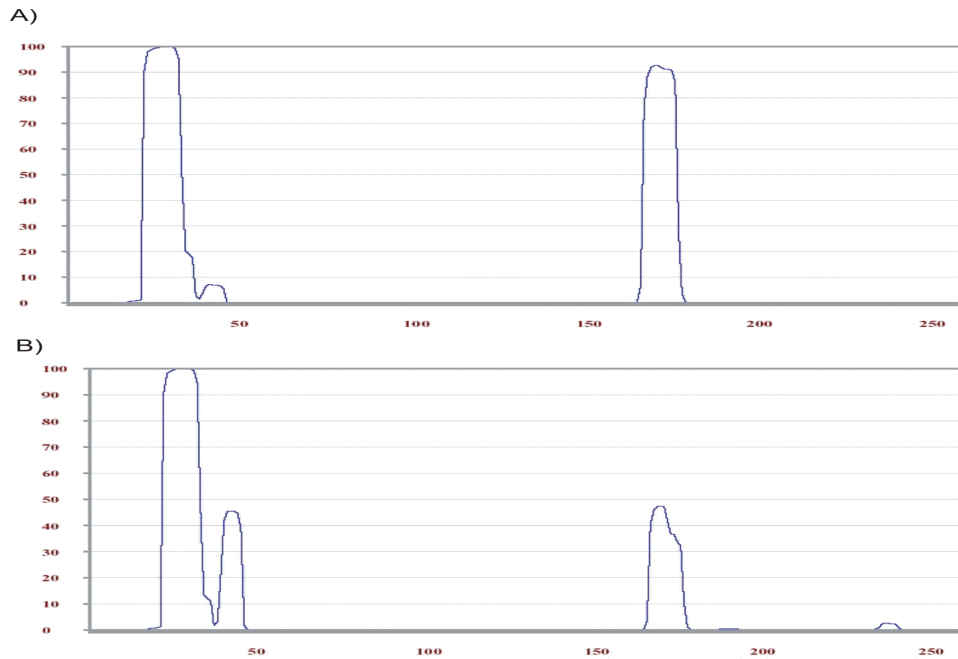
Mutaatio		DISEMBL	DISOPRED	Globplot	PONDR
G116R	+		-	+	+
A123E	-		-	-	+
H125R	-		-	-	+
V126A	-		-	-	+
V126D	+		-	-	+
W140G	+		-	-	+
W140R	-		-	-	+
L155P	+		-	+	-
T176I	-		+	-	-
L195P	+		-	-	-
A208D	+		+	-	-
L231S	-		-	+	-
A235P	+		-	+	-
V237E	+		-	-	+
L258S	+		-	+	-

Taulukko 2. Rakenteeseen epäjärjestyä aiheuttavat mutaatiot. + : lisää epäjärjestyä; - : ei lisää epäjärjestyä ko. ohjelmalla ennustettuna. Taulukossa on kuvattu vain ne mutaatiot, joiden ennustetaan aiheuttavan epäjärjestyä ainakin yhdellä ohjelmalla

G116R:n voidaan olettaa olevan ainoa mutaatio, joka todennäköisesti aiheuttaa rakenteeseen epäjärjestyä. Kolme ohjelmaa neljästä ennustavat mutaation lisäävän proteiinin epäjärjestyä. Myös V126D, W140G, L155P, A208D, A235P, V237E ja L258S saattavat lisätä proteiinin epäjärjestyä, sillä puolet ohjelmista ennustaa niille epäjärjestyä lisäävän vaikutuksen. Epäjärjestyneisyys ei ole todennäköistä vain yhden ohjelman ennustamana.

5.1.6. Proteiinin β -aggregoitumistaipumukseen vaikuttavat mutaatiot

Proteiinin todennäköisyyttä muodostaa aggregaatteja ennustettiin TANGO-ohjelmalla. Mutaatiosekvenssit, jotka tuottivat poikkeavan tuloksen villityypin sekvenssiin verrattuna, olivat Y170C, A173D, Q174R ja V237E, jotka vähensivät aggregoitumistaipumusta, sekä T176I, joka lisäsi aggregoitumistaipumusta villityypin polypeptidiin verrattuna (kuva 19).



Kuva 19. Mutaatio T176I lisää CD40L:n β -aggregaatiotaipumusta ko. aminohapon ympäristössä ja vähentää aggregaatiota sekvenssialueella 40-50. A) mutaatiosekvenssin kuvaaja, B) villityypin sekvenssin kuvaaja. Aggregaatiotaipumus laskettiin TANGO-ohjelmalla. X-akselilla sekvenssi, y-akselilla aggregaatiotaipumusta kuvaava lukuarvo.

Kuvassa esitetään vain aggregaatiotaipumusta lisäävä mutaatio, sillä vain sillä voi olla merkitystä CD40L:n toiminnan kannalta. Aggregaatiotaipumusta vähentävien mutaatioiden ei uskota huonontavan CD40L:n toiminnallisuutta. Chitin ym. teorian mukaan luonnossa esiintyvien proteiinien sekvenssit eivät ole optimoituneet evoluutiossa täysin vastustamaan aggregoitumista, vaan ainoastaan riittävästi pysyäkseen liukoisina toiminnan kannalta tarvittavan ajan. Niinpä proteiinit voivat kehittyä nk. parempaan suuntaan aggregoitumisen kannalta mutaatioiden myötä (*Chiti ym., 2003*). Tosin mutaatiot useimmiten vaikuttavat proteiinin toiminnallisuuteen muilla tavoin, minkä vuoksi tällaiset mutaatiot monesti karsiutuvat luonnonvalinnassa.

5.2. Rakenneanalyysi

5.2.1. Rotameerianalyysi ja rakenteelliset mutaatiot

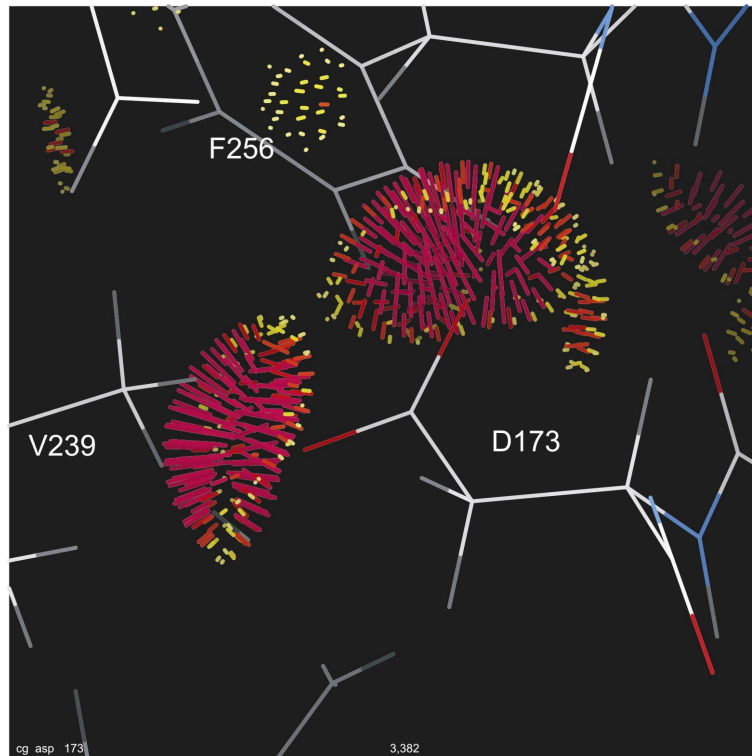
Suurin osa mutatoituneista aminohapoista sopii rakenteeseen aiheuttamatta suuria konformationaalisia rasitteita pääketjulle sekä laskennallisesti (Probe-ohjelman pistemäärä parhaalle konformaatiolle) että visuaalisesti tarkasteltuna. 27 tarkastellun mutaation parhaista konformaatioista 18 ylsi konformaation hyväksyttävyyssrajan yläpuolelle, kun raja-arvoksi määritellään -1 (Taulukko 3). Visuaalisessa tarkastelussa hyvin vähän tai ei lainkaan konformaatiota rasittavia muuttuneita aminohappoja oli 15.

Rakenteeseen konformationaalista rasitusta aiheuttavat taulukko 3:ssa korostettujen mutatoituneiden aminohappojen lisäksi mutaatiot A173D, W140C, A208D ja W140R (Kuvat 20-23). Mutaatioiden T176I, G226A, G227V, A235P, T254M, G257D ja G257S asettuminen rakenteeseen on kuvattu liitteessä 2.

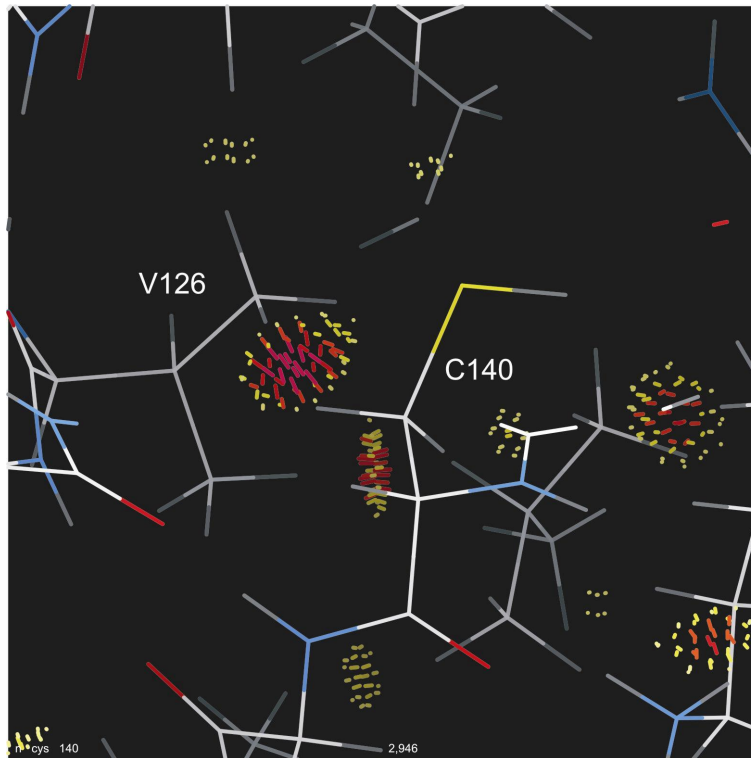
Lysiini 155:n mutaatio proliiniksi ei aiheuta törmäyksiä muiden aminohappojen sivuketjujen kanssa, vaan päällekkäisyyttä on ainoastaan glutamaatti 156:n pääketjun kanssa. Sama pätee myös L195:n mutaatiota proliiniksi, jolloin sivuketju aiheuttaa törmäyksen L196:n pääketjun aminoryhmän kanssa. Proliinimutaatiot aiheuttavat kuitenkin aina pääketjun uudelleenjärjestymistä rengasrakenteisen sivuketjuna vuoksi, joten todellista päällekkäisyyttä rakenteessa ei voida ennustaa luotettavasti ainoastaan sivuketjua rotatoimalla.

mutaatio	pisteet	törmäys
G116R	5,308	- *
A123E	6,89	E
H125R	7,939	E
V126A	0,518	E
V126D	6,794	E
W140C	0,639	K
W140R	6,678	K
K143T	3,138	E
G144E	1,96	E
T147N	5,459	E
L155P	-5,157	E
Y170C	1,079	E
A173D	5,745	K
Q174R	8,194	E
T176I	-18,604	K
L195P	-9,088	E
A208D	2,502	K
H224Y	6,157	E
G226A	-8,913	K
G227V	-17,846	K
L231S	4,875	E
A235P	-28,282	K
V237E	6,391	E
T254M	-8,66	K
G257D	-47,39	K
G257S	-47,39	K
L258S	4,447	E

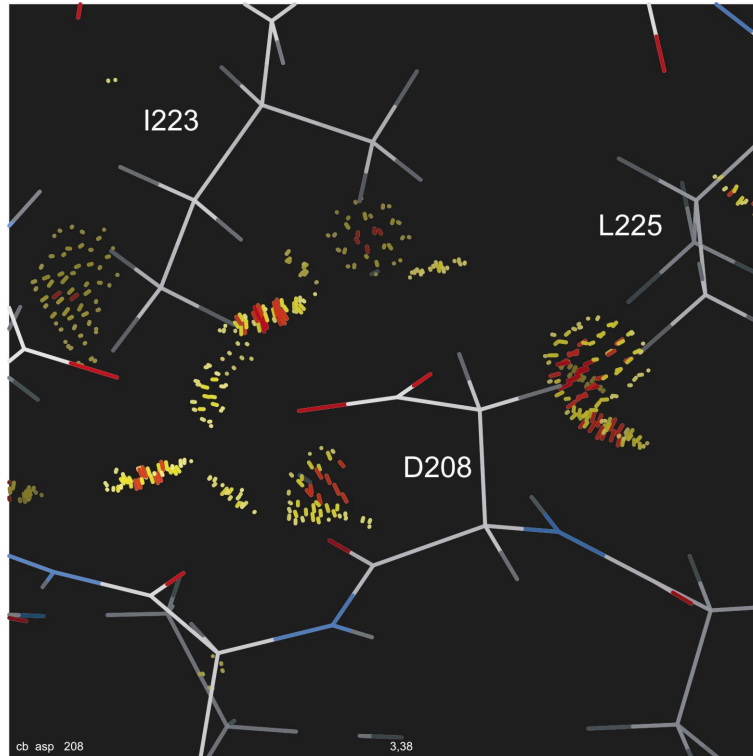
Taulukko 3. Mutatoituneiden aminohappojen sopivuus rakenteeseen. Rakenteeseen hyväksyttävyyttä kuvaavan raja-arvon (-1) alittaneet mutaatiot on korostettu. Pisteet on laskettu Probe-ohjelmalla, ja taulukossa on esitetty kunkin aminohapon parhaan rotameerin pistemäärä. Törmäykset analysoitiin visuaalisesti Mage-ohjelmalla. *Aminohapon 116 ollessa määritetyn rakenteen ensimmäinen, luotettavia tuloksia ei ole mahdollista saada.



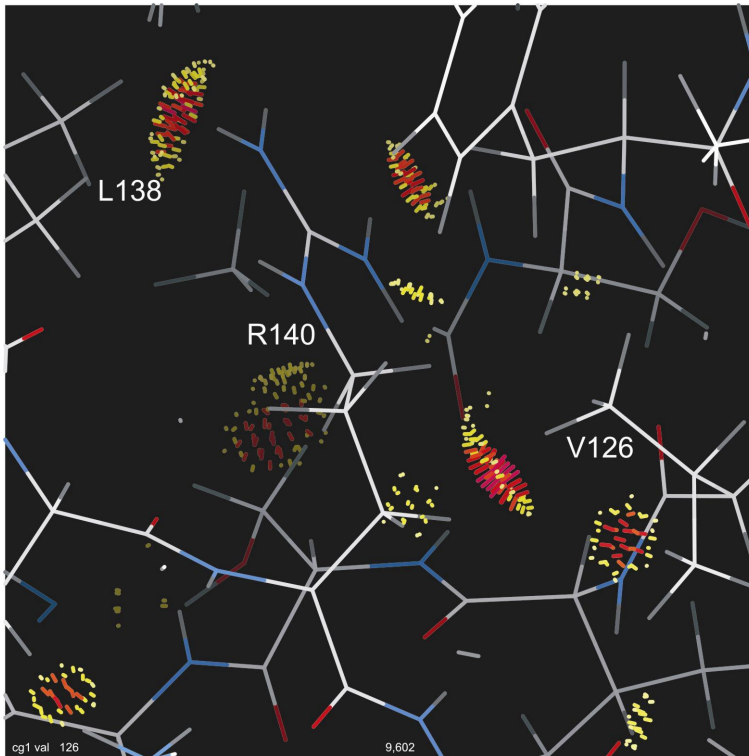
Kuva 20. A173D aiheuttaa pahoja törmäyksiä rakenteessa lähellä sijaisevien aminohappojen V239 ja F256 kanssa. (Purppuranpunaiset viivat: paha törmäys; päällekkäisyys $\geq 0,4\text{\AA}$, keltaiset viivat: lievä törmäys; päällekkäisyys $0,2-0,4\text{\AA}$.)



Kuva 21. W140C aiheuttaa pahan törmäyksen V126:n kanssa. (Purppuranpunaiset viivat: paha törmäys; päällekkäisyys $\geq 0,4\text{\AA}$, keltaiset viivat: lievä törmäys; päällekkäisyys $0,2-0,4\text{\AA}$.)



Kuva 22. A208D aiheuttaa lieviä törmäyksiä naapuriaminohappojen I223 ja L225 kanssa. (Keltaiset ja punaiset viivat: lievä törmäys; päällekkäisyys 0,2-0,4Å.)



Kuva 23. W140R aiheuttaa pahoja törmäyksiä aminohappojen V126 ja L138 kanssa. (Purppuranpunaiset viivat: paha törmäys; päällekkäisyys $\geq 0,4\text{\AA}$, keltaiset viivat: lievä törmäys; päällekkäisyys $0,2-0,4\text{\AA}$.)

Rakenteeseen ”sopimattomat”, päällekkäisyyttä ja törmäyksiä aiheuttavat, proteiinin natiivikonformaatiota rasittavat mutaatiot aiheuttavat todellisuudessa rakenteen uudelleenjärjestymistä, jota ei voida luotettavasti ennustaa. Uudelleenjärjestyminen voi muuttaa proteiinin rakennetta ja ominaisuuksia merkittävästi. Siispä nämä mutaatiot voidaan luokitella rakenteellisiksi

5.2.2. Aminohappojen välisiin tärkeisiin kontakteihin vaikuttavat mutaatiot

Rakenteen sisäosissa sijaitsevat aminohapot (liuosinta-ala ≈ 0), jotka muodostavat keskenään useita hydrofobisia vuorovaikutuksia, ovat proteiinin laskostumisen ja rakenteellisen stabiilisuuden kannalta tärkeitä. Tällaisten aminohappojen mutaatiot voivat muuttaa aminohappojen välisiä, rakenteen kannalta olennaisia kontakteja. Proteiinin hydrofobisen ytimen aminohappojen muuttumisen varauksellisiksi tiedetään destabiloivan proteiinirakennetta (Chasman & Adams, 2001). CD40 ligandin tiedossa olevista mutaatioista seitsemän vähentää proteiinin sisäosien aminohappojen hydrofobisia vuorovaikutuksia merkittävästi (Taulukko 4).

AH	HB lkm.	Kontakti-E	SAS	Mutaatio	Δ HB lkm.
V126	6	-23,01	0,0	V126D	-3
A173	6	-18,55	0,0	A173D	-2
W140	8	-10,16	0,0	W140G	-8
				W140C	-5
				W140R	-3
L231	9	-16,93	0,4	L231S	-9
L258	8	-26,64	1,4	L258S	-8

Taulukko 4. *Hydrofobisten vuorovaikutusten muuttuminen proteiinin sisäosissa sijaitsevien aminohappojen mutaatioiden myötä. Liuospinta-alat ja vetysidokset ja niiden muutokset on laskettu CSU-ohjelmalla (Sobolev ym., 1999), kontaktienergiat RankViaContact-ohjelmalla (Shen & Vihinen, 2003). AH – aminohappo; HB – hydrofobinen kontakti; Kontakti-E – kontaktienergia (RT), SAS – liuospinta-ala; Δ HB lkm – muutos hydrofobisten kontaktien lukumäärässä.*

Aminohappojen, joilla on alhainen kontaktienergia, ovat yleensä proteiinin rakenteen stabiilisuuden kannalta merkittäviä (Shen & Vihinen, 2004). Sellaisten mutaatioiden, jotka osuvat alhaisen kontaktienergian aminohappoihin, voidaan siis ajatella vaikuttavan proteiinin stabiilisuuteen. CD40L:n 30 tunnetusta mutaatiosta neljä osuu proteiinin 10% alhaisimman kontaktienergian aminohappoihin RankViaContact – ohjelmalla laskettuna (Shen & Vihinen, 2003) (Taulukko 5).

No.	AMINOHAPPO	Kontaktienergia (RT)	ah lkm	SAS SAS
193	L	-31.190	9	0.000
161	L	-30.390	9	0.000
258	L	-26.640	8	0.010
191	A	-26.290	9	0.000
237	V	-23.850	8	0.000
225	L	-23.670	7	0.040
126	V	-23.010	9	0.000
175	V	-22.250	9	0.000
223	I	-22.090	7	0.030
153	V	-22.010	10	0.010
256	F	-21.940	7	0.000
257	G	-21.540	8	0.000
171	I	-20.240	6	0.000
206	L	-20.110	6	0.240
239	V	-19.950	7	0.000

Taulukko 5. 10% alhaisimman kontaktienergian aminohapot CD49L:ssa. Aminohapot, joissa on todettu mutaatioita, on korostettu punaisella värillä. Laskettu RankViaContact-ohjelmalla (Shen & Vihinen, 2003).

V237, joka kuuluu CD40L:n alhaisimman kontaktienergian aminohappoihin (taulukko 5), muodostaa odotetusti useita rakenteen kannalta merkittäviä hydrofobisia vuorovaikutuksia. 237:n kanssa hydrofobisessa vuorovaikutuksessa olevien aminohappojen lukumäärä ei muutu mutaation V237E myötä, mutta aminohapon kontaktienergian summa nousee villityypin proteiinin -23,850:sta -5,550:een, mikä tarkoittaa kontaktien merkittävää heikkenemistä. V237 sijaitsee proteiinin hydrofobisessa ytimessä (liuos-pinta-ala 0), joten myös glutamaatin negatiivinen varaus saattaa heikentää ytimen stabiilisuutta.

