

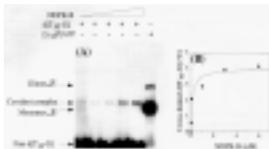
ETUDE DU COMPLEXE DE LA NDP KINASE B HUMAINE AVEC L'ADN SIMPLE BRIN, LOCALISATION DES SITES D'INTERACTION

J.VINH, J.ROSSIER
 Neurobiologie et Diversité Cellulaire, ESPCI, CNRS UMR 7637, F75231 Paris Cedex 05
 S.RAVEH, F.AGOU, M.VERON
 Institut Pasteur, Régulation Enzymatique des Activités Cellulaires CNRS URA 1773, F75724 Paris Cedex15

Résumé

L'isoforme B de la nucléoside diphosphate kinase B (NDPK-B) humaine a été précédemment identifiée comme facteur de transcription stimulant, *in vitro* et *in vivo*, la transcription de l'oncogène *c-myc*, ce qui montre l'implication de cette enzyme dans la carcinogénèse. Nous avons étudié les propriétés enzymatiques de la NDPK-B en présence de divers oligonucléotides simple brin pour montrer que les oligonucléotides sont des inhibiteurs compétitifs de l'activité catalytique. Ceci indique que le site actif agit comme site d'interaction pour l'ancrage de l'oligonucléotide. En outre la présence d'une guanine à l'extrémité C-terminale des différents aptamers étudiés augmente d'un facteur 10 son affinité vis à vis du site. Pour définir la surface de la protéine en contact avec l'ADN au sein du complexe nucléoprotéique, le complexe a été immobilisé par crosslinking par impulsions laser unitaires de l'ordre de la nanoseconde, et le produit a été protéolysé. Les peptides couplés à l'oligonucléotide ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'utilisation d'oligonucléotides simple brin 11-mer et 30-mer a conduit à l'identification des mêmes trois différents nucléopeptides après irradiation. Ceci indique un mode d'interaction commun pour des deux aptamers. L'ensemble de ces résultats permet de proposer un modèle pour la structure de la NDPK-B en interaction avec l'ADN simple brin.

Etude de la réaction de crosslinking par irradiation laser

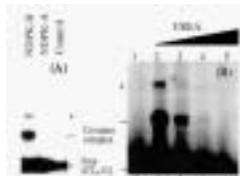


Réaction de cross-linking par irradiation UV de NDPK-B avec d[T₁₀-G]

(A) 17 nM of [³²P] d[T₁₀-G] ont été incubés avec des quantités variables de NDPK-B (0,05 μM; 0,1 μM; 1 μM; 3 μM; 6 μM). Les mélanges ont ensuite été irradiés sous laser UV. Sur la col. 6, NDPK-B a été incubé en présence de [³²P]ATP sans oligonucléotide, elle a subi immédiatement une autophosphorylation. La phosphoprotéine est légèrement retardée et migre à une masse apparente de 19,7 kDa (pour 17 kDa pour la protéine non phosphorylée)

(B) Les cadres correspondant au complexe nucléoprotéique du cadre A ont été quantifiés par densitométrie au Phosphor Imager. Les points ont été reliés par approximation des moindres carrés pour donner une constante de complexation apparente (K_a) de 0,18 μM.

Le réticulいた de l'ADN augmente avec la quantité de d[T₁₀-G] ajouté. La présence d'urée inhibe la réaction par dénaturation de la protéine. La complexation est spécifique de NDPK-B. NDPK-B s'autophosphoryle sous irradiation laser.

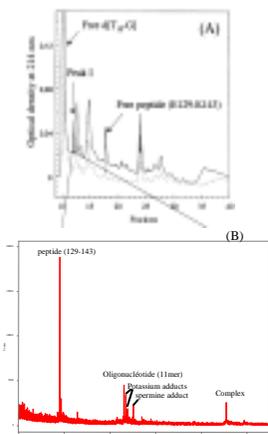


Spécificité de la réaction de cross-linking

(A) Cross-linking sous laser UV de NDPK-B et NDPK-A. 17 nM of [³²P]-d[T₁₀-G] ont été incubées à 20°C pendant 30 min seuls (contrôle), dans une solution de NDPK-B (6 μM) ou de NDPK-A (12 μM). Les mélanges ont ensuite été irradiés sous laser UV.

(B) Effet de l'urée sur la formation du complexe. Les échantillons de NDPK-B (6 μM) ont été dialysés sur la nuit à 20 °C avec des concentrations d'urée de 0 à 6M (colonnes 2 to 5). 17 nM de [³²P]-d[T₁₀-G] ont ensuite été incubés sans (colonne 1) ou avec différents échantillons de protéine dialysée pendant 30 min. Les mélanges ont ensuite été irradiés sous laser UV.

