

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium receptorů NK buněk a jiných
proteinů pomocí rekombinantní exprese
a hmotnostní spektrometrie

Autoreferát dizertační práce

Daniel Kavan

Školitel: Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

Praha 2010

Úvod

NK buňky a jeden z jejich receptorů CD69

Přirození zabijedci (NK buňky) jsou subpopulací velkých granulárních lymfocytů, kterým na buněčném povrchu schází receptory charakteristické pro B a T buňky. Jsou nicméně charakterizovány přítomností NKp46 a NKp30 [Moretta L. et. al. 2002]. Pojmenování buněk přirození zabijedci vzniklo podle funkce v organismu, protože nepotřebují žádnou předchozí aktivaci a přesto jsou schopny eliminovat nenormální (tedy infikované nebo transformované) buňky z tkáně [Kiessling R. et. al. 1975]. Tato funkčnost je založena na kontrole MHC molekul I. Třídy okolních buněk. Výsledná akce (zničení nebo nezničení cílové buňky) je výsledkem rovnováhy aktivačních a inhibičních signálů zprostředkovanými povrchovými receptory a převedenými na konkrétní signální dráhy [Raulet D. H. et. al. 2001].

Specifita NK buněk není závislá na jediném druhu receptoru, jako je tomu u B a T buněk, ale je dána různorodostí jejich povrchových receptorů [Lanier L. L. 2005]. Tyto receptory pak mohou být inhibiční, nebo aktivační.

Lektiny C-typu byly poprvé popsány v roce 1988 [Drickamer K. (1988)] a jejich charakteristickým rysem je

přítomnost vysoce konzervované sacharid vázající domény (CRD), která je stabilizována dvěma nebo třemi disulfidovými můstky. Rozdílná vazebná specifita je dána účastí variabilních smyček na tvorbě vazebného místa.

Tuto strukturní rodinu můžeme rozdělit do několika podskupin, z nichž jsou na povrchu NK buněk nejhojněji exprimované lektiny C-typu II. třídy. Tyto proteiny obsahují na extracelulárním C-konci jednu CRD doménu. Tato terciární struktura byla poprvé rozřešena u molekuly CD94 [Boyington J. C. et. al. 1999]. CRD doména je obvykle glykosylovaná a receptory se vyskytují ve formě homodimerů (výjimkou je heterodimer CD94-NKG2 [Lazetic S. et. al. 1996]). Pokud máme zmínit některé zástupce, pak je třeba jmenovat CD69, NKR-P1, NKG2 a Ly49.

CD69 je považován za marker aktivovaných lymfocytů. Ačkoli se nejprve z pokusů *in vitro* předpokládalo, že se podílí na procesu eliminace nádorových buněk, pozdější výzkum na myších prokázal jeho úlohu při tlumení imunitní reakce [Sancho D. et. al. 2005], kdy byly CD69⁻ myši odolnější vůči nádorům, pravděpodobně vzhledem ke zvýšené apoptóze CD69⁺ NK buněk po kontaktu s nádorem [Esplugues E. et. al. 2003].

Zpracování MS dat

Vodíko-deuteriová výměna je chemický děj, při kterém je kovalentně vázaný atom vodíku vyměněn za deuterium,

nebo naopak. Zkoumané protony jsou většinou amidické vodíky peptidové vazby. Tato metoda poskytuje údaje o přístupnosti různých částí molekuly a tedy o terciární struktuře proteinu [Zhang Z., Smith D. L. (1993)].

Vyhodnocování pokusů s H/D výměnou pomocí NMR má jedinečné rozlišení, protože můžeme rozlišit každou jednotlivou aminokyselinu (kromě prolinů). Bohužel jsou zde však poměrně vysoké nároky na vzorek a navíc již musíme mít přiřazené píky jednotlivým aminokyselinám, což je samo o sobě dosti složité, navíc některé proteiny vůbec nemusí poskytovat spektra dostatečné kvality. Naopak rozlišení MS u H/D výměny je závislé na efektivitě proteolýzy a pohybuje se v rozmezí 5-10 aminokyselin. Nicméně požadované množství vzorku se pohybuje v mikrogramech a navíc můžeme vyhodnocovat i výsledky z velmi flexibilních forem proteinů.