G257, myös alhaisen kontaktienergian aminohappo (taulukko 5), on oletettavasti rakenteellisesti tärkeä aminohappo. Sen muodostamat vetysidokset Y172:n ja L258:n kanssa eivät mutaatioiden (G257D, G257S) myötä muutu, joten mutaatioiden aiheuttama rakenteellinen rasitus todennäköisesti perustuu mutaatiotivuketjujen aiheuttamiin törmäyksiin muiden sivuketjujen kanssa (taulukko 3) ja pääketjun liikkuvuuden rajoittumiseen (kuten glysiinin mutaatioissa yleensä). Aspartaatin

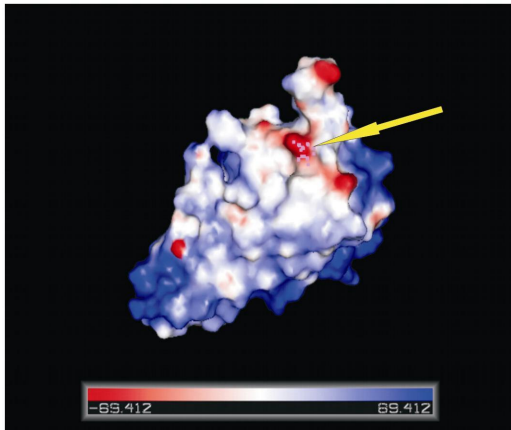
negatiivinen varaus voi myös aiheuttaa hydrofobisen ytimen stabiilisuuden vähenemistä.

L258 ja V126 muodostavat tärkeitä hydrofobisia kontakteja (taulukko 4), joiden katoaminen mutaatioiden myötä huonontaa proteiinin stabiilisuutta. V126:n mutatoituessa aspartaatiksi ytimeen ilmaantuu negatiivista varausta.

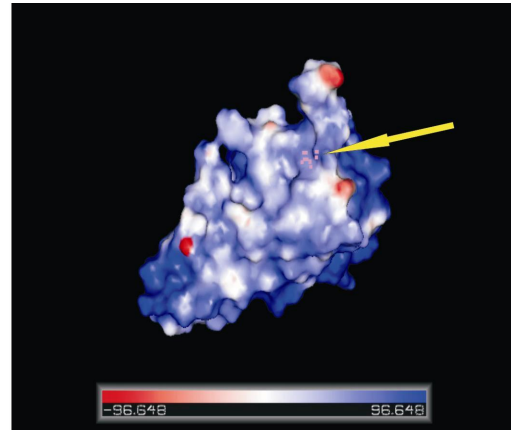
5.2.3. Elektrostaattista pintapotentialia muuttavat mutaatiot

Proteiinin elektrostaattista pintapotentialia muuttavat selvästi seuraavat mutaatiot: G116R, A123E, H125R, V126D, K143T, G144E, A173D, Q174R, A208D, V237E ja G257D. Useimmat muuttavat pintaa negatiivisemmaksi verrattuna villityypin proteiiniin (kuvat 24-26). Positiivisemmaksi pintaa muuttavat arginiinimutaatiot H125R, Q174R ja G116R (kuva 27), sekä vähemmässä määrin G226A. Mutaatio W140R ei muuta pintapotentialia merkittävästi positiivisemmaksi kuten muut arginiinin alkuperäisen aminohapon tilalle tuovat mutaatiot, sillä R140:n sivuketju sijoittuu rakenteen sisäosiin (kuva 28). Positiivinen varaus vähentää kuitenkin proteiinin hydrofobisen ytimen stabiilisuutta.

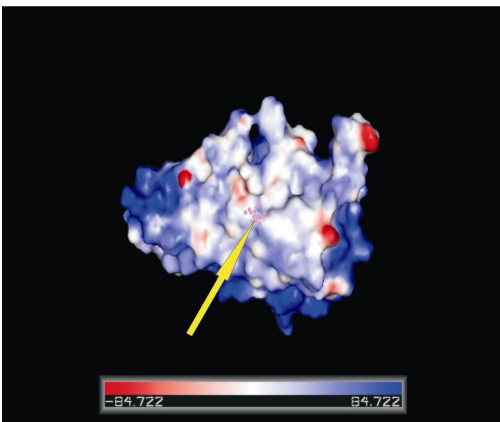
Proteiinin elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen vaikuttaa proteiinin ominaisuuksiin monin tavoin. Proteiinin elektrostaattisilla ominaisuuksilla on vaikutusta proteiinin laskostumiseen ja stabiilisuuteen, ja pintapotentialilla on olennainen rooli CD40L:n proteiini-proteiini-interaktioissa (*Singh ym., 1998*). Elektrostaattiseen pintapotentialiin vaikuttavat mutaatiot voidaan siis luokitella vaihtoehtoisesti joko rakenteellisiksi tai toiminnallisiksi mutaatioiksi tai molempiin ryhmiin kuuluviksi, kuten tässä tutkimuksessa on tehty.



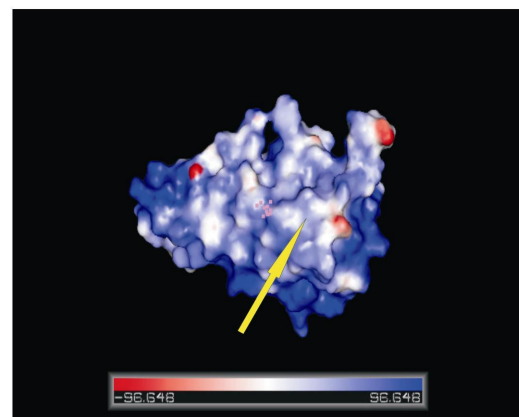
A123E



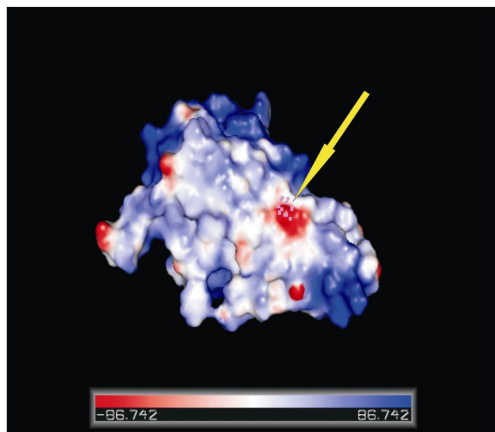
A123A



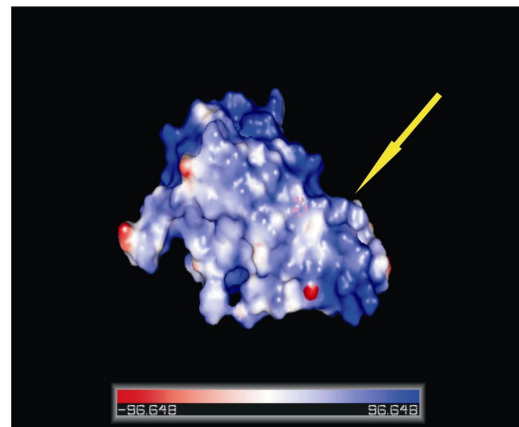
A173D



A173A

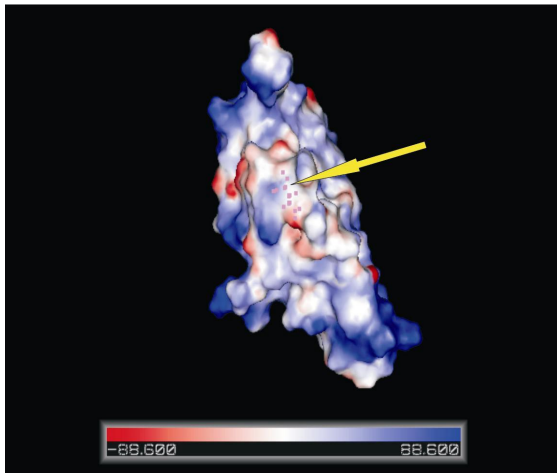


A208D

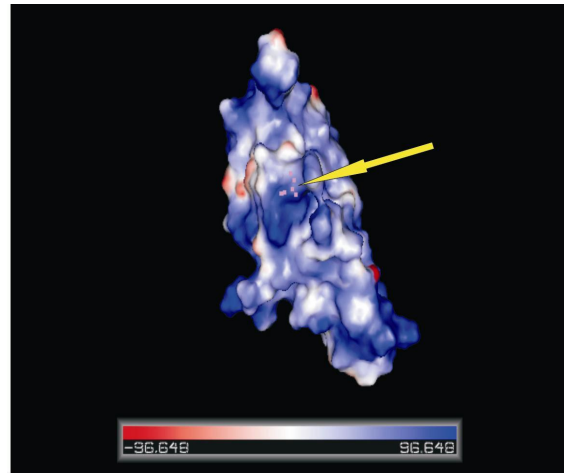


A208A

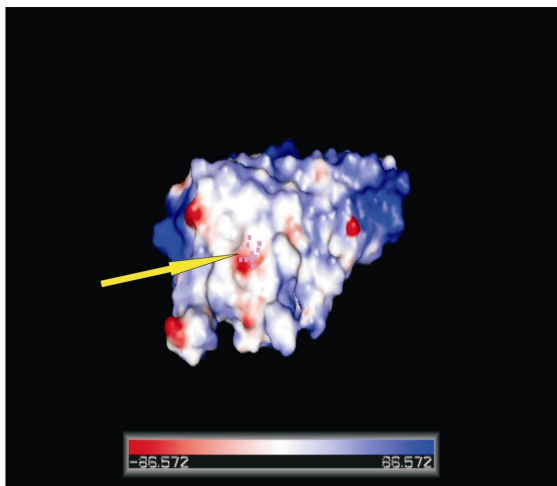
Kuva 24. CD40 ligandin elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen mutaatioiden myötä. Kuvassa esitetty mutaatioiden A123E, A173D ja A208D vaikutus verrattuna villityypin proteiiniin. Villityypin proteiini on kuvattu oikealla samassa orientaatioissa kuin mutatoitunut proteiini. Sininen: positiivinen potentiaali. Punainen: negatiivinen potentiaali. Valkoinen: neutraali potentiaali. Keltaiset nuolet osoittavat mutaatioaminoahapon sijainnin suhteessa proteiinin pintaan. Pintapotentialit on laskettu PyMol-ohjelmalla (DeLano, 2002).



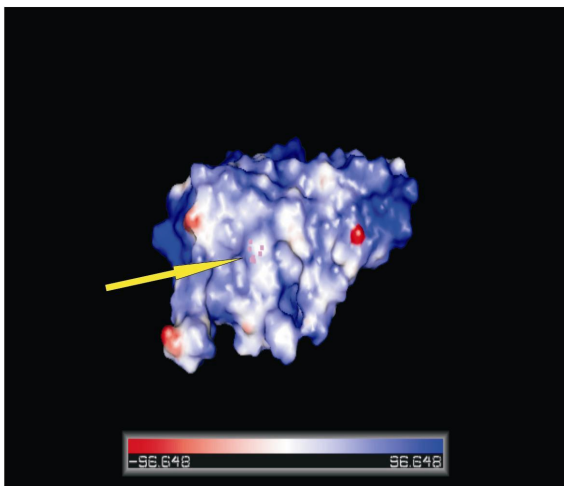
G144E



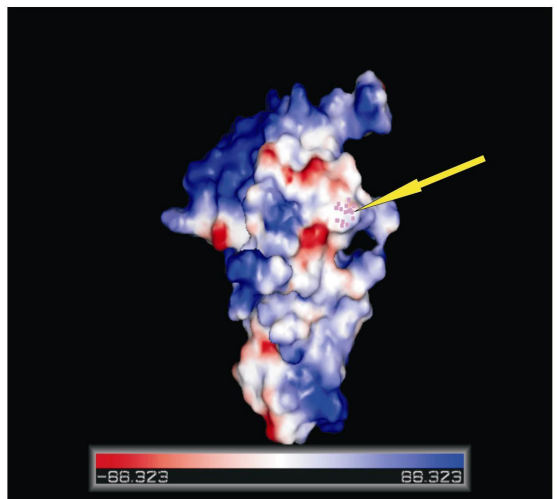
G144G



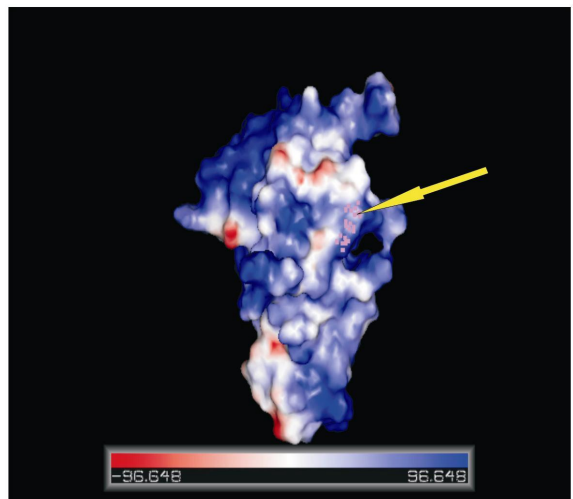
G257D



G257G

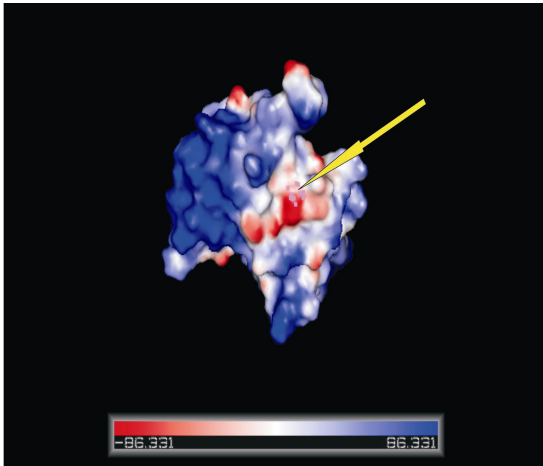


K143T

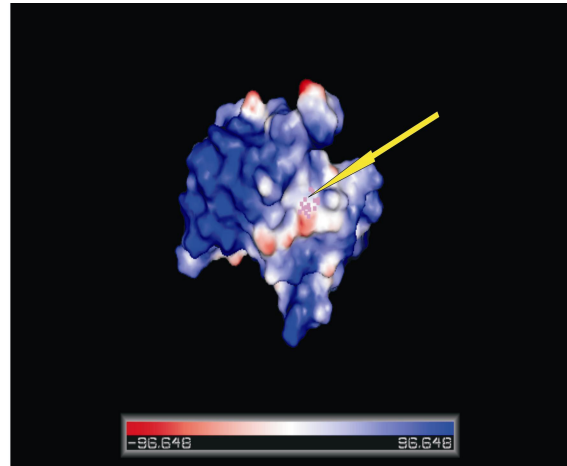


K143K

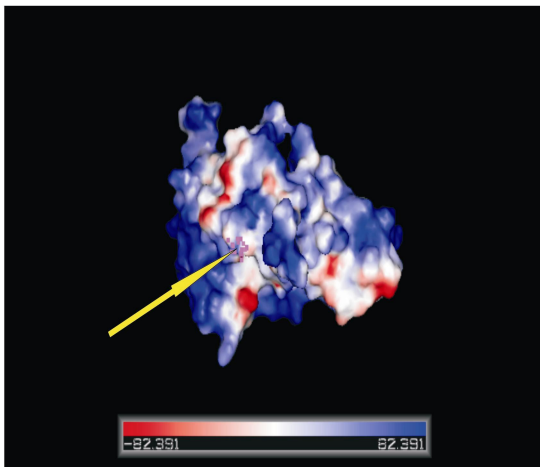
Kuva 25. CD40 ligandin elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen mutaatioiden myötä. Kuvassa esitetty mutaatioiden G144E, G257D ja K143T vaikutus verrattuna villityypin proteiiniin. Villityypin proteiini on kuvattu oikealla samassa orientaatioissa kuin mutatoitunut proteiini. Värit ovat samat kuin kuvassa 24.



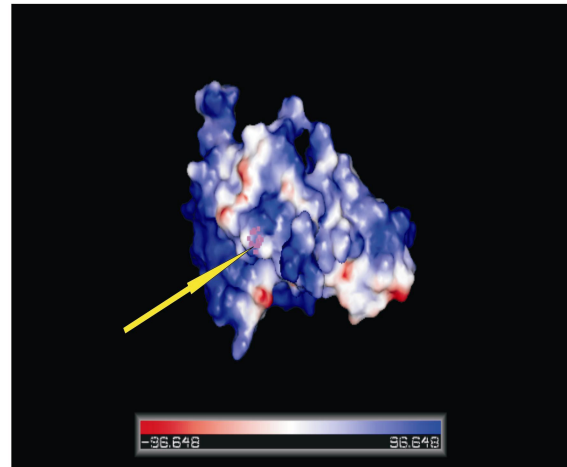
V126D



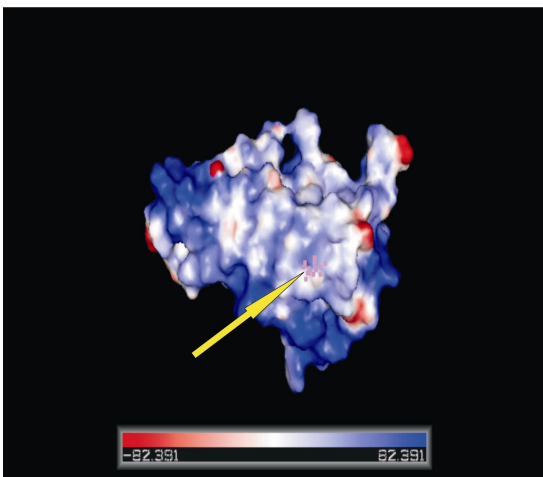
V126V



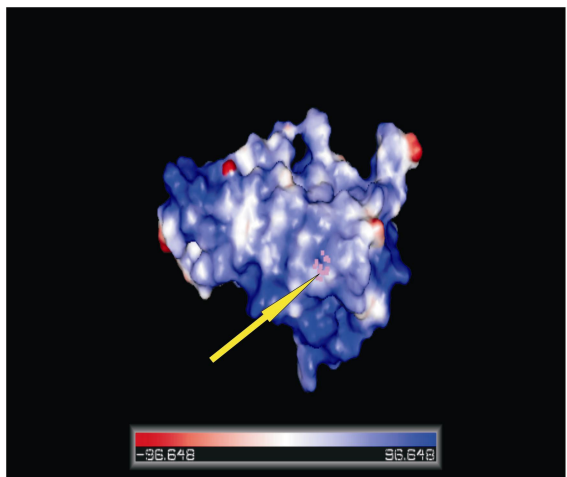
V237E



V237V

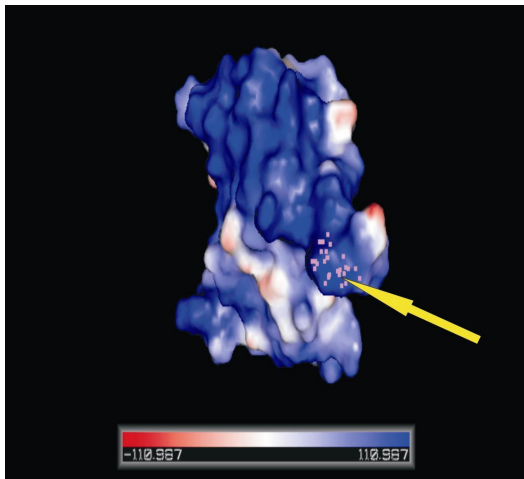


V237E

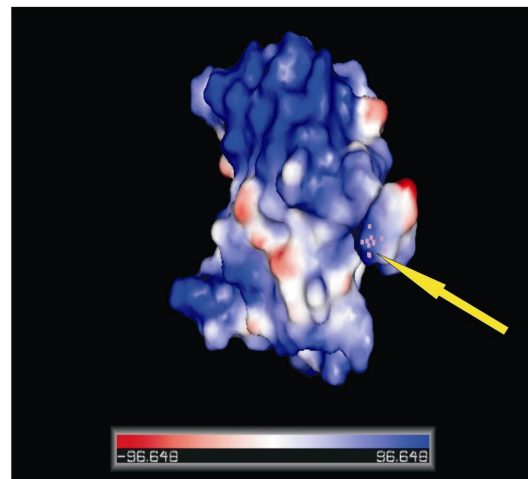


V237V

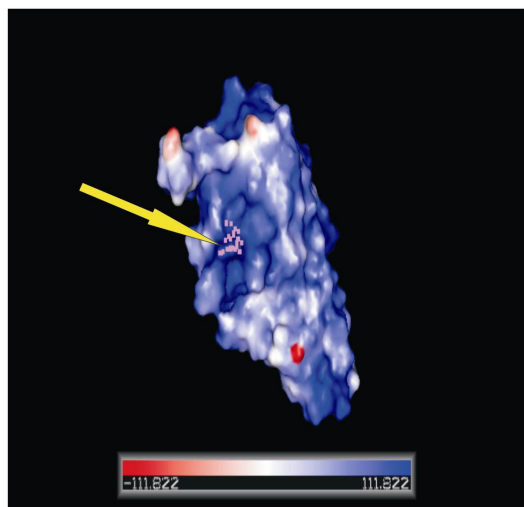
Kuva 26. CD40 ligandin elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen mutaatioiden myötä. Kuvassa esitetty mutaatioiden V126D ja V237E vaikutus verrattuna villityypin proteiiniin. V237E on esitetty kahdesta kulmasta, sillä mutaatio vaikuttaa pintoihin eri puolilla proteiinia. Villityypin proteiini on kuvattu vasemmalla samassa orientaatiossa kuin mutatoitunut proteiini.