Nejsilnějším rysem H/D výměny ale nejsou úrovně deuterace jako takové, ale spíš jejich vzájemné porovnání (úroveň deuterace proteinu s úrovní deuterace komplexu protein-ligand může napovědět polohu vazebného místa, protože ligand může částečně stínit část proteinu a tím zpomalit deuteraci).

Cíle práce

Předkládaná práce měla dva hlavní cíle. Prvním byla příprava a charakterizace několika forem receptoru CD69 a druhým poskytování bioinformatického zázemí při zpracovávání hmotnostně spektrometrických dat. Pro jejich splnění byly stanoveny tyto konkrétní podcíle:

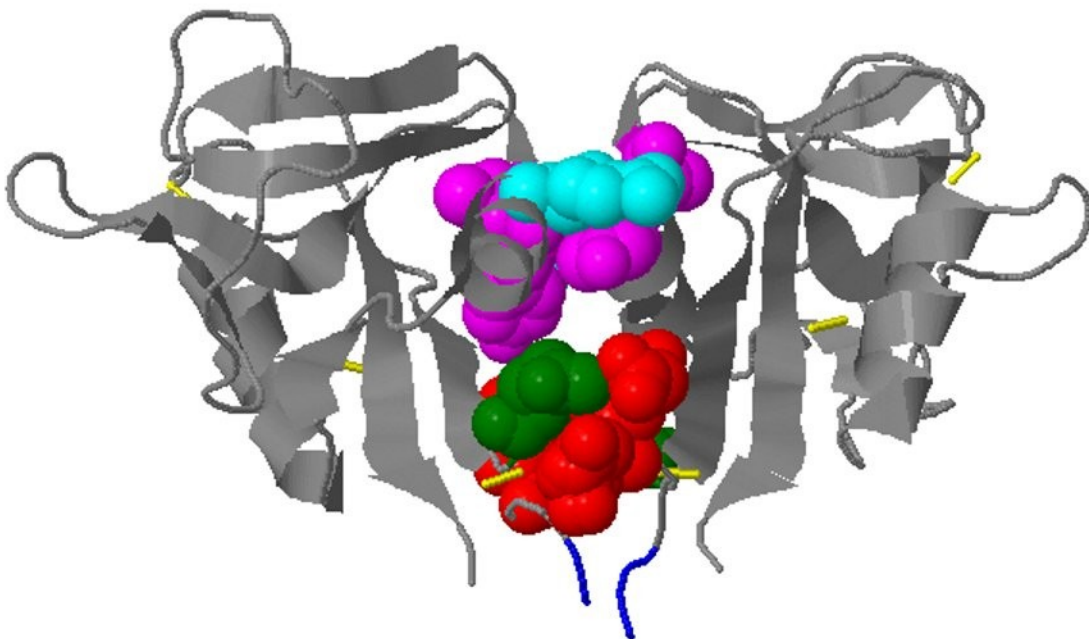
- Najít renaturační protokol, který by zajistil dostatečné množství CD69 pro strukturní studie prováděné pomocí NMR
- Provést NMR titrační experimenty a sledovat pomocí NMR strukturní změny, ke kterým dochází v průběhu a po vazbě N-acetyl glukosaminu
- Příprava mutantů CD69
- Vývoj makra pro program DataAnalysis pro zpracovávání MS dat z pokusů vodíko-deuteriové výměny
- Vývoj softwarových nástrojů pro obrazové znázornění výsledků získaných z vodíko-deuteriové výměny
- Zvládnutí dalších bioinformatických úloh týkajících se zpracování MS dat

Těchto cílů bylo dosaženo za použití vhodných metodik počínaje molekulárním klonováním, přes biochemické techniky až po pokročilé analytické metody, jakou je např. NMR spektroskopie.