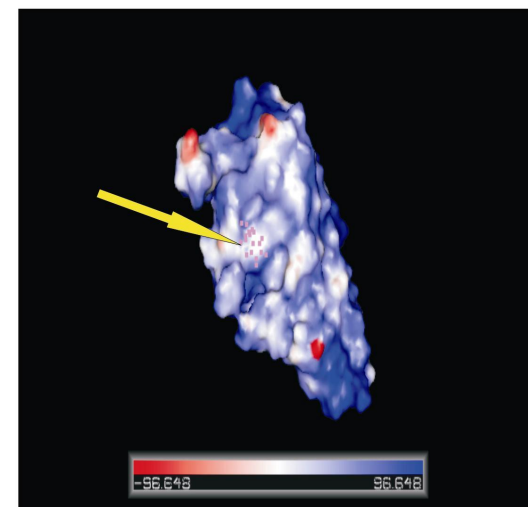
G116R



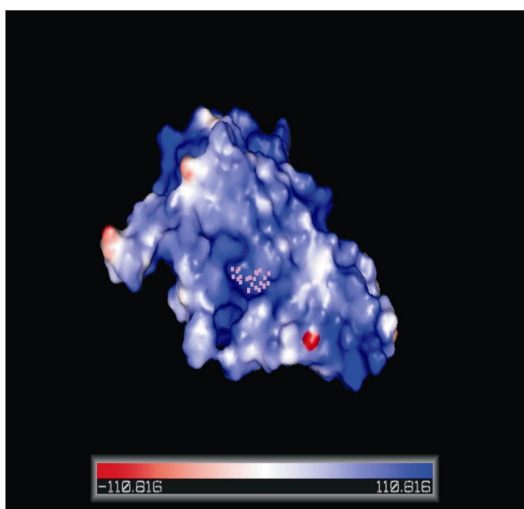
G116G



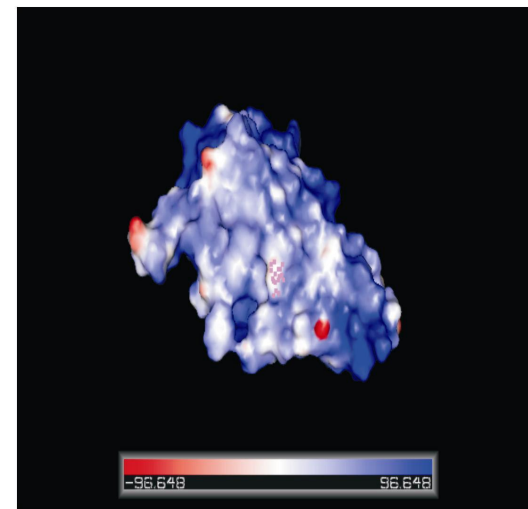
H125R



H125H

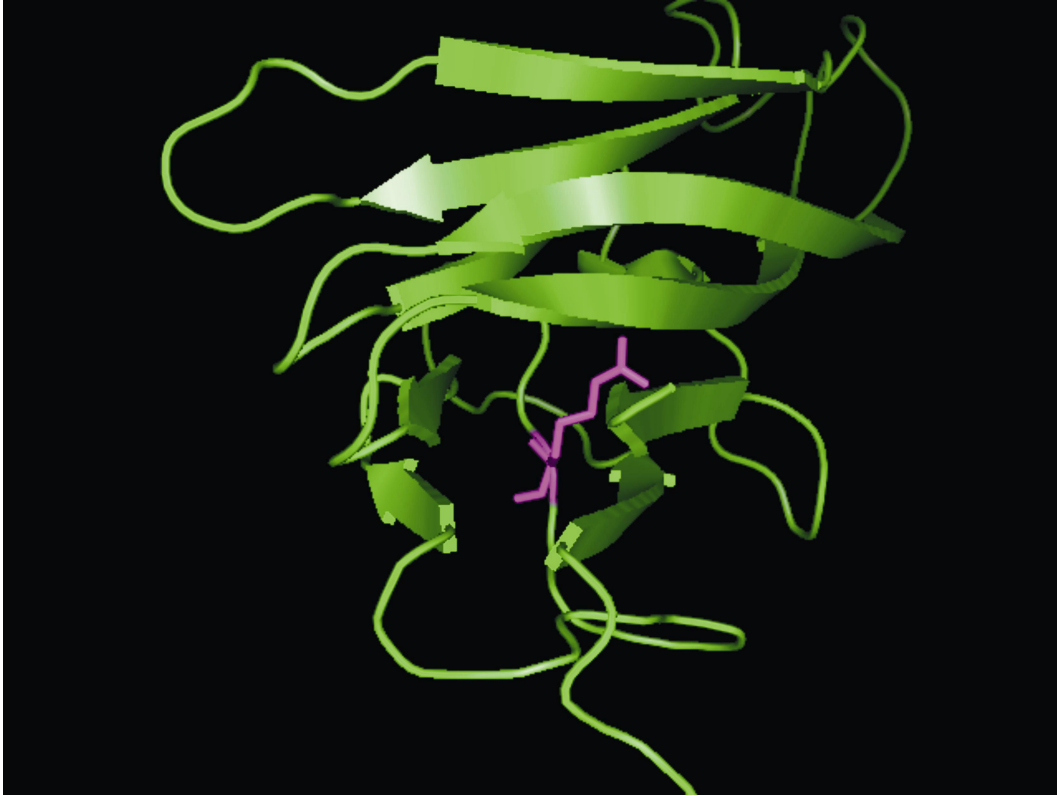


Q174R



Q174Q

Kuva 27. CD40L:n elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen positiivisemmaksi mutaatioiden myötä. Kuvassa esitetty mutaatioiden G116R, H125R ja Q174R vaikutus verrattuna villityypin (vasemmalla) proteiiniin. Värät samat kuin kuvassa 24. Pintapotentialit on laskettu PyMol-ohjelmalla (DeLano, 2002).



Kuva 28. R140 sijoittuu proteiinin sisäosiin, β -levyjen väliin. Siksi se ei vaikuta merkittävästi CD40L:n elektrostaattiseen pintapotentiaaliin.

5.2.4. Proteiini-proteiini -interaktioihin vaikuttavat mutaatiot

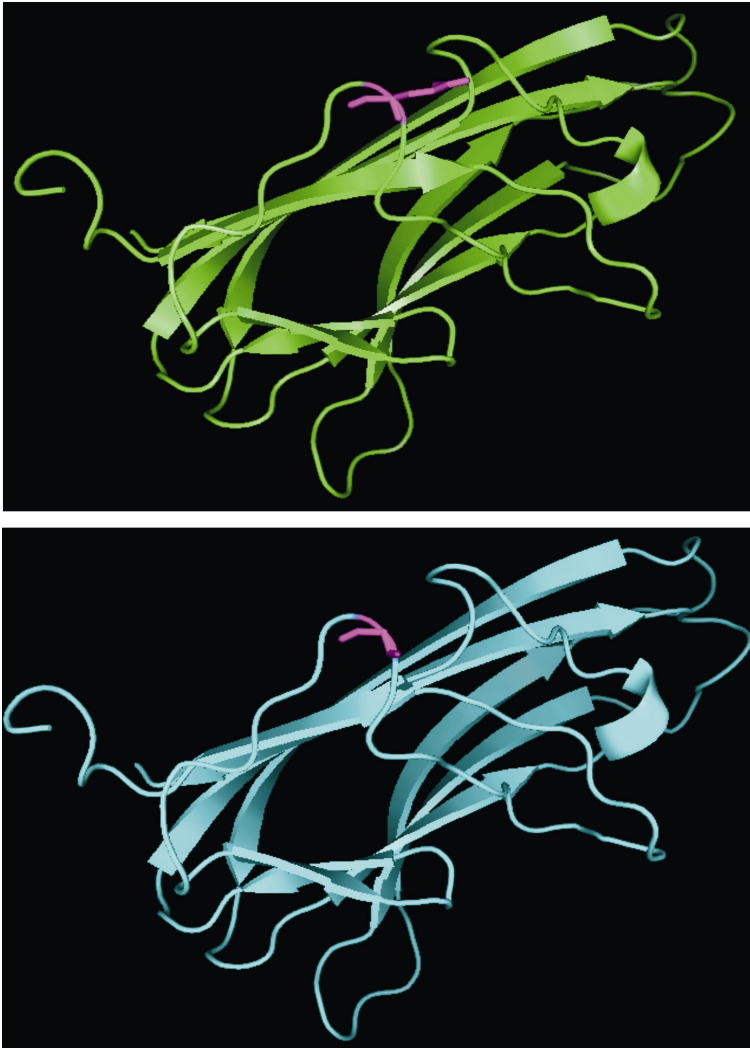
CD40 ligandin toiminta perustuu kahdenlaisiin proteiini-proteiini-interaktioihin. Vuorovaikutus reseptorin kanssa on olennainen signaalinsiirron kannalta, ja homotrimeerien muodostuminen mahdollistaa ligandi-reseptori-vuorovaikutuksen tapahtumisen (Karpusas *ym.*, 1995).

CD40L-CD40-interaktio perustuu pitkälti elektrostaattisiin interaktioihin, joissa CD40L:n emäksiset aminohapposivuketjut ovat vuorovaikutuksessa CD40:n happamien sivuketjujen kanssa. Reseptorin aminohappojen kanssa suolasilloja muodostavat CD40L:n K143, R203 ja R207 (Singh, *ym.*, 1998), joista mutaatioita on havaittu yhdessä (K143T).

K143T -mutaation myötä emäksinen aminohappo muuttuu polaariseksi, jolloin suolasillan muodostuminen reseptorin E66:n kanssa estyy. Lysiini 143:n mutatoituminen treoniiniksi aiheuttaa myös proteiinin elektrostaattisen pinnan muuttumisen negatiivisemmaksi laajalta alueelta, mikä myötävaikuttaa ligandi-reseptorikontaktin heikkenemiseen.

Ligandi-reseptori-interaktiossa happo-emäspareja muodostavien aminohappojen kontaktien lisäksi suoria kontakteja (raskaiden atomien etäisyys $<5\text{Å}$) muodostavat myös CD40L:n aminohapot I127, S128, E129, E142, G144, Y145, Y146, C178, S185, Q186, A187, R200, F201, C218, Q220, S248, H249, G250, T251 ja G252, joista missense-mutaatioita on havaittu vain yhdessä. Glysiini 144:n mutatoituessa glutamaatiksi (G144E) sivuketju muuttuu pelkästä vedystä pitkäksi ja negatiivisesti

varautuneeksi, mikä epäilemättä häiritsee spesifisen reseptori-ligandikontaktin muodostumista. Toisaalta glysiinin muuttuminen pitkäketjuiseksi aminohapoksi saattaa vähentää konformaationaalista vapautta estäen siten jyrkän käännöksen muodostumisen silmukkaan, jossa aminohappo sijaitsee (kuva 29), ja siten muuttamalla spesifisessä reseptorikontaktissa olennaisten naapuriensa (K143 ja Y145) asentoa. Myös CD40L:n rakenteen röntgensädekristallografisesti selvittäneet Karpusas ym. epäilivät G144:n substituution rajoittavan käännöksen muodostumista (*Karpusas ym., 1995*). Lisäksi mutaatio muuttaa proteiinin elektrostaattista pintapotentiaalia negatiivisemmaksi laajalta alueelta (Kuva 25), millä on lisävaikutuksensa.



Kuva 29. Aminohappo 144:n sijainti rakenteessa. Vihreä rakenne: CD40L, jossa mutatoitunut aminohappo 144 (E144). Sininen rakenne: villityypin CD40L. Molempiin rakenteisiin on korostettu aminohappo punaisella.

Homotrimeerien muodostumisessa olennaiset aminohapot ovat tyrosiini 170 ja histidiini 224 (*Karpusas, ym., 1995*), joissa molemmissa on todettu olevan XHIGM-syndrooman aiheuttavia mutaatioita (Y170C, H224Y). Molemmissa mutaatioissa aminohappojen polaarinen luonne säilyy, mutta spesifiset kontaktit trimeerien muodostumiseksi todennäköisesti estyvät.

Kompleksia stabiloivat aminohappokontaktit, kuten suolasillat ja vetysidokset, ovat myös tärkeitä CD40L:n trimerisaatiossa (*Karpusas ym., 1995; Morris ym., 1999*). Stabiloivia kontakteja muodostavat seuraavat aminohapot: Q121, H125, Y145, T147, Y172, Q174, L195, R203, L205, L206, R207, A208, A209, N210, T211, A215, G219, Q220, Q221, S222, L225, G226, G227, V228, F229, E230, T251, G252, F253, L259 ja L261 (*Bader ym., 2003; Karpusas ym., 2001*). Näistä mutaatioita on todettu seitsemässä: H125R, T147N, Q174R, L195P, A208D, G226A ja G227V.

5.2.5. Yhteenveto tuloksista

Kaikille CD40L:n substituutiomutaatioille saatiin tässä tutkimuksessa selitys. Mutaatiokohtaiset tulokset on esitetty taulukossa 5. M36R ja G38R –mutaatioiden vaikutuksia ei voitu tässä tutkia, mutta kirjallisuuden perusteella ne aiheuttavat CD40L:n eskpression alenemista (*Garber ym., 1999*).

Mutaatio	Vaikutukset proteiinin rakenteeseen / toimintaan
M36R	Ekspression aleneminen
G38R	Ekspression aleneminen
G116R	Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen. Rakenteen epäjärjestyneisyyden lisääntyminen. Mahdollisesti sopimattomuus rakenteeseen.
A123E	Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen.
H125R	Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen. Trimeerirakennetta stabiloivan aminohapon muuttuminen.
V126A	Tärkeiden hydrofobisten kontaktien väheneminen.
V126D	Tärkeiden hydrofobisten kontaktien väheneminen. Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen. Saattaa lisätä proteiimirakenteen epäjärjestyneisyyttä. Hydrofobisen ytimen stabiilisuuden väheneminen negatiivisen varauksen myötä.
W140R	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Hydrofobisten kontaktien väheneminen. Sopimattomuus rakenteeseen (törmäykset). Hydrofobisen ytimen stabiilisuuden väheneminen positiivisen varauksen myötä.
W140G	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Saattaa lisätä proteiimirakenteen epäjärjestyneisyyttä. Hydrofobisten kontaktien väheneminen.
W140C	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Hydrofobisten kontaktien väheneminen. Sopimattomuus rakenteeseen (törmäykset).
K143T	Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen. Reseptorin kanssa suorassa kontaktissa olevan aminohapon muuttuminen.
G144E	Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen. Reseptorin kanssa kontaktissa olevan aminohapon muuttuminen. Saattaa muuttaa silmukan orientaatiota siten, että siinä olevien aminohappojen kontaktit reseptorin kanssa estyvät.
T147N	Trimeerirakennetta stabiloivan aminohapon muuttuminen.

L155P	Saattaa lisätä proteiinirakenteen epäjärjestyneisyyttä. Pääketjun orientaatio todennäköisesti muuttuu.
Y170C	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Trimeerin muodostuksessa olennaisen aminohapon muuttuminen.
A173D	Sopimattomuus rakenteeseen (törmäykset). Tärkeiden hydrofobisten kontaktien väheneminen. Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen. Hydrofobisen ytimen stabiiliuden väheneminen negatiivisen varauksen myötä.
Q174R	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen. Trimeerirakennetta stabiloivan aminohapon muuttuminen.
T176I	Aggregoitumistaipumuksen lisääntyminen. Sopimattomuus rakenteeseen (törmäykset).
L195P	Pääketjun orientaatio todennäköisesti muuttuu. Trimeerirakennetta stabiloivan aminohapon muuttuminen.
A208D	Saattaa lisätä proteiinirakenteen epäjärjestyneisyyttä. Sopimattomuus rakenteeseen (törmäykset). Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen. Trimeerirakennetta stabiloivan aminohapon muuttuminen.
H224Y	Trimeerin muodostuksessa olennaisen aminohapon muuttuminen.
G226A	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Sopimattomuus rakenteeseen (törmäykset). Trimeerirakennetta stabiloivan aminohapon muuttuminen.
G227V	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Sopimattomuus rakenteeseen (törmäykset). Trimeerirakennetta stabiloivan aminohapon muuttuminen.
L231S	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Tärkeiden hydrofobisten kontaktien väheneminen.
A235P	Saattaa lisätä proteiinirakenteen epäjärjestyneisyyttä. Sopimattomuus rakenteeseen (törmäykset). Pääketjun orientaatio todennäköisesti muuttuu.
V237E	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Saattaa lisätä proteiinirakenteen epäjärjestyneisyyttä. Hydrofobisten kontaktien heikkeneminen. Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen. Hydrofobisen ytimen stabiilisuuden väheneminen negatiivisen varauksen myötä.
T254M	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Sopimattomuus rakenteeseen (törmäykset).
G257S	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Sopimattomuus rakenteeseen. Pääketjun liikkuvuuden rajoittuminen.
G257D	Konservoituneen aminohapon muuttuminen. Sopimattomuus rakenteeseen. Pääketjun liikkuvuuden rajoittuminen. Elektrostaattisen pintapotentialin muuttuminen.
L258S	Saattaa lisätä proteiinirakenteen epäjärjestyneisyyttä. Tärkeiden hydrofobisten kontaktien väheneminen.

Taulukko 6. *Yhteenveto CD40L:n substituutiomutaatioiden vaikutuksista proteiinin ominaisuuksiin.*

5.2.6. SNP R181P:n vaikutus proteiinin ominaisuuksiin

Substituutiomutaatioiden ohella tutkittiin myös R181P-polymorfian vaikutuksia proteiinin rakenteeseen ja toimintaan. R181P on ainoa CD40L:n tunnettu SNP, joka muuttaa aminohapon toiseksi proteiinin primaarirakenteessa. Kyseinen polymorfia on erityisen kiinnostava, sillä se muistuttaa sairausfenotyypin aiheuttavia mutaatioita L155P, L195P ja A235P. SNP:n ei todettu aiheuttavan merkittäviä muutoksia proteiinin ominaisuuksiin. Polymorfia sijaitsee silmukassa A3-C2, joka ei osallistu CD40L:n spesifisiin toimintoihin. Proliinisubstituutio toki muuttaa pääketjun orientaatiota, mutta koska R181P sijaitsee pitkän silmukan keskiosassa, sen aiheuttamalle konformaation muutokselle on tilaa, ja se kyetään ottamaan proteiinissa vastaan ilman siitä seuraavia vaikutuksia proteiinin toimintaan. Mutaatiot L155P ja L195P sijaitsevat β -säikeissä, joten ne muuttavat säikeiden orientaatiota ja mahdollisesti aiheuttavat sekundaarirakenteen stabiilisuuden vähenemistä (*Karpusas ym., 1995*). A235P sijoittuu silmukkaan, kuten R181P, mutta A235 edeltää suoraan β -säiettä C1, ja proliinin substituutio kyseessä olevaan paikkaan voi muuttaa seuraavan β -säikeen asentoa.

6. Pohdinta

Selkeä enemmistö sairauksia aiheuttavista mutaatioista vaikuttaa proteiinin rakenteelliseen stabiilisuuteen toiminnallisten aminohappojen muuttumisen sijaan (Wang & Moulton, 2001). Yksitoista CD40 ligandin 30:sta karakteroidusta missense-mutaatiosta voidaan luokitella toiminnallisiksi, sillä ne osallistuvat ligandi-reseptori-interaktioihin. Näistä mutaatioista seitsemän on kuitenkin rakenteellisessa roolissa kompleksin stabiloinnissa. Selkeä erottelu rakenteellisten ja toiminnallisten mutaatioiden välillä on kuitenkin mahdoton johtuen proteiinien rakenteen ja toiminnan kiinteästä yhteydestä.

TNF-perheessä, johon CD40L kuuluu, tyypin I ja II konservoituneisuus sekvenssitasolla on melko yleistä, mutta odotusten vastaisesti CD40 ligandin tiedossa olevista missense-mutaatioista vain 36% sijaitsee konservoituneilla alueilla. Kovarianssia on selkeästi havaittavissa perheen proteiineissa, tosin CD40 ligandissa kovarioivia aminohappoja ei juuri ole.

Homologisekvensseissä konservoituneet aminohapot ovat yleensä tärkeitä proteiinin rakenteen tai toiminnan kannalta, minkä johdosta sairauksia aiheuttavat mutaatiot sijoittuvat usein juuri konservoituneisiin aminohappoihin (Miller & Kumar, 2001). TNF-perheen proteiinit ovat rakenteellisesti konservoituneita – kaikki laskostuvat samantyyppisesti β -särkeistä koostuvaksi jelly roll –rakenteeksi kreikkalainen avain -topologialla. Proteiinin spesifinen toiminta perustuu kuitenkin enimmäkseen β -säikeitä yhdistävien silmukoiden aminohappoihin, ja silmukoiden pituus ja ominaisuudet vaihtelevatkin merkittävästi perheen proteiinien välillä (Karpusas *ym*, 1995). CD40L:n mutaatioista enemmistö kuitenkin muuttaa β -säikeiden aminohappoja toisiksi, mikä on ristiriidassa konservoituneisiin aminohappoihin vaikuttavien mutaatioiden vähyyden kanssa – mutaatiot β -säikeissä vaikuttavat useimmiten konservoituneen rakenteen muodon muutokseen ja epästabiloitumiseen, ja sitä kautta proteiinin toiminnan heikkenemiseen tai estymiseen.

Mutaatioiden vaikutuksia CD40L:n sekundaarirakenteisiin pyrittiin tutkimaan erilaisilla sekundaarirakennetta ennustavilla ohjelmilla. Ohjelmat ennustavat sekundaarirakenteet tyypillisesti oikein noin 70%:ssa tapauksista (Huang & Wang, 2002). Tässä tutkimuksessa päädyimme tulokseen, että yksittäiset substituutiomutaatiot eivät vaikuta sekvenssin paikalliseen luonteeseen niin merkittävästi, että nämä ohjelmat kytkenisivät luotettavasti ennustamaan mutaatioiden vaikutuksia. CD40L:n kohdalla ennustusohjelmien ongelmana oli, että ennustettu villityypin sekvenssin rakenne poikkesi merkittävästi proteiinin kokeellisesti määritetystä rakenteesta, ja lisäksi kaikki mutaatiosekvenssit tuottivat ennustetun rakenteen, joka oli villityypin ennustettua rakennetta ”parempi”, eli lähempänä todellista rakennetta.