Výsledky a diskuse

Příprava rozpustných forem molekuly CD69

Přesný postup přípravy stabilních nekovalentních dimerů CD69 je popsán v literatuře (Vaněk et. al. 2008). Podrobným zkoumáním trojrozměrné struktury získané z krystalu (uloženého v RCSB Protein Databank pod přístupovým kódem 3CCK) jsme odhadli, že se na vezebné interakci obou podjednotek dimeru podílí Q93 jedné a D88 spolu s E87 na druhé podjednotce. Ještě výraznější kontakt byl nalezen u R134 jedné a A136 a Y135 druhé (viz obrázek 1).



Obr. 1: Model dimeru CD69 [Vaněk O. et. al. 2008]. Těsná interakce Q93 (zeleně) s D88 a E87 (červeně) a R134 (světle modře) s A136 a Y135 (růžově). V82 a S83 na N-konci modře. Disulfidové můstky žlutě.

Na základě tohoto byly pak Q93, R134 nebo oba mutovány na alaniny, mutantní molekuly produkovány a analyzovány gelovou filtrací, která ukázala, že jako monomer se chovala jen dvojnásobně zmutovaná forma, zatímco obě zbývající se jako monomer chovaly jen z části.

Zkoumání vazby vápníku a sacharidů různými formami stabilních molekul CD69

Úvodní pokusy s vazbou ligandů byly provedeny, aby se potvrdila schopnost konstruktů CD69 vázat vápník a monosacharidy. V případě vazby vápníku jsme nepozorovali žádné významné rozdíly mezi jednotlivými CD69 formami dimerními (ať kovalentně nebo nekovalentně vázanými) či monomerní formou začínající serinem 100. Každá z těchto molekul vázala 1 mol vápenatých iontů na 1 mol podjednotek K_d přibližně $58\mu\text{M}$. Naopak v případě vazby hexosaminů byly pozorovány výrazné rozdíly, kdy byly hodnoty IC_{50} pro vazbu N-acetylglukosaminu a N-acetylgalaktosaminu přibližně 10^{-5} M v případě monomerní formy, ale o řád nižší v případě konstruktů začínajícího valinem 82. Pro nejdelší formy začínajícími glycinem 70 a kovalentně vázaný dimer začínající glutaminem 65 byla tato hodnota nižší dokonce o dva řády (viz obrázek 2). Pro následné vazebné studie byla z důvodu snadné a efektivní renaturace *in vitro* zvolena molekula začínající glycinem 70.