Osa substituutiomutaatioista saattaa aiheuttaa proteiimirakenteen epäjärjestyneisyyttä tutkimuksemme perusteella. Selkeitä johtopäätöksiä on jälleen vaikea tehdä, sillä eri

ennustusohjelmien antamat tulokset poikkesivat toisistaan johtuen erilaisista tavoista laskea ja määrittellä epäjärjestyneisyyttä. Yleisesti oletetaan, että mutaation todennäköisyys lisätä epäjärjestyneisyyttä proteiinirakenteessa kasvaa sitä myöten, mitä useampi ohjelma ennustaa näin tapahtuvan. CD40 ligandin mutaatioiden vaikutuksia arvioidessamme sovelsimme tätä menetelmää.

Rakenteeseen perustuva tutkimus tuotti lisävaloa CD40L:n mutaatioiden aiheuttamiin muutoksiin proteiinin rakenteessa ja toiminnassa. Rakenneanalyysissä voitiin kuitenkin ottaa huomioon vain ne mutaatiot, jotka sijaitsevat proteiinin kokeellisesti määritetyssä osassa, jolloin analyysin ulkopuolelle jäivät transmembraaniosan mutaatiot M36R ja G38R, sekä ekstrasellulaarisessa uniikissa osassa sijaitseva mutaatio G116R.

Arginiinin sekvenssiin tuovien mutaatioiden voidaan kuitenkin olettaa vaikuttavan rakenteeseen merkittävästi, sillä etenkin glysiinien muuttuessa suuri sivuketju aiheuttaa mahdollisia pakkautumisongelmia. Positiivisesti varautunut sivuketju muuttaa todennäköisesti myös aminohappojen välisiä kontakteja, ja etenkin solukalvon läpäisevässä α -kierteessä pitkä, varauksellinen sivuketju voi aiheuttaa ongelmia kierteen stabiilisuuden ja membraaniin insertoitumisen kannalta. Bonifacinon ym. hypoteesin mukaan transmembraanikierteisiin substituoidut positiivisesti varautuneet aminohapot toimivat signaalina, joka ohjaa proteiinin hajotettavaksi endoplasmisessa retikulumissa (*Bonifacino ym., 1991*). Myöhemmin on kuitenkin todettu, että CD40L ilmenee solukalvolla huolimatta transmembraaniosan mutaatioista M36R ja G38R, tosin villityypin proteiiniin verrattuna vähäisessä määrin (ekspressiotaso 10% villityypin proteiinin ekspressiosta) (*Garber ym., 1999*). Luultavasti transmembraaniosan mutaatioiden kohdalla XHIGM-fenotyypin syynä on CD40L:n liian alhainen pitoisuus T-solun solukalvolla, mikä vähentää CD40L-CD40-interaktioiden määrää tai estää ne kokonaan.

Analysoiduista missense-mutaatioista 33%:n todettiin aiheuttavan rakenteellisia muutoksia proteiiniin Probe-pistemäärän perusteella rotameerianalyysissä (Ks. tulokset, taulukko 2). Alhaisen pistemäärän aminohapot eivät missään konformaatiossa mahdu kohdalleen, mikä johtaa väistämättä rakenteen uudelleenjärjestelyyn jo proteiinin laskostuessa. Visuaalisessa tarkastelussa pahoja törmäyksiä aiheuttavat aminohapot saavat aikaan myös proteiinirakenteen muuttumista ainakin paikallisesti. Rakenteen hienovaraisetkin muutokset saattavat vaikuttaa proteiini-proteiini-interaktioihin, ja estää niiden spesifisen tapahtumisen. Aiheutuvia muutoksia on kuitenkin vaikea ennustaa tarkasti, sillä mutaatio saattaa häiritä proteiinin laskostumista jo alkuvaiheessa, ja toisaalta pieniä, paikallisiakaan päätetyn orientaation muutoksia ei kyetä luotettavalla tavalla ennustamaan.

Proteiinin laskostumisen ja stabiilisuuden kannalta hydrofobisen ytimen aminohappojen väliset kontaktit ovat hyvin tärkeitä. Kahdeksan CD40L:n substituutimutaatiota aiheuttaa ytimessä sijaitsevien, useita voimakkaita kontakteja muodostavien aminohappojen muutoksen myötä stabiilisuuden heikkenemistä.

Niin mutanti- kuin villityypin proteiineille lasketut elektrostaattiset pintapotentialit on tarkoitettu käytettäväksi vain kvalitatiivisesti, sillä PyMol-ohjelman koodi ei ota huomioon liuottimen dielektristä vakiota. Näin ollen tulokset ovat suuntaa antavia. (*DeLano, 2002*) Elektrostaattinen pintapotentiali on erittäin tärkeä CD40L:n ominaisuus, sillä ligandi-reseptori-interaktiot perustuvat pitkälti molekyylien

vastakaisiin varauksiin (*Singh ym., 1998*). Siksi tuloksilla kuitenkin merkitystä, etenkin kun muutokset potentiaalissa olivat useiden aminohapposubstituutioiden kohdalla hyvin selkeitä. Erityisesti potentiaalia positiivisemmaksi aiheuttavien mutaatioiden voidaan ajatella vähentävän CD40L:n affiniteettiä reseptorilleen, sillä CD40L:n negatiivinen ja CD40:n positiivinen pinta vetävät toisiaan puoleensa (*Singh ym., 1998*).

Rakenteeseen perustuvissa tutkimuksissa on myös otettava huomioon, että PDB-rakenne, jota käytetään mutaatioiden mallittamisen templaattina, on vain staattinen kuva todellisen rakenteen konformaatiosta tietyssä ajassa ja paikassa. Myös kiteiden tuottamisessa käytetyt olosuhteet vaikuttavat proteiinin konformaatioon, varaukseen sekä aminohappojen välisiin kontakteihin ja sidoksiin. Siksi etenkin yksityiskohtia mallitettaessa ja tutkiessa on syytä suhtautua proteiimirakenteeseen ja sen muutoksiin tietyllä varauksella.

7. Johtopäätökset

Perinnöllisen sairauden rakenteellinen perusta voitaisiin luotettavimmin selvittää tuottamalla kaikille mutanttiproteiineille kiderakenteet, jotta saataisiin tarkalleen selville, miten rakenne tarkalleen ottaen muuttuu mutaation myötä. Työläytensä vuoksi tehtävä on kuitenkin saavuttamattomissa, ja transmembraaniproteiinien kohdalla usein mahdoton. Lisäksi olisi tarpeellista selvittää ekspressiokokein, muuttuuko mutanttiproteiinin ilmentäminen solussa, ja tutkia biokemiallisin menetelmin, onnistuuko kompleksinmuodostus mutanttiproteiinien välillä. Niin mittavia tutkimusprojekteja harvoin toteutetaan yksittäisille proteiineille, että kaikki proteiineissa esiintyvät mutaatiot analysoidaisiin kokeellisesti kaikista näkökulmista. Siksi mutaatioiden vaikutusten analysointi *in silico* -menetelmin on suotavaa ja hyödyllistä.

Tutkimuksen päätavoitteena oli mutaatioanalyysin keinoin selvittää substituutiomutaatioista johtuvan XHIGM:n molekulaarinen perusta, ja kaikki tässä tutkimuksessa analysoidut CD40 ligandin sairausfenotyypin aiheuttavat substituutiomutaatiot voitiin sekvenssi- ja rakenneanalyysin keinoin selittää molekyyllitasolla. Kiinnostavaa jatkoa tutkimukselle olisi selvittää mutaatioproteiinien ekspressiotasoa esimerkiksi immunokemiallisin menetelmin – siten saataisiin lisätodisteita mutaatioiden ekspressiota alentaville vaikutuksille, kuten aggregoitumistaipumuksen ja epäjärjestyneisyyden lisääntymiselle.

Toisena tavoitteena tutkimuksessa oli päivittää CD40Lbase –mutaatiotietokantaa uusilla mutaatioilla. Tätä nykyä tietokannassa on 199 potilastapausta ja 104 erilaista mutaatiota. Lisäksi tietokantaan lisättiin 34 SNP:a, joista neljä sijaitsee geenin koodaavalla alueella. Yksi polymorfia aiheuttaa aminohapon muuttumisen toiseksi translaatioissa (R181P) muistuttaen sikäli substituutiomutaatiota. Polymorfia kuitenkin eroaa mutaatiosta siten, että se ei aiheuta sairausfenotyyppiä. Tutkittaessa ei-synonyymisen SNP:n vaikutuksia proteiinin rakenteeseen ja toimintaan, havaittiin substituution olevan sikäli neutraali, että se ei vaikuta tutkimuksessa huomioon otettuihin proteiinin ominaisuuksiin merkittäväällä tavoin.

Tutkimuksessa saatiin myös tietoa siitä, kuinka hyvin käytetyt ohjelmat soveltuvat mutaatioiden analysointiin. Monien ennustusohjelmien kohdalla ongelmaksi muodostui niiden erilaisuus – koska ohjelmia on kehitetty eri tavoin ja erilaisin perustein, ne antavat vaikeasti vertailtavia tuloksia. Katsoimme kuitenkin parhaaksi tämän tyyppisessä tutkimuksessa luottaa sellaiseen tulokseen, jonka enemmistö ohjelmista ennustaa.

XHIGM:n aiheuttavia mutaatioita on paljon ja ne ovat moninaisia. Jotta taudin molekulaarinen perusta saataisiin kokonaisuudessaan selvitettyä, olisi tulevaisuudessa tarpeellista tutkia myös intronien ja säätelyalueiden mutaatioiden vaikutuksia CD40L:n translaatioon ja toimintaan.

Lähdeluettelo

- Afonnikov DA, Kondrakhin YV, Titov II. Revealing correlated amino acid positions in the DNA-binding regions of the CREB and AP-1 transcription factor families. *Molecular Biology*, 1997; 31(4): 631-637.
- Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, Bedell MA, Edelhoff S, Disteché CM, Simoneaux DK, Fanslow WC, Belmont J, Spriggs MK. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science*, 1993; 259: 990-993.
- Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, Clark EA, Smith CA, Grabstein KH, Cosman D, Spriggs MK. Molecular and biological characterization of murine ligand for CD40. *Nature*, 1992; 357: 80-82.
- Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 1993; 72(2): 291-300.
- Bader GD, Betel D, Hogue CW. BIND: the Biomolecular Interaction Network Database. *Nucleic Acid Res.*, 2003; 31(1): 248-250.
- Bajorath J, Chalupny NJ, Marken JS, Siadak AW, Skonier J, Gordon M, Hollenbaugh D, Noelle RJ, Ochs HD, Aruffo A. Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor–ligand interaction. *Biochemistry*, 1995; 34: 1833–1844.
- Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer ELL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32: D138-D141.
- Beadle BM, Shoichet BK. Structural bases of stability-function tradeoffs in enzymes.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 2000; 28: 235-242.
- Betts MJ, Russell. Amino acid properties and consequences of substitutions. *Bioinformatics for geneticists*. Barnes MR, Gray IC eds. Wiley, 2003.
- Bishop GA, Hostager BS. The CD40-CD154 interaction in B cell - T cell liaisons. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003; 14: 297-309.
- Bross P, Corydon TJ, Andersen BS, Jorgensen MM, Bolund L, Gregersen N. Protein misfolding and degradation in genetic diseases. *Human mutation*, 1999; 14: 186-198.
- Burdin N, Peronne C, Banchereau J, Rousset F. Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. *J. Exp. Med*, 1993; 177(2): 295-304.
- Casamayor-Palleja M, Khan M, MacLennan I. C. A subset of CD4+ memory T cells contains preformed CD40 ligand that is rapidly but transiently expressed on their surface after activation through the T cell receptor complex. *J. Exp. Med.*, 1995; 181: 1293–1301.
- Castle BE, Kishimoto K, Streans C, Brown ML, Kehry MR. Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes. *J. Immunol.*, 1993; 151: 1777–1788
- CD40Lbase -tietokanta, <http://bioinf.uta.fi/CD40Lbase/>.
- Cham B, Bonilla MA, Winkelstein J. Neutropenia associated with primary immunodeficiency syndromes. *Semin. Hematol.*, 2002; 39: 107-12.
- Chasman D, Adams RM. Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: Structure-based assessment of amino acid variation. *J. Mol. Biol.*, 2001; 307: 683-706.

- Chiti F, Stefani M, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature*, 2003; 424: 805-809.
- Clark EA, Ledbetter JA. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigen, Bp35 and Bp50. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986; 83:4494-4498.
- Clark EA, Shu G. Association between IL-6 and CD40 signaling. IL-6 induces phosphorylation of CD40 receptors. *J. Immunol.*, 1990; 145(5): 1400-1406.
- Clarke ND. Covariation of residues in the homeodomain sequence family. *Protein Science*, 1995; 4 (11): 2269-2278.
- Coico R, Sunshine G, Benjamini E. *Immunology – a short course*. John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey, 2003; ss.129-134.
- Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol.* 1999; 93: 190-7.
- Cuff, J. A., Clamp, M. E., Siddiqui, A. S., Finlay, M. and Barton, G. J. Jpred: A Consensus Secondary Structure Prediction Server. *Bioinformatics*, 1998; 14:892-893
- Cuff, J. A. and Barton, G. J. Application of Enhanced Multiple Sequence Alignment Profiles to Improve Protein Secondary Structure Prediction. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 2000; 40:502-511
- Cunningham CK, Bonville CA, Ochs HD, Seyama K, John PA, Rotbart HA, Weiner LB. Enteroviral meningoencephalitis as a complication of X-linked hyper IgM syndrome. *J. Pediatr.* 1999;134:584-8.
- dbSNP -tietokanta, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
- DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA, 2002. <http://www.pymol.org>
- Dill KA, Chan HS. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol*, 1997; 4(1): 10-19.
- Dima RI, Thirumalai D. Proteins associated with diseases show enhanced sequence correlation between charged residues. *Bioinformatics*, 2004; 20 (15): 2345-2354.
- Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradovic Z. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry*, 2002; 41: 6573-6582.
- Dustin ML. The immunological synapse. *J Clin Immunol.*, 2001; 21(4):258-63.
- Etzioni A, Ochs HD. The hyper IgM syndrome – an evolving story. *Pediatric Research* 2004; 56:519-525.
- Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat Biotechnol e-pub*, 2004.
- Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF, Beckman MP, Park LS, Schooley K, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.*, 1990; 8:303.
- Foy TM, Laman JD, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Noelle RJ. Gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and development of B cell memory. *J. Exp. Med*, 1994; 180: 157-163.
- Fuleihan R, Ramesh N, Horner A, Ahern D, Belshaw PJ, Alberg DG, Stamenkovic I, Harmon W, Geha RS. Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *J Clin Invest.*, 1994; 93: 1315-20.
- Garber E, Su L, Ehrenfels B, Karpusas M, Hsu Y-M. CD154 variants associated with hyper-IgM syndrome can form oligomers and trigger CD40-mediated signals. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999; 274(47): 33545-33550.
- Gauchat JF, Aubry JP, Mazzei G, Life P, Jomotte T, Elson G, Bonnefoy JY. Human CD40-ligand: molecular cloning, cellular distribution and regulation of expression by factors controlling IgE production. *FEBS Lett.*, 1993; 315: 259-266.

- Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL et al. Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature*, 1994; 370: 555–557.
- Gilbert SF. *DevBio. A companion to Developmental Biology*, 7th edition, Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, MA, USA, 2003.
<http://www.devbio.com/article.php?ch=22&id=215>.
- Graf D, Muller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation, *Eur. J.Immunol.*, 1995; 25: 1749-1754.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. 1999. The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; 285: 221–27.
- Hamill SJ, Cota E, Chothia C, Clarke J. Conservation of folding and stability within a protein family: the tyrosine corner as an evolutionary cul-de-sac. *J Mol Biol.*, 2000; 295:641-9.
- Harigai M, Hara M, Kawamoto M, Kawaguchi Y, Sugiura T, Tanaka M, Nakagawa M, Ichida H, Takagi K, Higami-Ohsako S, Shimada K, Kamatani N. Amplification of the synovial inflammatory response through activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κ B using ligation of CD40 on CD14⁺ synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2004; 50(7): 2167-77.
- Hollenbaugh D, Grosmaire RS, Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J.*, 1992; 11: 4313–4321.
- Hollenbaugh D, Ochs HD, Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A. The role of CD40 and its ligand in the regulation of the immune response. *Immunological Reviews*, 1994; 138: 23-37.
- Huang JT, Wang MT. Secondary structural wobble: the limits of protein prediction accuracy. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2002; 294(3): 621-5.
- Jacobsohn DA, Emerick KM, Scholl P, Melin-Aldana H, O’Gorman M, Duerst R, Kletzel M. Nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplant for X-linked hyper-immunoglobulin m syndrome with cholangiopathy. *Pediatrics*, 2004; 113: e122-7.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. Garland Publishing, New York, 2001; ss.341-377.
- Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, 1999; 292: 195-202.
- Kroczeck RA, Graf D, Brugnoli D, Giliani S, Korthauer U, Ugazio A, Senger G, Mages HW, Villa A, Notarangelo LD. Defective expression of CD40 ligand on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)". *Immunol Rev.*, 1994;138: 39-59.
- Karpusas M, Hsu Y-M, Wang J, Thompson J, Lederman S, Chess L, Thomas D. 2Å crystal structure of an extracellular fragment of human CD40 ligand. *Structure*, 1995; 3(10): 1031-1039.
- Karpusas M, Lucci J, Ferrant J, Benjamin C, Taylor FR, Strauch K, Garber E, Hsu Y-M. Structure of CD40 ligand in complex with the Fab fragment of a neutralizing humanized antibody. *Structure*, 2001; 9:321-329.
- Khandekar SS, Silverman C, Wells-Marani J, Bacon AM, Birrell H, Brigham-Burke M, DeMarini D, Jonak ZL, Camilleri P, Fishman-Lobell J. Determination of carbohydrate structures N-linked to soluble CD154 and characterization of the interactions of CD40 with CD154 expressed in *Pichia pastoris* and Chinese hamster ovary cells. *Protein Expression and Purification*, 2001; 23:301-310.
- Kindler V, Matthes T, Jeannin P, Zubler RH. Interleukin-2 secretion by human B lymphocytes occurs as a late event and requires additional stimulation after CD40 cross-linking. *Eur. J. Immunol.*, 1995; 25(5): 1239-1243.
- Kupfer A, Singer SJ. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions. *Immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples*. *Annu. Rev. Immunol.*, 1988; 7: 309.

- Lee B, Richards FM. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol.* 1971; 55(3): 379-400.
- Li, X, Romero P, Rani M, Dunker AK, Obradovic Z. Predicting protein disorder for N-, C-, and internal regions. *Genome Informatics*, 1999; 10:30-40.
- Ling L, Cao Z, Goeddel DV. NF-kappaB inducing kinase activates IKK- α by phosphorylation of Ser-176. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998; 95: 3792-7.
- Linding R, Jensen LJ, Diella F, Bork P, Gibson TJ, Russell RB. Protein disorder prediction: Implications for structural proteomics. *Structure*, 2003a; 11:1453-9.
- Linding R, Russell RB, Neduva V, Gibson TJ. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res.* 2003b; 31: 3701-8.
- Linding R, Schymkowitz J, Rousseau F, Diella F, Serrano L. A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol.*, 2004: 345-353.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies. *Cell*, 2001; 104(4): 487-501.
- Lopez-Granados E, Cambronero R, Ferreira A, Fontan G, Garcia-Rodriguez MC. Three novel mutations reflect the variety of defects causing phenotypically diverse X-linked hyper-IgM syndrome. *Clin Exp Immunol.*, 2003; 133: 123-31.
- Ludewig B, Henn V, Schroder JM, Graf D, Kroczeck RA. Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4⁺ CD45RA⁺ T cells with dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 1996; 26: 3137-3143.
- Markiewicz P, Kleina LG, Cruz C, Ehret S, Miller JH. Genetic studies of the lac repressor XIV. Analysis of 4000 altered *Escherichia Coli* lac repressors reveals essential and non-essential residues, as well as "spacers" which do not require a specific sequence. *J. Mol. Biol.*, 1994; 240(5): 421-433.
- McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC Jr, Boyer CM, Champion B, Connolly KM, Conway JG, Furdon P, Karp S, Kidao S et al. Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature*, 1994; 370: 558-561
- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 2000; 16: 404-405.
- Miller MP, Kumar S. Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation. *Hum Mol Genet.*, 2001; 10:2319-28.
- Mirny LA, Shakhnovich EI. Universally conserved positions in protein folds: reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function. *J Mol Biol.*, 1999; 29: 177-96.
- Morris AE, Remmele RL Jr, Klinke R, Macduff BM, Fanslow WC, Armitage RJ. Incorporation of an isoleucine zipper motif enhances the biological activity of soluble CD40L (CD154). *J Biol Chem.*, 1999; 274: 418-423.
- National Primary Immunodeficiency Resource Center, <http://www.info4pi.org/>.
- Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992; 89: 6550-6554.
- Nonoyama S, Hollenbaugh D, Aruffo A, Ledbetter JA, Ochs HD. B cell activation via CD40 is required for specific antibody production by antigen-stimulated human B cells. *J. Exp. Med.*, 1993; 178: 1097-1102.
- Norcross MA. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann. Immunol.*, 1984; 135D: 113-134
- Notarangelo LD, Duse M, Ugazio AG. Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM). *Immunodef. Rev.*, 1992; 3: 101-21.
- Notarangelo LD, Peitsch MC, Abrahamsen TG, Bachelot C, Bordigoni P, Cant AJ, Chapel H, Clementi M, Deacock S, de Saint Basile G, Duse M, Espanol T, Etzioni A, Fasth A, Fischer A, Giliani S, Gomez L, Hammarström L, Jones A, Kanariou M, Kinnon C, Klemola T, Koczek RA, Levy J, Matamoros N, Monafò V, Paolucci P, Reznick I, Sanal O, Smith CIE,