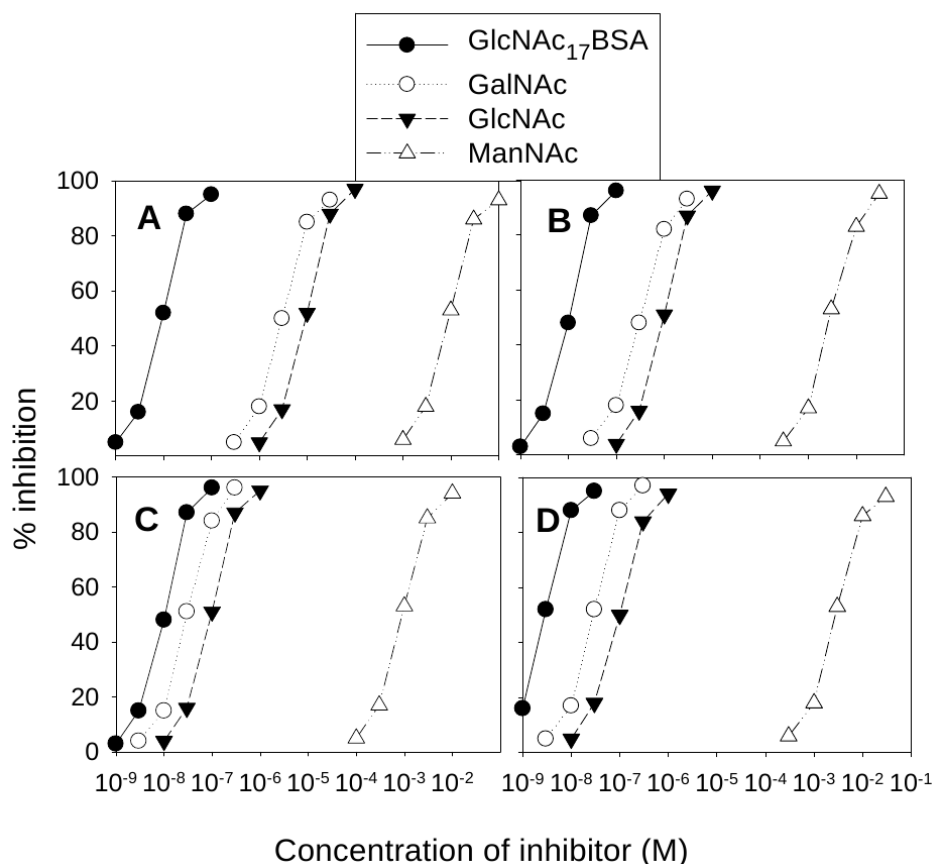


Fig. 2: . Inhibice vazby rozpustných forem CD69 na mikrotitrační destičku potaženou vysokoafinitním ligandem (GlcNAc₁₇BSA) pomocí neoglykoproteinu a monosacharidů. Zkoumanými proteiny byl monomerní CD69 (A), valine 82 (B), glycine 70 (C) a kovalentní dimer (D).

Vazba N-acetyl-β-D-hexosaminů nezpůsobuje žádné výrazné konformační změny molekuly CD69

Pro zjištění strukturních změn rozpustných CD69 po navázání ligandu jsem sledovali změny hydrodynamických vlastností receptoru. Velikost molekuly proteinu po vysycení N-acetylglukosaminem byla sledována a porovnána s velikostí molekuly předem inkubované s N-acetylmanosaminem, jako negativní kontrolou, pomocí gelové

filtrace na koloně Suprdex 200 HR a pomocí analytické ultracentrifugace. Ačkoli byl pozorován kratší retenční čas při gelové filtraci, který by mohl znamenat změnu velikosti molekuly, hodnota experimentálně stanoveného sedimentačního koeficientu byla v obou pokusech totožná. Navíc se nepodařilo najít žádné výrazné změny ani v porovnávaných HSQC NMR spektrech před a po saturaci ligandem.

Určení zapojení disulfidových můstků

Uspořádání disulfidových můstků v proteinech se v naší laboratoři dříve určovalo porovnáváním jejich redukovaných a neredukovaných tryptických štěpení analyzovaných pomocí LC-MS. Protože je to však velice složitá a nespolehlivá metoda s nejistými výsledky, snažili jsme se pro tento účel vyvinout metodu zcela novou.

Prvním problémem v těchto pokusech bývá změna zapojení v průběhu experimentu, které se často děje při vyšších hodnotách pH. Při štěpení kyselými proteasami, jako je pepsin, jsme schopni udržovat v celém průběhu kyselé pH, ovšem nízká specifita těchto proteas značně komplikuje vyhodnocování. Z těchto důvodů jsme do procesu štěpení zavedli oxidovanou složku známou z *in vitro* renaturace. Jako nejlepším činidlem se ukázal cystamin v 200 μM koncentraci. Protože naším dalším požadavkem na novou metodu byla použitelnost i na směsi proteinů, zkusili jsme jako separační techniku zavést SDS elektroforézu

s přísávkem cystaminu do vzorkového i běhového pufru. Po klasickém enzymatickém štěpení v gelu jsou výsledné peptidy analyzovány na LC-ESI-MS a jejich hmotnost porovnána teoretickými hmotami štěpení *in silico*.

Vyhodnocování MS dat z vodíko-deuteriové výměny

Automatické vyhledávání peptidů v hmotnostních spektrech a určování jejich monoisotopických hmot je založeno na přirozených výskytech jednotlivých isotopů, průměrném prvkovém složení peptidů a z toho vypočítaného tvaru isotopové obálky, a proto nejsou nástroje pro automatické hledání peptidů obsažené v běžných softwarových aplikacích schopny rozpoznat obálky deformované a posunuté nepřirozeným nadbykem deuteria po H/D výměně. Pro vyhodnocení takových dat je tedy potřeba buď vyvinout zcela novou aplikaci, nebo stávající aplikaci nějakým způsobem rozšířit. Pro vyhodnocování dat z H/D výměny v této práci bylo vytvořeno makro pro aplikaci DataAnalysis (Bruker Daltonics) napsané v jazyce Visual Basic for Application (VBScript). Vyhodnocovací algoritmus je zjednodušeně tento:

- Vypočítat přesnou hmotu a počet maximálně teoreticky vyměnitelných amidických vodíků peptidových vazeb
- Vyhledat výskyt signálů odpovídajících daným hmotnostem a nábojovým stavům peptidů s vyměněnými vodíky. Aby se minimalizovaly signály s náhodně podobnou hodnotou m/z, bere se v úvahu rozdíl mezi $\Delta m(^1\text{H}-^2\text{H})=1.0062767 \text{ Da}$ a $\Delta m(^{12}\text{C}-^{13}\text{C})=1.0033548 \text{ Da}$

- Pokud je nalezen, vyhledt ostatní isotopické vrcholy tohoto peptidu a spočítat jeho průměrnou hmotnost (monoisotopická v tomto případě neexistuje) jako vážený průměr hmotností všech vrcholů vážený na základě jejich intenzity
- Opakovat pro každý vstupní peptid od začátku

Z výsledků tohoto makra (průměrné hmoty) se následně vypočítají procenta deuterace vztažené buď k plně deuterovanému peptidu (pokud je měřen), nebo k teoreticky vypočítané hodnotě pro plně deuterovaný peptid.

Vizualizace výsledků H/D výměny

Porovnávání dvou (nebo dokonce více) souborů dat jen ve formě tabulky je velmi nepohodlné a nenázorné, proto jsme vyvinuli softwarovou soupravu pro znázorňování výsledků H/D výměny doplněnou nástroji usnadňujícími plánování pokusů. Je to sada PHP skriptů pro webový server a je volně přístupná na adresách <http://ms.biomed.cas.cz/MSTools/>

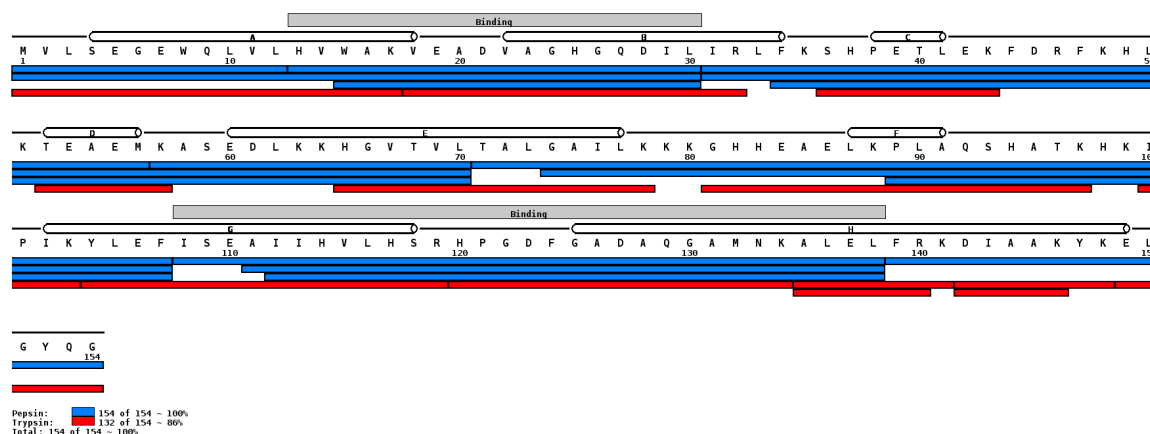


Fig. 3: Příklad mapy pokrytí. Je možné najednou zobrazit více proteas. Primární struktura je doplněna schematickým znázorněním struktury sekundární. Program také vypočítá pokrytí peptidy v procentech.

(server v Praze) a zrcadlená na <http://www.hxms.com/mstools/> (server v Seattlu).