- Thompson RA, Tovo P, Villa A, Vihinen M, Vossen J, Zegers BJM, Ochs H, Conley ME, Iseki M, Narayanaswamy R, Shimadzu M, Saiki O. CD40Lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunol. Today*, 1996; 17(11): 511-516.
- O'Neill Shigeoka A. X-linked Immunodeficiency with hyper IgM. www.emedicine.com; 2002.
- Pande VS. A Universal TANGO? *Nat. Biotechnol.*, 2004; 10:1302-1306.
- Peitsch MC, Jongeneel CV. A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact trimer similar to the tumor necrosis factors. *Int. Immunol.*, 1993; 5: 233-238
- Pilia G, Porta B, Padayachee M, Malcolm S, Zucchi I, Villa A, Macchi P, Vezzoni P, Schlessinger D. Human CD40L gene maps between DXS144E and DXS300 in Xq26. *Genomics*, 1994; 22: 249-251.
- Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, Pinchuk GV, Norsen JP, Clark EA. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J. Immunol.*, 1996; 157: 4363-4370.
- Poteete AR, Rennell D, Bouvier SE. Functional significance of conserved amino acid residues. *Proteins*, 1992; 13(1): 38-40.
- Ramos CH, Ferreira ST. Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. *Protein Pept Lett.*, 2005; 12: 213-222.
- Razanajaona D, van Kooten C, Lebecque S, Bridon JM, Ho S, Smith S, Callard R, Banchereau J, Briere F. Somatic mutations in human Ig variable genes correlate with a partially functional CD40-ligand in the X-linked hyper-IgM syndrome. *J. Immunol.* 1996; 157: 1492-8.
- Richardson Laboratory, Duke University. <http://kinemage.biochem.duke.edu/>.
- Romero P, Obradovic Z, Dunker AK. Sequence data analysis for long disordered regions prediction in the calcineurin family. *Genome Informatics*, 1997; 8:110-124.
- Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner E, Brown C, Dunker AK. Sequence complexity of disordered protein. *Proteins: Struct. Funct. Gen.*, 2001; 42:38-48.
- Rosen FS, Kevy SV, Merler E, Janeway CA, Gitlin D. Recurrent bacterial infections and dysgammaglobulinemia: deficiency of 7S gammaglobulins in the presence of elevated 19S gammaglobulins. *Pediatrics*, 1961; 28: 182-195.
- Roy M, Waldschmidt T, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal and cloned CD4+ T cells. *J. Immunology*, 1995; 151: 2497-2510.
- Schubert LA, Cron RQ, Cleary AM, Brunner M, Song A, Lu L-S, Jullien P, Krensky AM, Lewis DB. A T Cell-specific Enhancer of the Human CD40 Ligand Gene. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 7386-95
- Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci.*, 2001;58(1):4-43.
- Schwartz RH. A cell culture model for lymphocyte clonal anergy. *Science*, 1990; 248: 1349-1356.
- Schaeffer EM, Schwartzberg PL. Tec family kinases in lymphocyte signaling and function. *Curr. Opin. Immunol*, 2000; 12: 282-288.
- Shen B, Vihinen M. RankViaContact: ranking and visualization of amino acid contacts. *Bioinformatics*, 2003; 19: 2161-2162
- Shen B, Vihinen M. Conservation and covariance in PH domain sequences: physicochemical profile and information theoretical analysis of XLA-causing mutations in the Btk PH domain. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2004; 17:267-276
- Singh J, Garber E, van Vlijmen H, Karpusas M, Hsu Y-M, Zheng Z, Naismith JH, Thomas D. The role of polar interactions in the molecular recognition of CD40L with its receptor CD40. *Protein Science*, 1995; 7: 1124-1135.
- Suckow J, Markiewicz P, Kleina LG, Miller J, Kisters-Woike B, Muller-Hill B. Genetic studies of the Lac repressor XV: 4000 single amino acid substitutions and analysis of the resulting phenotypes on the basis of the protein structure. *J. Mol. Biol.*, 1996; 261(4): 509-523.

- Stefani M. Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim Biophys Acta.*, 2004; 1739(1): 5-25
- Steward A, Adhya S, Clarke J. Sequence conservation in Ig-like domains: the role of highly conserved proline residues in the fibronectin type III superfamily. *J Mol Biol.*, 2002;318:935-40.
- Sobolev V, Sorokine A, Prilusky J, Abola EE, Edelman M. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics.* 1999; 15(4): 327-32.
- Tahara M, Pergolizzi RG, Kobayashi H, Krause A, Luettich K, Lesser ML, Crystal RG. Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM-linked immunodeficiency. *Nature Medicine*, 2004; 10(8): 835-841.
- The SNP Consortium Ltd. <http://snp.cshl.org/>.
- Tsitsikov EN, Ramesh N, Geha RS. Structure of the murine CD40 ligand gene. *Mol Immunol.* 1994; 12: 895-900.
- Tsitsykova AV, Tsitsikov EN, Geha RS. The CD40L promoter contains nuclear factor of activated T cells-binding motifs which require AP-1 binding for activation of transcription. *J Biol Chem.*, 1996; 16; 271: 3763-70.
- Villa A, Notarangelo LD, Di Santo JP, Macchi PP, Strina D, Frattini A, Lucchini F, Patrosso CM, Giliati S, Mantuano E, Agosti S, Nocera G, Kroczeck RA, Fischer A, Ugazia AG, de Saint Basile G, Vezzoni P. Organization of the human CD40L gene: Implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994; 91: 2110-2114.
- Vriend G. WHATIF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph*, 1990; 8: 52-56
- Yin L, Wu L, Wesche H, Arthur CD White JM, Goeddel DV, Schreiber RD. Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science*, 2001; 291: 2162-5.
- Yuasa T, Ohno S, Kehrl JH, Kyriakis JM. Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273(35): 22681-92.
- Wang WC, Cordoba J, Infante AJ, Conley ME. Successful treatment of neutropenia in the hyper-immunoglobulin M syndrome with granulocyte colony-stimulating factor. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 1994; 16(2): 160-163.
- Wang Z, Moulton J. SNPs, protein structure and disease. *Hum Mutat.*, 2001; 17: 263-270.
- Ward JJ, McGuffin LJ, Bryson K, Buxton BF, Jones DT. The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics*, 2004; 20: 2138-2139.
- Winkelstein JA, Marino MC, Ochs H, Fuleihan R, Scholl PR, Geha R, Stiehm ER, Conley ME. The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. *Medicine*, 2003; 82: 373-84.
- Word JM, Lovell SC, La Bean TH, Taylor HC, Zalis ME, Presley BK, Richardson JS, Richardson DC. Visualizing and quantifying molecular goodness-of-fit: small-probe contact dots with explicit hydrogen atoms. *J. Mol. Biol.*, 1999a; 285(4): 1711-33.
- Word JM, Lovell SC, Richardson JS, Richardson DC. Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of side chain amide orientation. *J. Mol. Biol.*, 1999b; 285(4): 1735-1747.
- Word JM, Bateman RC Jr, Presley BK, Lovell SC, Richardson DC. Exploring steric constraints on protein mutations using MAGE/PROBE. *Protein Science*, 2000; 9: 2251-9.
- Worm M, Geha RS. Activation of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin alpha via anti-CD40 in human B cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1995; 107(1-3): 368-369

- Worm M, Ebermayer K, Hernz B. Lymphotoxin alpha is an important autocrine factor for CD40 interleukin-4-mediated B-cell activation in normal and atopic donors. *Immunology*, 1998; 94(3): 395-402.
- Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol.*, 1999; 293: 321-331.
- Wykes M, Poudrier J, Lindstedt R, Gray D. Regulation of cytoplasmic, surface and soluble forms of CD40 ligand in mouse B cells. *Eur. J. Immunol.*, 1998; 28: 548-55
- Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, Schaffer A, Casali P. CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct S mu \rightarrow S alpha and sequential S mu \rightarrow S gamma, S gamma \rightarrow S alpha DNA recombination. *J. Immunol.*, 1998; 161(10): 5217-5225.
- Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity*, 1994; 5: 423-431.
- Zhang G. Tumor necrosis family ligand-receptor binding. *Curr Opin Struct Biol.*, 2004; 14: 154-160.

LIITE 1: SEKVENSISIRINNASTUKSET

A) Rinnastus koko sekvenssin pituudelta

```

TNF5_HUMAN -----MIETYNOTSPRSAAATGLPI SMKIF -----MYLLTVFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNTGERSLS--LLNCEEIKSOFEGF-----
TNF5_MACAC -----MIETYNOTSPRSAAATGLPVRMKIF -----MYLLTIFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNTGERSLS--LLNCEEIKSOFEGF-----
TNF5_MACAC -----MIETYNOTSPRSAAATGLPVRMKIF -----MYLLTIFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNTGERSLS--LLDCEEIKSOFEGF-----
TNF5_AOTUS -----MVETIHOPAPRSAAATGLPVRMKIF -----MYLLTVFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNTGERSLS--LLNCEEIKSOFEGF-----
TNF5_CALLI -----MIETYNOTVPRSAATGPPVSMKIF -----MYLLTVFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNTGERSLS--LLNCEEIKSOFEGF-----
TNF5_COW/1 -----MIETYNOTSPRSVAAGPPVSMKIF -----MYLLTVFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNKGEGLS--LLNCEEIRSRFEDL-----
TNF5_PIG/1 -----MIETYNOTSPRSVAAGPPVSMKIF -----MYLLTVFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNKGEGLS--LLNCEEIRSRFEDL-----
TNF5_CAT/1 -----MIETYNOTAPRSVAAGPPVSMKIF -----MYLLTVFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNKGEGLS--LLNCEEIKSRFEAF-----
TNF5_DOG/1 -----MIETYNOTAPRSVAAGPPVSMKIF -----MYLLTVFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNKGEGLS--LLNCEEIKSOFEAF-----
TNF5_MOUSE -----MIETYNOTSPRSVAAGPPVSMKIF -----MYLLTVFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNKGEGLS--LLNCEEIKSRFEAF-----
TNF5_RAT/1 -----MIETYNOTSPRSVAAGPPVSMKIF -----MYLLTVFLITOMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIORCNKGEGLS--LLNCEEIKSOFEAF-----
TNF5_CHICK -----MNEAYSPAAPRPMGTSPTSMTKMF -----MFLSVFMVVTIGTVLFCLYLHMKMDKMEVLSLNEDYIFLRKVQKQOTGEDQKST--LLDCEKVLKGFQDLQ-----
TNFA_DOG/7 -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSRRC -----FCLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-NGLQLI-----
TNFA_CAT/7 -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LCLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-HGLQLI-----
TNFA_HUMAN -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LFLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-RDLSLI-----
TNFA_CHIMP -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LFLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-RDLSLI-----
TNFA_PAPIO -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LFLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-KDPSLI-----
TNFA_MACFA -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LFLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-KDPSLI-----
TNFA_SQMON -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LFLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-KDPSLI-----
TNFA_HORSE -----IRDVELAEEELAKKAGGPPGSGRC -----WFLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-QSRDFSPI-----
TNFA_LAMA/ -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LCLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-PNPFQSI-----
TNFA_CAMEL -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LCLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-TGLQIM-----
TNFA_SQUIR -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LCLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-TGLQLM-----
TNFA_WOODC -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LCLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-NNLPLS-----
TNFA_RABBI -----IRDVELAEEELPKKAGGPPGSGRC -----LCLSLFSLFLLVAGATTLFCLLHFGVIGPQREELP-NNLPLS-----
LTB_WOODCH -----LQGRGGRPOGTGCLLLAVAGATSL -----VTLLLAVPITVLAVALVPEQOGLVMSAGLGAQAQOGLSKSNGLPSRLHSQIPSS-SKNPFLRPGALSSHGKHPWVA-----
LTB_MACAQM -----LEGRGGRLOGRGSLLLAVAGATSL -----VTLLLAVPITVLAVALVPEQOGLVMSAGLGAQAQOGL-----
ODF_MOUSE ASRSMF LALLGLGLGQVVC IALFLYFRAQMDPNRI SEDSTHCF YRILRLHENAGLDSTLESED--TLPDS CRRMKAQAFQAVOKELQHI VGPQ RFS--AMMEG
RANKL_MOUSE ASRSMF LALLGLGLGQVVC IALFLYFRAQMDPNRI SEDSTHCF YRILRLHENAGLDSTLESED--TLPDS CRRMKAQAFQAVOKELQHI VGPQ RFSGAPAMMEG
TNF11_RAT ASRFMF LALLGLGLGQVVC IALFLYFRAQMDPNRI SEDSTHCF YRILRLRENTGLDSTLESEDTEALPDS CRRMKAQAFQAVOKELQHI VGPQ RFSGVAMMEG
TNF12_HUM -----MMDPNRI SEDSTHCF YRILRLHENAGLDSTLESEDTEALPDS CRRMKAQAFQAVOKELQHI VGPQ HIRAEKAMVDG
TNF11_HUM ASRSMF VALLGLGLGQVVC VALFFYFRAQMDPNRI SEDSTHCF YRILRLHENAGLDSTLESEDTEALPDS CRRMKAQAFQAVOKELQHI VGPQ HIRAEKAMVDG
TNF10_HUMA -----LQQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYVYF TNELKQMDK YKSGIACPLKEDDSYWDPNDEESMNSPCWQVQWLRQLVLRKMI LRTSEET -----ISTVQEQ-----

```

```

-----VKDMLNKEETTKNSFEMOKGDONPOI-----AAHVISEASSKTTSVL-----QWAEKGYTMSNNLVLTLENKOLTVKROGGYIYAQVTFNSREASSOAPFFIA-----SLCLKSPGRFE-----
-----VKDMLNKEEKKKNSFEMOKGDONPOI-----AAHVISEASSKTTSVL-----QWAEKGYTMSNNLVLTLENKOLTVKROGGYIYAQVTFNSREASSOAPFFIA-----SLCLKSPGRFE-----
-----VKDMLNKEEKKKNSFEMOK-----VL-----QWAEKGYTMSNNLVLTLENKOLTVKROGGYIYAQVTFNSREASSOAPFFIA-----SLCLKSPGRFE-----
-----VKDMLNKEEKKKNSFEMOKGDONPOI-----AAHVISEASSKTTSVL-----QWAEKGYTMSNNLVLTLENKOLTVKROGGYIYAQVTFNSREASSOAPFFIA-----SLCLKPPNRF-----
-----VKDMLNKEEKKKNSFEMOKGDONPOI-----AAHVISEASSKTTSVL-----QWAEKGYTMSNNLVLTLENKOLTVKROGGYIYAQVTFNSREASSOAPFFIA-----SLCLKPPNRF-----
-----VKDMONKEVKKKKNFEMHKGDQDPOI-----AAHVISEASSKTTSVL-----QWAPKGYTTLNNLVLTLENKOLAVKROGGYIYTOVTFNSRRETSOAPFFIA-----SLCLKSPSGSE-----
-----VKGMSKQVKKKKNFEMHKGDQDPOI-----AAHVISEASSKTTASVL-----QWAPKGYTTLNNLVLTLENKOLAVKROGGYIYAQVTFNSRDAAGOAPFFIA-----SLCLRSPSGSE-----
-----LKEMLNKETTK-KNVAMOKGDQDPRV-----AAHVISEASSSTASVL-----QWAPKGYTTLNNLVLTLENKOLAVKROGGYIYAQVTFNSREASSOAPFFIA-----SLCLRSPSGSE-----
-----LKEMLNEMMK-ENLAMOKGDQDPRV-----AAHVISEASSNPASVL-----RWAPKGYTTLNNLVLTLENKOLAVKROGGYIYAQVTFNSRASSOAPFFIA-----SLCLRSPSGTE-----
-----VKDMLNKEEKK-NSFEMOKGDQDPOI-----AAHVISEASSNSAASVL-----QWAKKGYTMSNNLVLTLENKOLAVKROGGYIYAQVTFNSRREPSORPFFIV-----GLWLKPSGSE-----
-----VKDSLNEEKK-KSFEMOKGDQDPOI-----AAHVISEASSNSAASVL-----QWAKKGYTMSNNLVLTLENKOLAVKROGGYIYAQVTFNSRREPSORPFFIV-----GLWLKPSGSE-----
-----CKDTASEELPK--FEMHRGHEPHLKSNETSVAEEKRQPIATHLAGVKSNTTVRVL-----KWMTTSYAPTSS-LISYHEK-LKVEKAGYIYSOVSFTKAAS--APFTL-----YIYLYLPMEDD-----
-----SPLAQTSSSRTPSD-----KPAHVIVANPEAEGOL-----QWLSRRANALLANGVELTDO-LIVPSDGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----NPLPOTLSSSRTPSD-----KPAHVIVANPEAEGOL-----QWLSRRANALLANGVELTDO-LKVPDGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----SPLAQAVSSSRTPSD-----KPAHVIVANPEAEGOL-----QWLNRRANALLANGVELRDO-LVVPSEGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----SPLAQAGSSSRTPSD-----KPAHVIVANPEAEGOL-----QWLNRRANALLANGVELRDO-LVVPSEGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----SPLAQAVSSSRTPSD-----KPAHVIVANPEAEGOL-----QWLNRRANALLANGVELRDO-LVVPSEGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----SPLAQAVSSSRTPSD-----KPAHVIVANPEAEGOL-----QWLNRRANALLANGVELTDO-LVVPSEGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----NSLALAVSSSRTPSD-----KPAHVIVANPEAEGOL-----QWLNRRANALLANGVELRDO-LVVPDGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----NPLAOTLSSSRTPSD-----KPAHVIVANPEAEGOL-----QWLSGRANALLANGVELTDO-LVVPDGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----NPLAOTLSSSOASRD-----KPAHVIVADPAEQOL-----QWKRFRANTLLANGVELRDO-LVVPDGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----NPLAOTLSSSOASRD-----KPAHVIVADPAEQOL-----QWKRFRANTLLANGVELRDO-LVVPDGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----AQOAMLTLLSSONMND-----KPAHVIVA-NEDKEOL-----QWLSRRANALLANGMELID-LVVPDGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----POAOMLTLLSSONMND-----KPAHVIVAKPOVEGOL-----QWLSRRANALLANGMELID-LVVPDGYLIYSOVLFQOGCPTHVLLTH-----TISRFAVSYOT-----
-----PVAQMVTLASRALS-----KPAHVIVANWMMKQGL-----QWAEKKEEAFLLSGTQFSSDGLALPODGYIYCLVGYGRAPPAGPDR-----TISRFAVSYOT-----
-----TLPPIVASTPPFOQLQEEPTDLSSR-----LPAAHLIGAPLKGQGL-----GWEATKEQAFLLSGTQFSSDGLALPODGYIYCLVGYGRAPPAGPDR-----TISRFAVSYOT-----
-----GFOKLEPEEPEADLSPG-----LPAAHLIGATLS-----SMYHDR-GWAKISNMFTSNK-LRVNODGYIYLANICPHHETSGSVPT-----DYLOLMVYVKTSTIKIPS-----
-----SWLDVAORGPEAOPFAHLT-----INAASIPSGSHKVTLS-----SMYHDR-GWAKISNMFTSNK-LRVNODGYIYLANICPHHETSGSVPT-----DYLOLMVYVKTSTIKIPS-----
-----SWLDVAORGPEAOPFAHLT-----INAASIPSGSHKVTLS-----SMYHDR-GWAKISNMFTSNK-LRVNODGYIYLANICPHHETSGSVPT-----DYLOLMVYVKTSTIKIPS-----
-----SWLDVARRGPEAOPFAHLT-----INAADIPSGSHKVTLS-----SMYHDR-GWAKISNMFTSNK-LRVNODGYIYLANICPHHETSGSVPA-----DYLOLMVYVKTSTIKIPS-----
-----SWLDLAKRSLEAOPFAHLT-----INATDIPSGSHKVTLS-----SMYHDR-GWAKISNMFTSNK-LRVNODGYIYLANICPHHETSGDLAT-----EYLOLMVYVKTSTIKIPS-----
-----SWLDLAKRSLEAOPFAHLT-----INATDIPSGSHKVTLS-----SMYHDR-GWAKISNMFTSNK-LRVNODGYIYLANICPHHETSGDLAT-----EYLOLMVYVKTSTIKIPS-----
-----QNTSPLVREGPQVAAHTGTRG-----RSMNTLSSPNSKNEKTLGQKIESWESSRKGHSFLNHVLRNE-LVIEQEGLYIYSQTYFRFOEIKE--TKN--DKQMVYIYKYSYPP-----