První užitečné zobrazení dat je znázornění pokrytí sekvence nalezenými peptidy (obrázek 3) a přijde na řadu ještě před vlastní H/D výměnou. Na základě této mapy se provádí předvýběr zajímavých peptidů mnohem pohodlněji.

Výsledná data se pak dají zobrazit mnoha různými způsoby od velmi kompaktních „heatmap“ (obrázek 4), kde

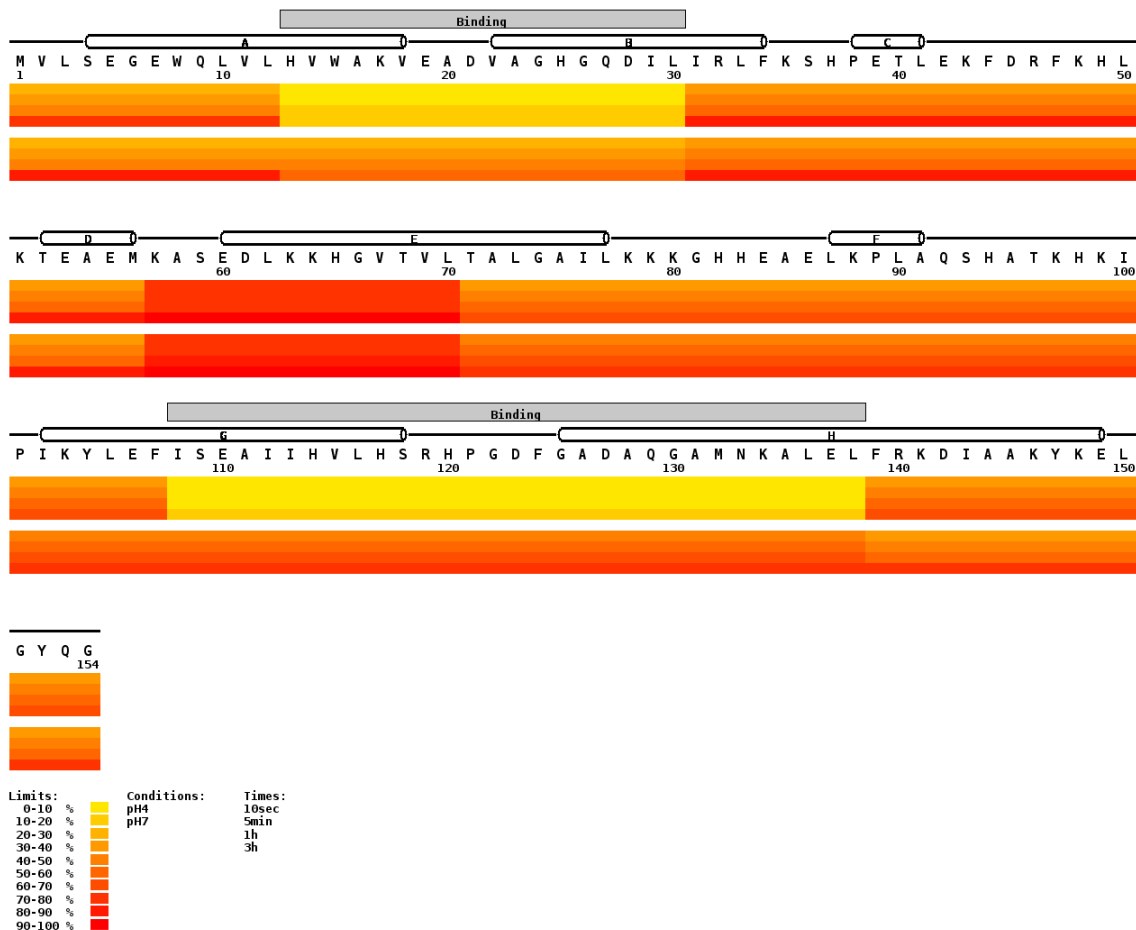


Fig. 4: An example of heatmap. Each strip cluster belongs to one condition/form, each strip in cluster represents one particular time. One of several colour schemes can be chosen.