```

```

---RILLRAATHS-SAKPCGO---SIHLGGVFELQPGASVFNTPDPSOVSHGT-GFTSFGLLKL
---RILLRAATHS-SAKPCGO---SIHLGGVFELQPGASVFNTPDPSOVSHGT-GFTSFGLLKL
---RILLRAATHS-STKPCGO---SIHLGGVFELQPGASVFNTPDPSOVSHGT-GFTSFGLLKL
---RILLRAATHS-SAKPCGO---SIHLGGVFELQPGASVFNTPDPSOVSHGT-GFTSFGLLKL
---RILLRAATHS-SAKPCGO---SIHLGGVFELQPGASVFNTPDPSOVSHGT-GFTSFGLLKL
---RILLRAATHS-SSKPCGO---SIHLGGVFELQPGASVFNTPDPSOVSHGT-GFTSFGLLKL
---RILLRAATHS-SSKPCGO---SIHLGGVFELQPGASVFNTPDPSOVSHGT-GFTSFGLLKL
---RVLLRAARS-SSKPCGO---SIHLGGVFELHQPASVFNTPDPSOVSHGT-GFTSFGLLKL
---RVLLRAARS-SSKPCGO---SIHLGGVFELHQPASVFNTPDPSOVSHGT-GFTSFGLLKL
---RILLRAATHS-SSQCEQ---SVHLGGVFELQAGASVFNTEASOVTHRV-GFSSIGLLKL
---RILLRAATHS-SSKCEQ---SIHLGGVFELQAGASVFNTEASOVTHRV-GFSSIGLLKL
---RLLMKGLTHSTALCEL---STREGGVFELRQGMVFNTPDSTAVNVPN-GNSSIGLLKL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCORETPEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KANLLSAISPCOGGTSEAEAKP---WYPYLLGGVFOLEKDDRLSAENMPNYLDFAESGQVYFGIIAL
---KANLLSAISPCOGGTSEAEAKP---WYPYLLGGVFOLEKDDRLSAENMPNYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCPKESLEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCPKESLEGAFAKP---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
---KVLLSAISPCCHRETPEAEAPMA---WYPYLLGGVFOLEKGDRLSAENLPDYLDFAESGQVYFGIIAL
GRAPELLELGATVTPVLDRAGRQYRPLWYSVGFGLVQLRRGERVYVNSHPDMVDYR--GKTFFGAVMV
GPTPELLELGATVTPVLDPAAGROGYGLPWYSVGFGLVQLRRGERVYVNSHPDMVDYR--GKTFFGAVMV
---SHNLMKGGTKNWSGNSEFH---FSINVGGFFKLRAGEEISIQSNPSLLDPDQ-DATYFGAFKV
---SHNLMKGGTKNWSGNSEFH---FSINVGGFFKLRAGEEISIQSNPSLLDPDQ-DATYFGAFKV
---SHNLMKGGTKNWSGNSEFH---FSINVGGFFKLRAGEEISIQSNPSLLDPDQ-DATYFGAFKV
---SHTLMKGGTKYWSGNSEFH---FSINVGGFFKLRAGEEISIQSNPSLLDPDQ-DATYFGAFKV
---SHTLMKGGTKYWSGNSEFH---FSINVGGFFKLRAGEEISIQSNPSLLDPDQ-DATYFGAFKV
---PILLMKSANCSWKSDAEYG---LSIYQGGIFE LKENDRIFVSTNEHLIDMDH-EASFPGAFFL

```

B) Rinnastus TNF-domeenien sekvensseille

```

Q9XT69_CANFA/19-41      LQWLTRRA..NALLANGVELTDNQ-.L-----
Q864Z0_PHYCA/1-103      -----O-.LVVPTDGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
PTH.....LFHTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQ-----
Q864Y9_9EUTH/1-103      -----O-.LVVPSDGLYLVYSOVLFK-- --GQGPC-----
STH.....VLLTHTISRALSYS...OTKVNLLSAIK.SPCOLETPEgte...gkpWYEPIYLGGVFQLEKDDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQ-----
TNFA_CANFA/102-233      LQWLSRRA..NALLANGVELTDNQ-.LIVPSDGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
STH.....VLLTHTISRFAVSY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPEGte...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPNYLDFAE.SGQVYFGIIAL
TNFA_FELCA/102-233      LQWLSRRA..NALLANGVELTDNQ-.LKVPSDGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
STH.....VLLTHTISRFAVSY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSTE..IN.-LPAYLDFAE.SGQVYFGIIAL
Q9BEG0_CYCDI/94-217      LQWLSRRA..NALLANGVELTDNQ-.LVVPSDGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
SAH.....VLLTHTVNRFAVSY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGpe...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPEYLDFAE.SGQ-----
Q9BEG1_BRATR/94-217      LQWLSRRA..NALLANGVELTDNQ-.LVVPSDGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
STP.....VLLTHTVNRFAVSY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPEGte...gkpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQ-----
Q8HZD7_PONPY/70-152      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSGLYLIYSQVLFK-- --GQGPC-----
STH.....VLLTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETTeg.....
Q8HZD8_9PRIM/70-152      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSGLYLIYSQVLFK-- --GQGPC-----
STH.....VLLTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCOREYPEG.....
Q97543_AOTNA/19-149      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
STH.....VLLTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-RPDYLDFAE.SGQVYFGIIA-
TNFA_HUMAN/102-233      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
STH.....VLLTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-RPDYLDFAE.SGQVYFGIIAL
TNFA_PANTR/101-232      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
STH.....VLLTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-RPDYLDFAE.SGQVYFGIIAL
TNFA_PAPSP/102-233      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
STH.....VLLTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGIIAL
TNFA_PAPAN/102-233      LQWLNRRRA..NALLANGVEPTDNO-.LVVPSGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
SNH.....VLLTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGIIAL
TNFA_MACFA/102-233      LQWLNRRRA..NALVANGVELTDNQ-.LVVPSGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
SNH.....VLLTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGIIAL
TNFA_MACMU/102-233      LQWLNRRRA..NALLANGVELTDNQ-.LVVPSGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
SNH.....VLLTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGIIAL
TNFA_PAPHU/102-233      LQWLNRRRA..NALLANGVELTDNQ-.LVVPSGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
SNH.....VLLTHTISRIVASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGIIAL
Q8HZD5_SAGOE/70-150      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSGLYLVYSQVLFK-- --GQGPC-----
-----STF.....MLLTHISRIVASY...QAKVNLLSAIK.SPCQRETP--
Q97538_AOTVO/19-149      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSGLYLVYSOVLFK-- --GQGPC-----
STF.....MLLTHISRIVASY...QAKVNLLSAIK.SPCQRETPRgak...tnpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDLAE.SGQVYFGIIA-
Q9TTG8_AOTNI/19-149      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSGLYLVYSOVLFK-- --GQGPC-----
STF.....MLLTHISRIVASY...QAKVNLLSAIK.SPCQRETPRgak...tnpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDLAE.SGQVYFGIIA-
Q9TTG7_AOTLE/19-137      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSGLYLVYSOVLFK-- --GQGPC-----
STF.....MLLTHISRIVASY...QAKVNLLSAIK.SPCQRETPRgak...tnpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDLAE.SGQVYFGIIAL
TNFA_SAISC/102-233      LQWLNRRRA..NALLANGVELRDNQ-.LVVPSDGLYLVYSOVLFK-- --GQGPC-----
STF.....TLLTHISRIVASY...QAKVNLLSAIK.SPCQRETPRgak...thpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IS.-PPDSLDAE.SGQVYFGIIAL
Q9BEF4_CABUN/94-217      LLWLGRRA..NTLLANGMELTDNQ-.LVVPSGLYLIYSOVLFK-- --GQSCP-----
STH.....VLLTHTINRFSASY...OTKVNLLSAIK.SPCQRETPGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..IN.-LPEYLDFAE.SGQ-----
Q864Y7_TUPTA/1-103      -----O-.LVVPSDGLYLIYSOVLFK-- --GLGCP-----
STP.....VLFHTHTISRIVASY...NNKNVLLSAIK.SPCOKESAEGae...akpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..VN.-LPHYLDFAE.SGQ-----
Q9BEC4_TALEU/93-216      LQWLSQVA..NALLANGVELTNNQ-.LVVPSDGLYLIYSOVLFK-- --GQGPC-----
SNL.....EDAVDLLSAIK.SPCQRETPGae...arpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAN..IN.-LPKYLDFAQ.SGQ-----
Q9ERC9_MESAU/95-127      LEWLSHRA..NALLANGMSLDNQ-.LVIPADGLYLV-----
-----
Q9ERG6_PERMA/97-216      LEWLSRRA..NALLANGMDLKDNO-.LVIPADGLYLVYSOVLFK-- --GQGCS-----
NY.....VLLTHTVSRFAVSY...EDKVNLLSAIK.SPCPKETPEgse...lkpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..VN.-LPKYLDFAE.SGQ-----
TNFA_PERLE/105-235      LEWLSRGA..NALLANGMDLKDNO-.LVIPADGLYLVYSOVLFK-- --GQGCS-----
SY.....VLLTHTVSRFAVSY...EDKVNLLSAIK.SPCPKETPEgse...lkpWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAE..VN.-LPKYLDFAE.SGQVYFGVIAL

```

Q91ZL4_SIGHT/26-156 LEWLSORA..NALLANGMDLRNNO-.LVIPADGLYLIVYSQVLFK--.---GLGRS-.------
 NC.....ELLTHTVSRFAVSY...EDKVNLLSAIK.SPCPKETPEGae...lkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-HPKYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_RAT/105-235 LEWLSORA..NALLANGMDLKDNO-.LVVpADGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 DY.....VLLTHTVSRFAVSY...QDKVNLLSAIK.SPCPKETPEGae...fkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-LPKYLDITE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_MOUSE/105-235 LEWLSORA..NALLANGMDLKDNO-.LVVpADGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 DY.....VLLTHTVSRFAVSY...QDKVNLLSAIK.SPCPKETPEGae...lkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-LPKYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 Q9Ri36_MERUM/57-101 LEWLSRRA..NALLANGMELRDNO-.LVVPSDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------

 Q80Z06_DIPSA/1-102 -----Q-.LVVPSDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 SY.....VLLTHTVSRFAVSY...PDKVNLLSAIK.SPCPKETPEGae...skpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-LPDYLDFAE.SGQ-----
 Q99NDi_SCIVU/93-215 LQWLSRRA..NALLANGMELIDNO-.LVVpADGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCS-.------
 SY.....VLLTHTVSRFAVSY...QDKVNLLSAIK.SPCPKESLEGae...fkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-LPSYLDFAE.SGQ-----
 Q6x658_MARMO/103-233 LVWLSRRA..NALLANGMELIDNO-.LVVpANGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 SH.....VLLTHTVSRFAVSY...QDKVNLLSAIK.IPCPKESLEGae...fkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-LPSYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 Q80Z03_CASCN/1-102 -----Q-.LVVpADGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 SY.....VLLTHTVSRFAVSY...RENVNLLSAIK.SPCQKETPEGae...lkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-LPSYLDFAE.SGQ-----
 Q80Z02_9HYST/1-102 -----Q-.LVVPSDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 SY.....VLLTHTVSRFAVSY...QDKVNLLSAIK.SPCQKETPEGae...lkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-LPSYLDFAE.SGQ-----
 TNFA_CAVPO/104-234 LQWLSKRA..NALLANGMGLSDNO-.LVVPSDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 SY.....VLLTHTVSRFAVSY...PEKVNLLSAIK.SPCQKETPEGae...rkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-LPQYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 Q80Z04_9RODE/1-102 -----Q-.LVVPTDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 SF.....MLLTHTVSRFAVSY...PEKVNLLSAIK.SPCQKETPEGae...lkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-LPSYLDFAE.SGQ-----
 TNFA_RABIT/105-235 LQWLSORA..NALLANGMGLSDNO-.LVVpADGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 SY.....VLLTHTVSRFAVSY...PNKVNLLSAIK.SPCHRETPEEae...pmaWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-QPEYLDLAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_HORSE/103-234 LQWLSGRA..NALLANGVKLTDNO-.LVVPLDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STH.....VLLTHTVSRFAVSY...PSKVNLLSAIK.SPCHTESPEQae...akpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-QPNYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_PIG/101-232 LQWOSGYA..NALLANGVKLTDNO-.LVVPTDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STN.....VFLTHTVSRFAVSY...QTKVNLLSAIK.SPCQRETPEGae...akpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 Q75N23_CAMBA/102-233 LQWEKRA..NTLLANGVKLEDNO-.LVVPTDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STP.....VFLTHTVSRFAVSY...PNKANLLSAIK.SPCOGGTEEae...akpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-MPNYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_LAMGL/102-233 LQWEKRA..NTLLANGVKLEDNO-.LVVPTDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STP.....VFLTHTVSRFAVSY...PNKANLLSAIK.SPCOGGTEEae...akpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-MPNYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 Q9BEE8_ERIEU/92-215 LLWESEVA..NALLANGMGLSDNO-.LVVPLDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STH.....VFLTHNKRYAVSY...QKVNLLSAIK.SPCQSETPEGae...arpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFDE.SGQ-----
 Q7YSE3_SHEEP/1-70 -----
 QTKVNLLSAIK.SPCHRETLEGae...akpWYEPiYOGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPEYLDYAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_CAPHI/103-234 LRWGD SYA..NALKANGVELKDNO-.LVVPTDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STP.....LFLTHTVSRFAVSY...QTKVNLLSAIK.SPCHRETPEGae...akpWYEPiYOGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-QPEYLDYAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_CEREL/98-229 LLWLDSCA..NALMANGVKLEDNO-.LVVPTDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STP.....LFLTHTVSRFAVSY...QTKVNLLSAIK.SPCHRETPEEae...akpWYEPiYOGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_BOVIN/103-234 LRWWD SYA..NALMANGVKLEDNO-.LVVpADGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STP.....LFLTHTVSRFAVSY...QTKVNLLSAIK.SPCHRETPEEae...akpWYEPiYOGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_BOVIN/102-233 LRWWD SYA..NALMANGVKLEDNO-.LVVpADGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STP.....LFLTHTVSRFAVSY...QTKVNLLSAIK.SPCHRETPEEae...akpWYEPiYOGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_BUBBU/102-233 LRWWD SYA..NALMANGVKLEDNO-.LVVpADGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STP.....LFLTHTVSRFAVSY...QTKVNLLSAIK.SPCHRETPEEae...akpWYEPiYOGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 Q864Y8_ELEMA/1-99 -----PPDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 ATQ.....VLLTHTVSRFAVSY...KTKVNLLSAIK.SPCHRETPEGae...akpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQ-----
 TNFA_DELLE/102-233 LRWLNTYA..NTLLANSVKLEDNO-.LVVPTDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STH.....LFLTHTVSRFAVSY...QTKVNLLSAIK.SPCQRETPEGae...akpWYEPiYOGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_TURTR/102-233 LRWLNTYA..NTLLANSVKLEDNO-.LVVPTDGLYLIVYSQVLFK--.---GOGCP-.------
 STH.....LFLTHTVSRFAVSY...PSKVNLLSAIK.SPCQRETPEGae...akpWYEPiYOGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPDYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 Q9BEC5_TENEC/94-217 LKWVSKVA..NALLDNNVQLIDNO-.LVVPLDGLYLIVYSQVLFK--.---GPGCH-.------
 GTY.....VLLTHTVSRFAVSY...QAKVNLLSAIK.TPCHRETPEGae...tkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..IN.-LPNYLDLAE.SGQ-----
 Q80Z05_DIPME/1-102 -----H-.LVVPSNGLYLIVYSQVLFK--.---GRGCS-.------
 SF.....LVLHTVSRFAVSY...PEKVNLLSAIK.SPCQKEIPEGae...lkpWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-LPQYLDFAE.AGQ-----
 Q9BEC9_OCHPR/94-216 LEWLNQRL..NALLANGLKLIDNO-.LVVpADGLYLIVYSQVLFK--.---GOACP-.------
 SY.....LFLTHTVSRFAVSY...PNKVNLLSAIK.SPCQKETPEGae...pmaWYEPiYOGgVfOLEKGDRLSAE..VN.-MPDYLDLAE.SGQ-----
 Q9BEF3_DIDMA/92-214 IQWSSGH-.ANDLLNGELTDNO-.LVVpATGGLYLIVYSQVLFK--.---GKDCA-.------
 NKP.....LFLTHTVSRFAVSY...PDKVNLLSAIK.SPCQVKEKGSae...spWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..TN.-YPTYLDLAE.TGQ-----
 Q9BEE0_MACRU/93-216 LQWLKRAA..NVLLSNGMDLVNDNO-.LVVpSTGGLYLIVYSQVLFK--.---GEDCA-.------
 NEP.....LFLTHTVSRFAVSY...QSKVNLLSAIK.SPCQKTVKGare...aspWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..TN.-YPNYLDFAE.SGQ-----
 TNFA_MACEU/102-233 LQWLKRAA..NVLLSNGMDLVNDNO-.LVVpSTGGLYLIVYSQVLFK--.---GEDCA-.------
 NEP.....LFLTHTVSRFAVSY...QSKVNLLSAIK.SPCQKTVKGare...aspWYEPiYLGgVfOLEKGDRLSAE..TN.-YPNYLDFAE.SGQVYFGVIAL
 TNFA_TRIVU/102-233 LLWVGDA..NTLLMNGMELVDNO-.LVVpSTGGLYLIVYSQVLFK--.---GSQCG-.------
 KES.....LVLTHKISRFRTLSY...QKKVTLLANIR.SSCRKAEDDge...psaWYEPiYLAGVfOLEKGDRLSAE..TN.-YPENLDFAE.PGQYFGVIAL
 Q99ME8_PERMA/2-62 -----
 WVRSMYQGAVFLLRKGDLSTH..TD.-GVSHLHFS-.PSSVFFGAFAL
 Q80WE7_PERMA/74-202 LLWRANTD..RAFLRHGFSLNNS-.LLVPASGLYFVYSQVVF--.---GESCS-.----PKaTPAP.....IYLAHEVQLLSSQY...PFHVPLLSAQKsVYPGLQGP--
WVRSMYQGAVFLLRKGDLSTH..TD.-GVSHLHFS-.PSSVFFGAFAL

TNFB_RAT/74-202 LLWRANTD..RAFLRHGFSLSNNS-.LLIPTSGLYFVYSQVVS--.---GESCS-.----PrAIPTP.....IYLAHEVQLFSSQY...PFHVPLLSAQKsVYPGLQGP--
WVRSYQGAFFLLSKGDQLSTH..TD.-GISHLHFS-.PSTVFFGFAL
 TNFB_MOUSE/74-202 LLWRASTD..RAFLRHGFSLSNNS-.LLIPTSGLYFVYSQVVS--.---GESCS-.----PrAIPTP.....IYLAHEVQLFSSQY...PFHVPLLSAQKsVYPGLQGP--
WVRSYQGAFFLLSKGDQLSTH..TD.-GISHLHFS-.PSSVFFGFAL
 TNFB_MACEU/74-201 IHRWRANTD..HAFLRHGFSLSNNS-.LLVPTSGLYFVYSQVVS--.---GASCS-.----EITPTL.....LYLSHEVLLFSSKY...QVHVPLLSAQK.SVCSGTQ--
 G...PWRSYQGAFFLLTQGDRLSTY..TD.-GVSHLLQS-.PSSVFFGFAL
 TNFB_RABIT/69-197 LRWRANTD..RAFLRHGFSLSNNS-.LLVPSGGLYFVYSQVVS--.---GEGCS-.----PKaVPTP.....LYLAHEVQLFSSQY...SFHVPLLSAQK.SVCPGPQ--
 G...PWRSYQGAFFLLTQGDQLSTH..TD.-GIAHLLLS-.PSSVFFGFAL
 TNFB_PIG/76-204 LRWRANTD..RAFLRHGFSLSNNS-.LLVPTSGLYFVYSQVVS--.---GEGCF-.----PKaTPTP.....LYLAHEVQLFSSQY...PFHVPLLSAQK.SVCPGPQ--
 G...PWRSYQGAFFLLTQGDQLSTH..TD.-GTPHLLLS-.PSSVFFGFAL
 Q5WR07_CANFA/76-204 LRWRANTD..RAFLRHGFSLSNNS-.LLVPTSGLYFVYSQVVS--.---GEGCF-.----PKaTPTP.....LYLAHEVQLFSSQY...PFHVPLLSAQK.SVCPGPQ--
 G...PWRSYQGAFFLLTQGDQLSTH..TD.-GISHLHFS-.PSSVFFGFAL
 TNFB_BOVIN/76-204 LRWRANTD..RAFLRHGFSLSNNS-.LLVPTSGLYFVYSQVVS--.---GRGCF-.----PrATPTP.....LYLAHEVQLFSPQY...PFHVPLLSAQK.SVCPGPQ--
 G...PWRSYQGAFFLLTRGDQLSTH..TD.-GISHLHFS-.PSSVFFGFAL
 TNFB_MARMO/77-205 LRWRANTD..RAFLRHGFSLSNNS-.LLVPTSGLYFVYSQVVS--.---GEGCS-.----SKaVSTP.....LYLAHEVQLFSSQY...PFHVPLLSAQK.SVCPGPQ--
 G...PWRSYQGAFFLLTRGDQLSTH..TD.-GISHLHFS-.PSSVFFGFAL
 Q5SP42_HUMAN/77-155 LLWRANTD..RAFLQDGFSLNNS-.LLVPTSGIYFVYSQVVS--.---GKAYS-.----PKaTSSP.....LYLAHEVQLFSSQY...PFHVPLLSQK.MV-----

 Q5TM20_MACMU/77-205 LLWRANTD..RAFLQDGFSLNNS-.LLVPTSGIYFVYSQVVS--.---GKAYS-.----PKaTPTP.....LYLAHEVQLFSSQY...PFHVPLLSQKmVYPGLQEP--
 G...WLHSMYHGAAAFQLTQGDQLSTH..TD.-GIPHLLVS-.PSTVFFGFAL
 TNFB_HUMAN/77-205 LLWRANTD..RAFLQDGFSLNNS-.LLVPTSGIYFVYSQVVS--.---GKAYS-.----PKaTSSP.....LYLAHEVQLFSSQY...PFHVPLLSQKmVYPGLQEP--
 G...WLHSMYHGAAAFQLTQGDQLSTH..TD.-GIPHLLVS-.PSTVFFGFAL
 TNFB_PANTR/77-205 LLWRANTD..RAFLQDGFSLNNS-.LLVPTSGIYFVYSQVVS--.---GKAYS-.----PKaTSSP.....LYLAHEVQLFSSQY...PFHVPLLSQKmVYPGLQEP--
 G...WLHSMYHGAAAFQLTQGDQLSTH..TD.-GIPHLLVS-.PSTVFFGFAL
 Q8JG37 ICTPU/95-230 MOWFDNA..DQSFSSGLKLEPNE-.IKILRDGLYFVYSQASFR--.---LLCK-.--
 AEGDETEGEV..MHMSHKVSRWSDSY...SSWKPLLSATR.SACKKTTEEY...kyWYGAVYLGAAFNLKAGDRLRV..MDeKLLPKVESa-.GGKTFFGTFSL
 Q90WP9 PLEPL/i188 ..GLYFVYSQASFS-----
 VSCSDdDAEGKDaGRLL.....TSVSHRIWRyAESM...GVKDSLMSAVR.SACHVGPtQDnaErDggqWYNAIYLGAVFQOLNEG-----
 Q7ZZX5 PAGMA/1-110 ..YFVYSQASFR-----VSCSDgEEEEGAGgHH--
TPLSHRISRSESMS...GSDVSLMSAVR.SACONTAODSvs.dgrgWNTIYLGAVFQOLNRGDRLWTE..TN.-QLSELETE-.EGKTFFGVFAL
 TNFA_SPAAU/114-253 .VWKNKGQ.QAFAOGGFRLLVNDK..IIVPHTGLYFVYSQASFR-----VSCSDgDEEGAGrHL-
TPLSHRISRSESMS...GSDVSLMSAVR.SACONTAODSvs.dgrgWNTIYLGAVFQOLNRGDKLETE..TN.-QLSELETE-.EGKTFFGVFAL
 Q7t194 ACASC/114-253 .VWKNKGQ.QAFAOGGFRLLVNDK..IIVPHTGLYFVYSQASFR-----VSCSDgDEEGAGrHL-
TPLSHRISRSESMS...GSDVSLMSAVR.SACONTAODSvs.dgrgWNTIYLGAVFQOLNRGDRLETE..TN.-QLSELETE-.EGKTFFGVFAL
 Q6U817 LATUA/102-241 .LWKNKGQ.QAFAOGGFRLLVNDK..IIVPHTGLYFVYSQASFR-----VSCSNgDEEGAGKGL-
TPLSHRISRSESMS...GSKASLSAVR.SACQSTTOEESYr.gggWNTIYLGAVFQOLNRGDRLWTE..TN.-QPSELETE-.EGKTFFGVFAL
 Q5VJN5 ORENI/109-247 .LWKNKGQ.QAFAOGGFRLLVNDK..IIVPHTGLYFVYSQASFR-----VSCSDdDADDGkeAAEKH...
TILSHRISRSESMS...GSSSTLMSAIR.SACQSTTOEESYr.gggWYNAIYLGAVFQOLNEGDTLWTE..TN.-QLSELETE-.EGKTFFGVFAL
 VTCGNLDBENEDE.EKSL.....LWKNKGQ.QAFAOGGFRLLVNDK..IIVPHTGLYFVYSQASFR-----VWKRKDDG.QAFSOGGFKLQGNQ..IIPHTGLFVYSQASFR--
 Q91810 SALFO/121-255 .VWKRKDDG.QAFSOGGFKLQGNQ..IIPHTGLFVYSQASFR-----VKNK-----
TPLSHVICRYSDSI...GVNANLLSGVR.SVCQONyGNAesn.igegWYNAVYLSAVFQOLNEGDKLWTE..TN.-RLTDVEPE-.HGKNFFGVFAL
 Q9DEP9 ONCMY/121-255 .VWKRKDDG.QAFSOGGFKLQGNQ..IIPHTGLFVYSQASFR-----VKNK-----
TPLSHVICRYSDSI...GDKGNLLSGVR.SVCQONyGNDesn.igegWYNAVYLSAVFQOLNEGDKLWTE..TN.-RLTDVEPE-.QGNFFGVFAL
 Q8AWC9 CYPCA/103-237 .LDWKKNQD.QAFTSGGLKLVRE-.IIPHTGIYFVYSQVSPH-----INCK--
VMSHTVLRYSDSY...GRYMLPFSAIR.TACAQASNTD.....IWNNTIYLGAAFKLRAGDRLRTE..TTeELLSPVETG-.DGKTFFGVFAL
 Q8AW02 CYPCA/97-231 .LDWKKNQD.QAFVSGGLELDRE-.IIPHTGIYFVYSQVSPH-----ISCK--
VMSHAVLRYSY...GSYKPLFSAIR.SACVHASDSE.....IWNNTIYLGAAFNLRARDLRTE..TTkELLPRVESE-.NGKTFFGVFAL
 Q6T9C7 BRARE/102-234 .LDWRDDQD.QAFSSGGLKLVNRE-.IIPHTGIYFVYSQVSLH-----ISCT--
VLMSHAVMRFSY...GKKPLFSAIR.SICTQEPESN.....IWNNTIYLGAAFHRLREGDRLGTDT..TTtALLPMVEND-.NGKTFFGVFGL
 Q9TTJ2 BOVIN/46-93 .LEWEDTY-.GIALVSGVKYKKG-.LVINETGLYFVYSQVYFR--.---GQSCN-.-----NQP.....L-----

 Q8MJ19_MACMU/50-154 .LEWEDTY-.GIVLLSGVKYKKG-.LVINETGLYFVYSQVYFR--.---GQSCN-.-----N-----LPLSHKVMRNSKY...PQDLVMEGKMmSYCTTGQM--
WAHSSYLGAVFNLTSADHLYVN..VS.-EL-----
 TNFL6_MACNE/159-280 .LEWEDTY-.GIVLLSGVKYKKG-.LVINETGLYFVYSQVYFR--.---GQSCN-.-----N-----LPLSHKVMRNSKY...PQDLVMEGKMmSYCTTGQM--
WAHSSYLGAVFNLTSADHLYVN..VS.-ELSLNFE-.ESQTFFGLYKL
 TNFL6_MACMU/159-280 .LEWEDTY-.GIVLLSGVKYKKG-.LVINETGLYFVYSQVYFR--.---GQSCN-.-----N-----LPLSHKVMRNSKY...PQDLVMEGKMmSYCTTGQM--
WAHSSYLGAVFNLTSADHLYVN..VS.-ELSLNFE-.ESQTFFGLYKL
 TNFL6_MACFA/159-280 .LEWEDTY-.GIVLLSGVKYKKG-.LVINETGLYFVYSQVYFR--.---GQSCN-.-----N-----LPLSHKVMRNSKY...PQDLVMEGKMmSYCTTGQM--
WAHSSYLGAVFNLTSADHLYVN..VS.-ELSLNFE-.ESQTFFGLYKL
 TNFL6_CERTO/159-280 .LEWEDTY-.GIVLLSGVKYKKG-.LVINETGLYFVYSQVYFR--.---GQSCN-.-----N-----LPLSHKVMRNSKY...PQDLVMEGKMmSYCTTGQM--
WAHSSYLGAVFNLTSADHLYVN..VS.-ELSLNFE-.ESQTFFGLYKL
 TNFL6_HUMAN/160-281 .LEWEDTY-.GIVLLSGVKYKKG-.LVINETGLYFVYSQVYFR--.---GQSCN-.-----N-----LPLSHKVMRNSKY...PQDLVMEGKMmSYCTTGQM--
WARSSYLGAVFNLTSADHLYVN..VS.-ELSLNFE-.ESQTFFGLYKL
 TNFL6_PIG/161-282 .LEWEDTY-.GIALVSGVKYKKG-.LVINDTGLYFVYSQVYFR--.---GQYCN-.-----N-----QPLSHKVMRNSRY...PQDLVMEGKMmNYCTTGQM--
WARSSYLGAVFNLTSADHLYVN..VS.-ELSLNFE-.ESKTFFGLYKL
 Q861W5_FELCA/159-280 .LEWEDTY-.GIALVSGVKYKKG-.LVINDTGMVYFVYSQVYFR--.---GQSCN-.-----N-----QPLNHKVMRNSKY...PQDLVMEGKMmNYCTTGQM--
WARSSYLGAVFNLTSADHLYVN..VS.-ELSLVFE-.ESKTFFGLYKL
 Q6J3Q6_CANFA/10-131 .LEWEDTY-.GIALVSGVKYKKG-.LVINDTGLYFVYSQVYFR--.---GQSCN-.-----N-----KPLNHKVMRNSKY...PQDLMLMEGKImNYCTTGQM--
WARSSYLGAVFNLTSADHLYVN..VS.-ELSLVFE-.ESKTFFGLYKL

Q9WV90_MARMO/57-168 LEWEDTY-.GISLISGVKYQKGG-.LVINDTGLYFYYSKIYFR--.-GQSCN-.-----N-.....QPLSHKVYVKNKY...PQDLVLMMEGKMmNYCTTGQM--
...WARSYLGAVFNFSTNDHLYVN.VS.-ELSLINFE-----
TNFL6_RAT/157-278 LEWEDTY-.GTALISGVKYKGG-.LVINEAGLYFYYSKVYFR--.-GQSCN-.-----S.....QPLSHKVYMRNFY...PGDLVLMMEKKLNCTTGQI--
...WAHSSYLGAVFNLTVADHLYVN.IS.-OLSLINFE-.ESKTFFGFGL
TNFL6_MOUSE/158-279 LEWEDTY-.GTALISGVKYKGG-.LVINETGLYFYYSKVYFR--.-GQSCN-.-----N-.....QPLNHKVYMRNSKY...PEDLVLMMEKRLNCTTGQI--
...WAHSSYLGAVFNLTSADHLYVN.IS.-OLSLINFE-.ESKTFFGFGL
Q8K3Y7_RAT/118-252 LHWENNLG.MAFTKKNRMNYTKNF-.LVIPESGDYFYYSQITFR--.-GTTSECgDISRVRrPKKP....DSITVITVKVADSY...PEPAHLLTGTK.SVCEISSN--
...WFQPIYLGAMFSLLEEGDRLMVN.VS.-DISLVDYTK.EDKTFFGFGL
Q80Yz0_MOUSE/118-252 LHWEHDLG.MAFTKKNRMNYTKNF-.LVIPESGDYFYYSQITFR--.-GTTSECgDISRGRrPNKP....DSITVITVKVADSY...PEPARLLTGTK.SVCEISSN--
...WFQSLYLGATFSLLEEGDRLMVN.VS.-DISLVDYTK.EDKTFFGFGL
Q8K3Y8_MOUSE/118-252 LHWEHDLG.MAFTKKNRMNYTKNF-.LVIPESGDYFYYSQITFR--.-GTTSECgDISRGRrPNKP....DSITVITVKVADSY...PEPARLLTGTK.SVCEISSN--
...WFQSLYLGAMFSLLEEGDRLMVN.VS.-DISLVDYTK.EDKTFFGFGL
Q5VWHI_HUMAN/40-174 LHWEHEL.GAFTKKNRMNYTKNF-.LVIPESGDYFYYSQITFR--.-GMTSECSEIRQAGrPNKP....DSITVITVKVADSY...PEPTQLLMGTK.SVCEVGSN--
...WFQPIYLGAMFSLQEGDKLMVN.VS.-DISLVDYTK.EDKTFFGFGL
TNF14_HUMAN/112-240 LLWETQL-.GLAFLRGLSYHDGA-.LVVTKAGYIYYSKVOLG--.-GVCGP-.----LGLA---
...STITHGLYKRTPRY...PELELLVSQO.SPCGRATSSr...vWWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVR.VL.-DERLVRDR.GTRSIFYGAFMV
TNF14_MOUSE/110-239 LLWETRL-.GLAFLRGLTYHDGA-.LVVTEPGYIYYSKVOLS--.-GVCGP-.-----
OGLANG...LPITHGLYKRTSR...PKELELLVSR.SPCGRANSR...vWWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVR.VP.-GNLVRPRD.GTRSIFYGAFMV
Q7TSL5_PERMA/164-301 LDWEASOE.EAFLRSQVFSSTDG.LALPRGIIYIYCHVGYR--.-GRAPP-
AGRRRARS.LTLRSALYRAGGAYG.rGSPPELLLEGAE.VTTPVVDPIYg...sLWYTSVGFGLVQIRSGERYVN..IS.-HPDMVDYR-.RGKTFFGAMV
Q6MC45_RAT/i68-305 LWSEASOE.EAFLRSQAQFSPTHG.LALPDGVYIYCHVGYR--.-GRTPP-
AGRRRARS.LTLRSALYRAGGAYG.rGSPPELLLEGAE.VTTPVVDPIYg...sLWYTSVGFGLVQIRSGERYVN..IS.-HPDMVDYR-.RGKTFFGAMV
TNFC_MOUSE/i68-305 LWSEASOE.EAFLRSQAQFSPTHG.LALPDGVYIYCHVGYR--.-GRTPP-
AGRRRARS.LTLRSALYRAGGAYG.rGSPPELLLEGAE.VTTPVVDPIYg...sLWYTSVGFGLVQIRSGERYVN..IS.-HPDMVDYR-.RGKTFFGAMV
TNFC_MARMO/i52-293 LWSEAKKE.EAFLRSQFSAEGL.LALPDGLYIYCHVGYR--.-GRAPP-
SGAGPDRS.VTLRSSLYRAGGAYG.rGAPELLLEGAE.VTTPVLDRAgpg.vpLWYTSVGFGLVQLRRGERVYN..IS.-HPDMVDYR-.RGKTFFGAMV
TNFC_PIG/8-149 LGWEAKKE.EAFLRSQFSAEGL.LALPDGLYIYCHVGYR--.-GRAPP-
PGGDPLDRS.VTLLSRLYRAGGAYG.pGTPPELLLEGAE.VTTPVLDPRrhe.vpLWYTSVGFGLVQLRRGERVYN..IS.-HPDMVDYR-.RGKTFFGAMV
Q5TM22_MACMU/i02-243 LGWEATKE.QAFLTSQFSDADG.LALPDGLYIYCHVGYR--.-GRAPP-
GGAEPGRS.VTLRSSLYRAGGAYG.pGTPPELLLEGAE.VTTPVLDPAgpg.vpLWYTSVGFGLVQLRRGERVYN..IS.-HPDMVDFA-.RGKTFFGAMV
TNFC_PANTR/i02-243 LGWETTK.EAFLTSQFSDAEG.LALPDGLYIYCHVGYR--.-GRTPP-
GGDPOGRS.VTLRSSLYRAGGAYG.pGTPPELLLEGAE.VTTPVLDPARcgg.vpLWYTSVGFGLVQLRRGERVYN..IS.-HPDMVDFA-.RGKTFFGAMV
TNFC_HUMAN/i02-243 LGWETTK.EAFLTSQFSDAEG.LALPDGLYIYCHVGYR--.-GRAPP-
GGDPOGRS.VTLRSSLYRAGGAYG.pGTPPELLLEGAE.VTTPVLDPARcgg.vpLWYTSVGFGLVQLRRGERVYN..IS.-HPDMVDFA-.RGKTFFGAMV
TNFC_MACMU/i01-249 LRWVSGYE.EAFLKSGTFLDGEGLALPDGLYIYCHVGYR--.-GRAPP-
GRAPSGEORFSAQDPG.....VPVTLSSQLFRAGASGSEPELLLQGFETVTPVVOHARGVFC..gpLWYATVGFGLVQLRRGGEKIYVN..VS.-HLELVDFR-.RGKTFFGAMV
TNF5_RAT/137-260 LOWAEKGY.YTMSNNLVLENGKQ.LTVKROGLYYIYAQVTF--.-SNREP-.-----LSQ.....RPFIVSLWLKPS--...GSERILLRAANTHSSSKLC---
...EQOSIHLGGVVFELQAGASVFN.VT.-EASQVHGR-.TGFTSFGLLKL
TNF5_MOUSE/137-260 LOWAEKGY.YTMSNNLVLENGKQ.LTVKROGLYYIYAQVTF--.-SNREP-.-----SSQ.....RPFIVGLWLKPS--...GSERILLKAANTHSSSQLC---
...EQOSVHLGGVVFELQAGASVFN.VT.-EASQVHGR-.VGFTSFGLLKL
TNF5_CALJA/138-261 LOWAEKGY.YTMSNNLVLENGKQ.LTVKROGLYYIYAQVTF--.-SNREA-.-----SSQ.....APFIASLCLKPPN...RFRILLRAANTHSSAKPC---
...GOOSIHLGGVVFELQAGASVFN.VT.-DPSQVSHG-.TGFTSFGLLKL
TNF5_AOTTR/138-261 LOWAEKGY.YTMSNNLVLENGKQ.LTVKROGLYYIYAQVTF--.-SNREA-.-----SSQ.....APFIASLCLKPPN...RFRILLRAANTHSSAKPC---
...GOOSIHLGGVVFELQAGASVFN.VT.-DPSQVSHG-.TGFTSFGLLKL
TNF5_MACMU/137-261 LOWAEKGY.YTMSNNLVLENGKQ.LTVKROGLYYIYAQVTF--.-SNREA-.-----SSQ.....APFIASLCLKSPG...RFRILLRAANTHSSAKPC---
...GOOSIHLGGVVFELQAGASVFN.VT.-DPSQVSHG-.TGFTSFGLLKL
TNF5_HUMAN/138-261 LOWAEKGY.YTMSNNLVLENGKQ.LTVKROGLYYIYAQVTF--.-SNREA-.-----SSQ.....APFIASLCLKSPG...RFRILLRAANTHSSAKPC---
...GOOSIHLGGVVFELQAGASVFN.VT.-DPSQVSHG-.TGFTSFGLLKL
TNF5_CERTO/138-261 LOWAEKGY.YTMSNNLVLENGKQ.LTVKROGLYYIYAQVTF--.-SNREA-.-----SSQ.....APFIASLCLKSPG...RFRILLRAANTHSSAKPC---
...GOOSIHLGGVVFELQAGASVFN.VT.-DPSQVSHG-.TGFTSFGLLKL
TNF5_MACNE/117-240 LOWAEKGY.YTMSNNLVLENGKQ.LTVKROGLYYIYAQVTF--.-SNREA-.-----SSQ.....APFIASLCLKSPG...RFRILLRAANTHSSKPC---
...GOOSIHLGGVVFELQAGASVFN.VT.-DPSQVSHG-.TGFTSFGLLKL
TNF5_PIG/138-261 LOWAPKGY.YTLLSTNLVLENGKQ.LAVKROGLYYIYAQVTF--.-SNRDA-.-----AGQ.....APFIASLCLRSPS...GSERILLRAANTHSSSKPC---
...GOOSIHLGGVVFELQAGASVFN.VT.-DPSQVSHG-.TGFTSFGLLKL
TNF5_BOVIN/138-261 LOWAPKGY.YTLLSTNLVLENGKQ.LAVKROGLYYIYAQVTF--.-SNRET-.-----LSQ.....APFIASLCLKSPS...GSERILLRAANTHSSSKPC---
...GOOSIHLGGVVFELQAGASVFN.VT.-DPSQVSHG-.TGFTSFGLLKL
TNF5_CANFA/137-260 LRWAPKGY.YTSSNNLVLENGKQ.LAVKROGLYYIYAQVTF--.-SNRAA-.-----SSQ.....APFVASLCLHSPS...GTERVLLRAASrGSSKPC---
...GOOSIHLGGVVFELHPGASVFN.VT.-DPSQVSHG-.TGFTSFGLLKL
TNF5_FELCA/137-260 LRWAPKGY.YTSSNNLVLENGKQ.LAVKROGLYYIYAQVTF--.-SNREA-.-----SSQ.....APFIASLCLHSPS...GSERVLLRAANrSSSKPC---
...GOOSIHLGGVVFELHPGASVFN.VT.-DPSQVSHG-.TGFTSFGLLKL
TNF5_CHICK/152-272 LKWMTTT-.YAPTSSLLSYHEGK-.LKVEKAGLYIYYSQVFSFC--.-TKAAAS-.-----APFTLYIYLYLPM...EEDRLMKGLDthSTALC--
...ELQSIREGGVVFELRQGMVFN.VT.-DSTAVNVN-.PGNTYGFMKFL
TNF11_MOUSE/184-312 SSWYHDR-.GWAKISNMTLSNGK-.LRVNDQGFYYIYANICFR--.-HHETS-.----
GSVPTDY.LQLMVYVVKTSIKI...PSSNLMKGGG.TKNWSGSEF...HFYSINVGGFFKLRAGEEISIQ.VS.-NPSLLDPD-.QDATYFGAFKV
TNF11_RAT/186-314 SSWYHDR-.GWAKISNMTLSNGK-.LRVNDQGFYYIYANICFR--.-HHETS-.----
GSVPADY.LQLMVYVVKTSIKI...PSSNLMKGGG.TKNWSGSEF...HFYSINVGGFFKLRAGEEISVQ.VS.-NPSLLDPD-.QDATYFGAFKV
TNF11_HUMAN/185-313 SSWYHDR-.GWAKISNMTFSNGK-.LIVNDQGFYYIYANICFR--.-HHETS-.----
GDQATEY.LQLMVYVVKTSIKI...PSSHTLMKGGG.TKYWSGSEF...HFYSINVGGFFKLRAGEEISIE.VS.-NPSLLDPD-.QDATYFGAFKV
Q90WT9_CHICK/158-285 TRWEDST-.IHSHLQNTYRDR-.LRVNDQAGKYIYYSQIYFR-YsRdGAGARV-
...VPQLVQCINWTSY...SQPILLKGVG.TKCWAPEAEY...GLHALYQGLFELKAGDELFS.VS.--SLAIDYSD.AAASYFGAFRL

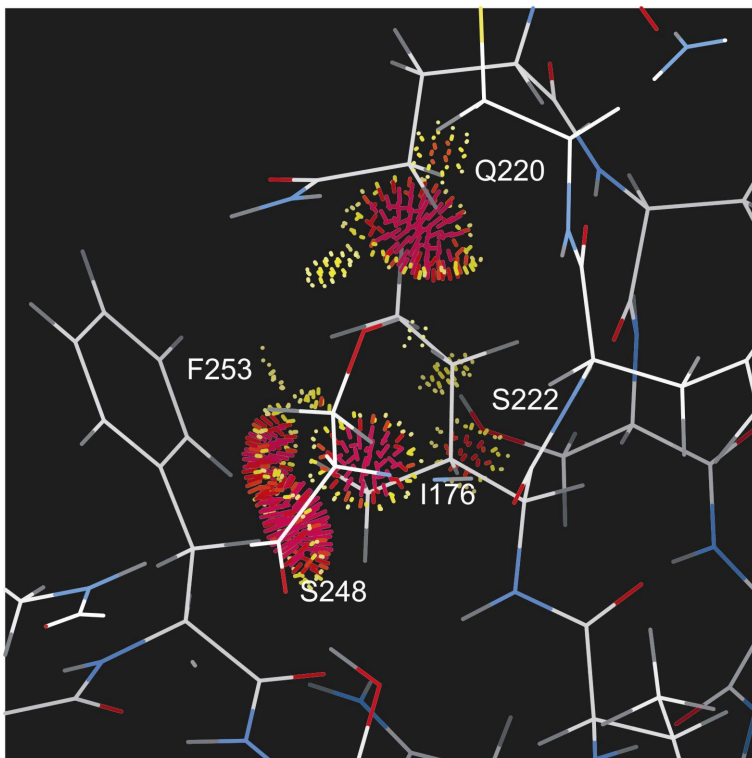
Q9DDZ5 BRARE/84-212 HTWANKSFGAHLNMTLTNGR- LRVPODGRYYLYSOVYFR--YSPS-DSDqSSVSHQLVQCIYKKTYSY-
LNPIQLLKGVG TKCWAPDAEYALHSVYQGLFELRAGDEVFVSVS- SPTMVYGE- DSSSYFGAFRL
Q7ZYX9 BRARE/187-315 HTWANKSFGAHLNMTLTNGR- LRVPODGRYYLYSOVYFR--YSPS-DSDqSSVSHQLVQCIYKKTYSY-
LNPIQLLKGVG TKCWAPDAEYALHSVYQGLFELRAGDEVFVSVS- SPTMVYGE- DSSSYFGAFRL
Q5U675 HUMAN/152-275 NSWESSRSGHSFLSNLHLRNGE- LVIHEKGFYIYSQTYFR--FQEEI-KenTKNDKQMVQYIYKTYSY-
PDPILLMKSAR NSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVT- NEHLMD- HEASFFGAFIV
TNF10 HUMAN/152-280 NSWESSRSGHSFLSNLHLRNGE- LVIHEKGFYIYSQTYFR--FQEEI-KenTKNDKQMVQYIYKTYSY-
PDPILLMKSAR NSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKENDRIFVSVT- NEHLMD- HEASFFGAFIV
Q8K3G0 RAT/156-287 ETWESSRRGHSFLNHLVLRNGE- LVIQEEGLYIYSQTYFR--FKEAKEaSKTVSKdGGRKQMVQYIYKTYSY-
PDPILLMKSAR NSCWREAEYGLYSIYQGLFELKENDRIFVSVT- NEHLMD- HEASFFGA--
TNF10 MOUSE/156-290 ESWESSRKGHSFLNHLVLRNGE- LVIQEEGLYIYSQTYFR--FQEAEDAaSKMVSkdKVRTKQLVQYIYKTYSY-
PDPIVLMKSAR NSCWSDAEYGLYSIYQGLFELKENDRIFVSVT- NEHLMD- QEASFFGAFI
Q7T1F2 CHICK/156-290 HSWESSRRGHSFLYNNVLRNGE- LVVPOGTFYIYSQTYFR--FRENEDEdSGLLErIKNPKQLVQYIYKLTNY-
PDPILLMKSAR TSCWKAKEYGLYSVYQGGVFLKREDRIFVSVS- NSDIVDMD- KEASFFGAFMI
Q6DHG9 BRARE/158-298 OSWESEKGLAFLQNVLSdGE- LVVPOAGLYIYSQTYFR--
HTLIEEDESAREDeYGSmgesvrgKPMLOQVYVKKVSSYQVP ILLMKNAR .TTCWSRdSEYGLYSIYQAGLFQLGSGDRVFVTVS- NVSTIDMD- EKSSFFGAFIV
Q8JHJ4 CHICK/169-287 VPWLLSFKRGTALeQCNkIVIKETGYFFIYGQVLYT-DTTFAMGHLIQRKKAHVfgdLSLVTLFRCIQnMPQSYPN--
--NSCYTAGIAKLEEGDELQLTIP- RRRAKISLD .GDGTFGAVRL
TNi3B_HUMAN/166-284 VPWLLSFKRGSALeKENkIVKETGYFFIYGQVLYT-DKTYAMGHLIQRKKVHVfgdeLSLVTLFRCIQnMPETLPN--
--NSCYSAGIAKLEEGDELQLAIP- RENAQISLD .GDVTFGALK
TNi3B_MOUSE/190-308 VPWLLSFKRGNALeKENkIVVROGTYFFIYSQVLYT-DPIFAMGHVIQRKKVHVfgdeLSLVTLFRCIQnMPKTLN--
--NSCYSAGIAKLEEGDEIQLAIP- RENAQISRN .GDDTFGALK
TNF13_MOUSE/127-241 VMWQPVLRRGRGLEAOGDI VRVWDTGIYLLYSQVLFH-DVTFTMGQVVSREGQ--GRRETLFRCIrSMPSDPDR--
AYNSCYSAGVFFHLHQGDITVKIP- RANAKLSLS .BHGTFLGFVIL
Q8BX52_MOUSE/296-410 VMWQPVLRRGRGLEAOGDI VRVWDTGIYLLYSQVLFH-DVTFTMGQVVSREGQ--GRRETLFRCIrSMPSDPDR--
AYNSCYSAGVFFHLHQGDITVKIP- RANAKLSLS .BHGTFLGFVIL
Q5PQI1_RAT/126-240 VMWQPALRRGRGLEAOGDI VRVWDTGIYLLYSQVLFH-DVTFTMGQVVSREGQ--GRRETLFRCIrSMPSDPDR--
AYNSCYSAGVFFHLHQGDITVKIP- RANAKLSLS .BHGTFLGFVIL
TNF13_HUMAN/136-250 VMWQPALRRGRGLAOGQVRIODAGVYLLYSQVLFQ-DVTFTMGQVVSREGQ--GRQETLFRCIr .SMPShPDR--
AYNSCYSAGVFFHLHQGDILSVIIP- RARAKLNSL .BHGTFLGFVIL
TNF17_HUMAN/73-191 LYWOGGPA .lGRSFLHGFELDKGO- LRIHRDGIYMVHIQVTLA-ICS-STtASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRSLFhQGC-----
--TIASORLTPLARGDTLCTNLTGTLPSRntDETFFGVQWV
TNF17_MOUSE/75-193 LRWAGGPA .lGRSFTHGPELEGH- LRIHODGLYRLHIQVTLA-NCS-SPgStLQHRATLAVGICSPAAHGISLLRGRFgQDC-----
--TVALORLTYLVHGDVLTCTNLTLPLLPsrN .ADETFGQWV
TNF18_HUMAN/67-170 SKWOMASSEPDCVN- KVSdWK- LELLQNGLYLIYQVAPN-ANYN--DVAPFEVRLYKKNKDMI-QTLTN--
KSKIQNVGGTYELHVGGTLDLFN- SEHOVL- KNNTYWGIIIL
Q80YG2_MOUSE/61-166 SKWHMTSPKPHCVN- TTSdGK- LKILQSGTYLIYQVIVP-DKKI--KDNAPFVVQIYKKNdVL-QTLMN--
DFOTLPIGGVYELHAGDITLFN- SKDHIO- KNNTYWGIIIL
EDA_MOUSE/272-385 NDWSRITMNPkVFKLHPRSGeLEVLVDGTYFIYSQVEV-YYINFTDFASyEVVVDEKPFLOCTR .SIEtGKT--
NYNTCYTAGVCLLKARQKTAVKMV- HADISLNMS .KHTTFGAIrL
EDA_HUMAN/272-385 NDWSRITMNPkVFKLHPRSGeLEVLVDGTYFIYSQVEV-YYINFTDFASyEVVVDEKPFLOCTR .SIEtGKT--
NYNTCYTAGVCLLKARQKTAVKMV- HADISLNMS .KHTTFGAIrL
EDA_BOVIN/272-385 NDWSRITMNPkVFKLHPRSGeLEVLVDGTYFIYSQVEV-YYINFTDFASyEVVVDEKPFLOCTR .SIEtGKT--
NYNTCYTAGVCLLKARQKTAVKMV- HADISLNMS .KHTTFGAIrL
Q9V5G2_DROME/304-415 NDNERNsYOGHFOTRdGv- LTVTNTGLYyVYAQICYN-NSHDQNGFIVFQGDTPFLOCLntVPTnMPH--
KVHTCHTSLIHLERNER IHLK .dIH- NDRNAVLRGnNRSYFGIFKV
Q8IGD3_DROME/298-409 NDNERNsYOGHFOTRdGv- LTVTNTGLYyVYAQICYN-NSHDQNGFIVFQGDTPFLOCLntVPTnMPH--
KVHTCHTSLIHLERNER IHLK .dIH- NDRNAVLRGnNRSYFGIFKV
Q8MRW2_DROME/150-261 NDNERNsYOGHFOTRdGv- LTVTNTGLYyVYAQICYN-NSHDQNGFIVFQGDTPFLOCLntVPTnMPH--
KVHTCHTSLIHLERNER IHLK .dIH- NDRNAVLRGnNRSYFGIFKV
Q69HR0_CIOIN/178-304 TDWAPPDSHFKGFgTRHLNNDGyFTVPAGVYFVYSOVVFNV-
TNLPFMVSEIGVNVDGQSTFRSQFNTLIRSTPRAsstrkRFVTCHSNGIVYMKANHGVSLSVN- PPSVEVFLA .PQYTYFGAFI
Q8IZK7_HUMAN/131-166 SGWEeARiNSSSPLRYNRQIGe- FIVTRAGLYLYCOVHFD-EGKA-VYLKLDLL-----
VdGVLARCLLeFSATAASSLgpQLRLCOVSGLLALRPGSSLRIR-TLPWAHLKAaPFLTYFGFLFQV
Q6AYC1_RAT/131-248 SGWEeTKINSSSPLRYDRQIGe- FTVIRAGLYLYCOVHFD-EGKA-VYLKLDLL-----
VNGVLAARCLLeFSATAASSPgpQLRLCOVSGLLALRPGSSLRIR-TLPWAHLKAaPFLTYFGFLFQV
TNF12_MOUSE/131-248 SGWEeTKINSSSPLRYDRQIGe- FTVIRAGLYLYCOVHFD-EGKA-VYLKLDLL-----
VNGVLAARCLLeFSATAASSPgpQLRLCOVSGLLALRPGSSLRIR-TLPWAHLKAaPFLTYFGFLFQV
Q800J1_CHICK/114-232 LSLTDNGV-CDNlQCKSEe- LVIRKOGLYLIYCHLNfH-FANCS-TDLKIELLINNEVNRQTLSTWCAASdSCQEK----
NFKTLFOLHLTYLKEEDRISSTLS- HPKFLNEIHLpNDNVGLVrL
TNF18_MOUSE/118-235 LSWNEDGTIHGLIYQDGN- LTVQFPLGYFIVCQLQFL-VQCS--NHSVDLTLQLLINSKIKKQTLVTVCE .SGVQSKN--
IYQNLQFLLHYLQVNSTISVRVD- NFOYVDNTIPLDNVLSVFLY
TNF18_HUMAN/113-230 LSWNKdGTLHGVRyQDGN- LVIQFPLGYFII CQLQFL-VQCP--NNSVDLKELELLINKHIKKQALVTVCE .SGMQTKH--
IYQNLQFLLHYLQVNTISVNVD- TFQYIDTSTIPLENVLSIFLY
Q6DI63_MOUSE/142-243 NSVVTNPQ-GHYNPSTGK- FTCEVPLGYFVYYSHT-ANLC-VHLNLNLARVASFCdHMFN--
SKOVSSGvLLRLQRGDVWLSVN- DYNGMVGIE .GSNSVFSGFL
Q80WE6_RAT/163-301 LNWHsQeGagSSYLsRGLRYEDKKeLVVDSPLGYyVfLELkLS-PTSINTG-
RKVQGWVSLVLQAKPQVDHLDSLALtVElFPCSMEDKLVdrswNRLRLKAGHRLSVDLRAyLHgaQD .-AYRDWELSH .ANTTSFGLFLV

```

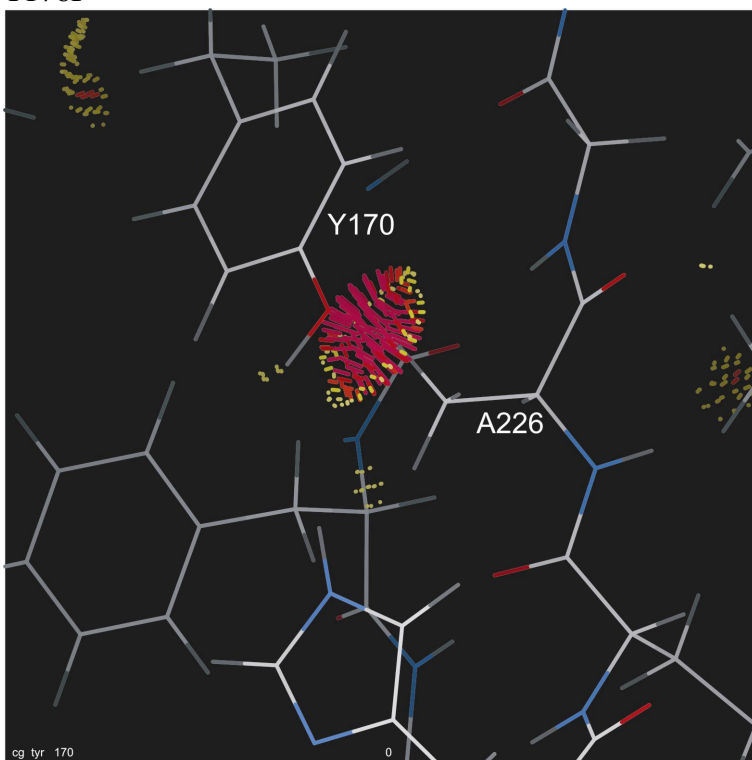
TNFL9_MOUSE/164-302 LNWHSDGagSSYLSQGLRYEEDKKeLVVDSPGLYYVFLELKLs-- .PTFTNTG- .-----.-
HKV. . . . . QGWVSLVLOAKPQV. . . . . DDFDNLALTVElFPCSMENKLVd. . . . . rSWSQLLLLKAGHRLSVGLRAYLHgaQD. -AYRDWELSY. PNTTSFGLFLV
TNFL9_HUMAN/107-240 LSWYSDPGLaGVSLTGGLSYKEDTKeLVVAKAGVYVYVFFQLELR-- .RvVAGEGSG- .-----S. . . . . VSLALHLQPLRSA- . . . . AGAAALALTVDlPPASSEAR--
. . . . . NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH. . LhtEARARHAWQLtOGATVlGLFRV
TNF4_MOUSE/77-181 ISSYKNEY. .-----QTMEVQNNs- .VVIKCDGLYIIYLKGSFF-- . . .-----
. . . . . QEVKIDLHFREDHN. . . . . PISIPMLNDGrRIVFTVVASLA. . . . . FKDKVYLTvNAPDTLCEHLQIN. .DG. -ELIVVQLT- .PG-----
TNF4_RAT/77-181 IGTSKNEY. .-----ETMEVQNNs- .VIINCdGLYLlHLKGSFF-- . . .-----
. . . . . QEVKINLHFRKDRS. . . . . PIFVPMLNNGQrVVFTVVTSLA. . . . . FKDEVYLTvNASDTLCEHLQIN. .DG. -ELIIVQLT- .PN-----
TNF4_HUMAN/77-182 LTSQKED- .-----EIMKVQNNs- .VIINCdGFYLlSLKGYFS-- . . .----- . . . . . QEVNISLHYQKDEE. . . . . PLFQ--
LKKVRSVNSLMVASLT. . . . . YKDKVYLNvTTDNTSLDDFHvN. .GG. -ELILIHONP. .-----GEFCV
Q8IV74_HUMAN/27-132 LTSQKED- .-----EIMKVQNNs- .VIINCdGFYLlSLKGYFS-- . . .----- . . . . . QEVNISLHYQKDEE. . . . . PLFQ--
LKKVRSVNSLMVASLT. . . . . YKDKVYLNvTTDNTSLDDFHvN. .GG. -ELILIHONP. .-----GEFCV
TNF4_RABIT/81-186 LPLQKRD- .-----GTMEVQNNs- .VVIQCdGFYLlSLKGYFS-- . . .----- . . . . . QEVNISLHYRKG--
. . . . . EEPFPILKKTkFANSNVVLKLG. . . . . YKDKVYLNvTTDSASCKQLSVN. .AG. -ELIVILQNP. -

```

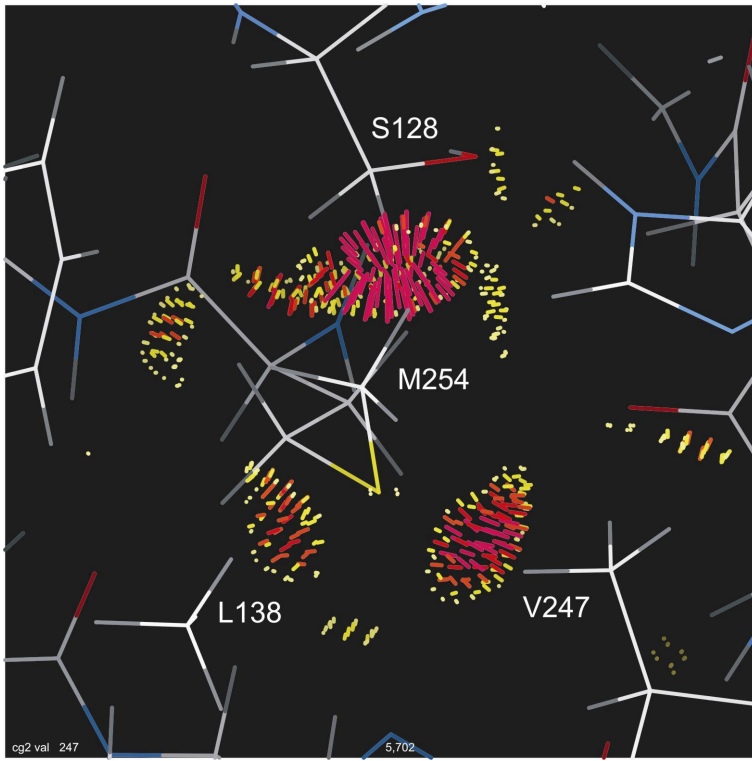

LIITE 2: RAKENTEeseen SOPIMATTOMAT MUTAATIOt
(TAULUKOSSA 3 KOROSTETUT)



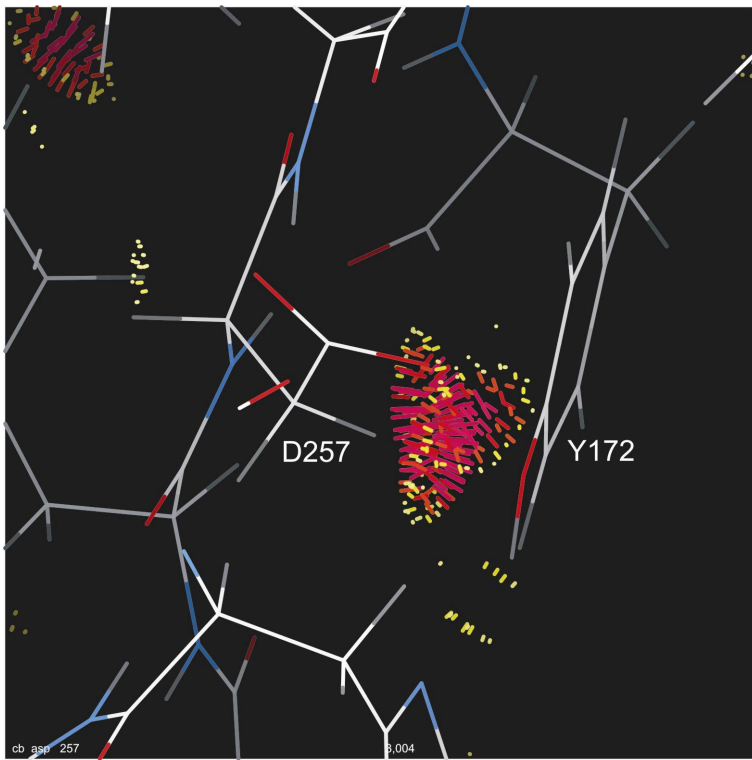
T176I



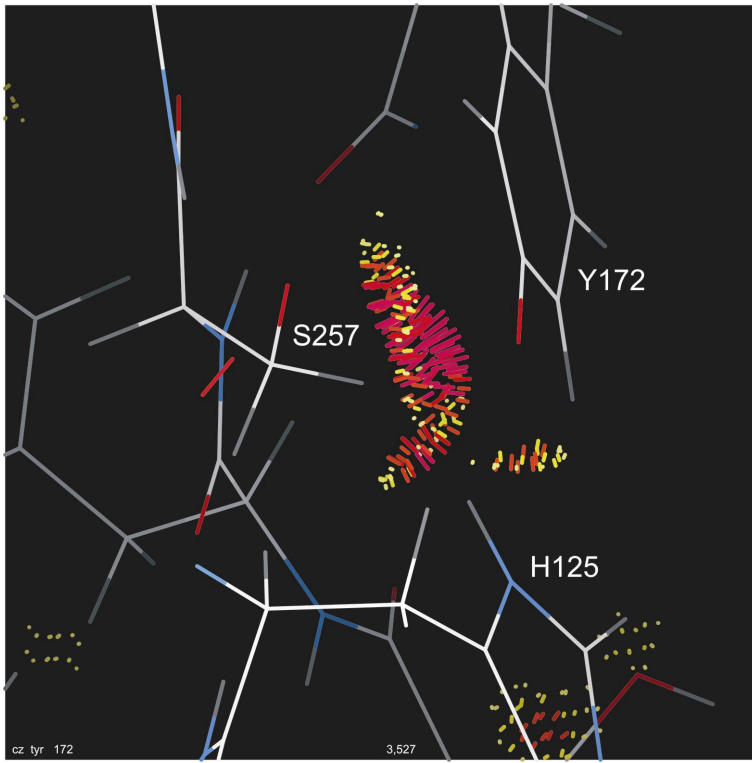
G226A



T254M



G257D



G257S