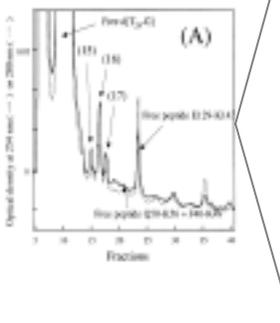
Recherche du site d'interaction



Purification par HPLC et identification des nucléopeptides.

(A) Deux échantillons du mélange NDPK-B (6 μM) et d[T₁₀-G] (30 nM) irradié (-) et non irradié (...) ont été analysés par HPLC après digestion endo-Lys-C. Le mélange irradié présente un pic additionnel spécifique (pic I, fraction12).

(B) La fraction 12 a été analysée par MALDI-TOF MS. Trois espèces majeures sont observées: le peptide E129-K143 à m/z 1495, l'oligonucléotide d[T₁₀-G] à m/z 3307 et le complexe obtenu par crosslinking à m/z 5553.

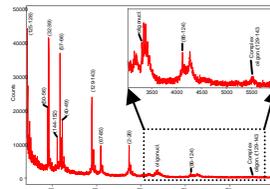


Analyse du complexe NDPK-B/d[T₂₉-G]

(A) Analyse du mélange de digestion du complexe obtenu avec l'oligonucléotide d[T₂₉-G] par HPLC par comparaison des absorbances à 254 nm (-) et 280 nm (...) (rapport d'absorbance 254/280 # 2). Trois pics correspondant à ce critère (fractions 15, 16 et 17).

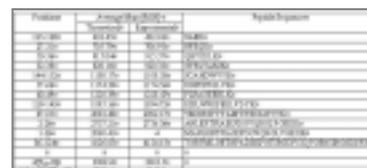
(B) Les trois fractions 15, 16 et 17 ont été analysées par MALDI-TOF MS et ont permis d'identifier respectivement les nucléopeptides E129-K143, Q50-K56 et F40-K49. Les peptides libres correspondant ont des temps de rétention distincts comme indiqué dans le cadre A

Analyse des produits de digestion du complexe d[T₁₀-G]/NDPK-B



Analyse directe du mélange de digestion.

Le complexe NDPK-B/d[T₁₀-G] a été digéré avec l'endoprotéinase Lys-C. Les produits de la digestion ont été analysés par MALDI-TOF MS en mode linéaire négatif. L'agrandissement montre la gamme de masse contenant le complexe nucléoprotéique E129-K143/d[T₁₀-G]. Ce complexe n'est détecté que lorsque la protéine a été incubée 30 min avec d[T₁₀-G] avant d'être irradiée sous UV laser.



Comparaison entre les masses théoriques et expérimentales des produits de digestion du complexe d[T₁₀-G]/NDPK-B par l'endoprotéinase Lys-C

Un effet de suppression important est observé. Seule une espèce nucléopeptidique a pu être détectée faiblement. Malgré les conditions opératoires, des adduits de potassium sont observés.

Matériels et Méthodes

Cross-link par UV laser

Les complexes obtenus avec les oligonucléotides marqués ont été formés par incubation pendant 30 min à 20°C, puis les échantillons ont été irradiés avec un laser pulvé NALIM (Spectra Physics, fluence 30 mJ/pulvé, 10¹² photons/pulvé, 266 nm, impulsion 5 ns)

Digestions enzymatiques

La protéine ou le complexe nucléoprotéique est incubé sur la nuit à 37°C avec l'endoprotéinase Lys-C (0,05 μg/ml) dans un tampon 100 mM (pH 8,5) contenant hydrochlorure de guanidine (0,2 M) et EDTA (1 mM). Les échantillons sont concentrés 10 fois sous vide et redissolus deux fois dans 0,1% Zwittergent 0,1% (v/v), puis dilués finalement dans 100nM de citrate d'ammonium.

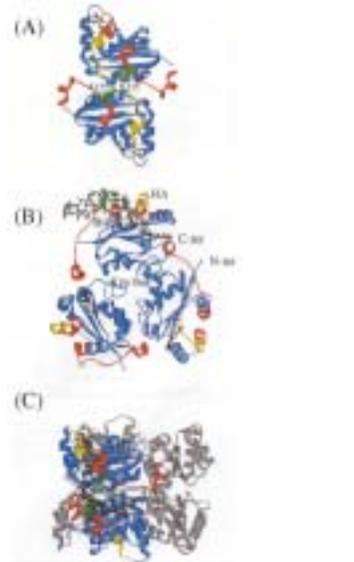
Séparations HPLC

Les protéolysats ont été purifiés par RP-HPLC (système Smart, colonne μRPC C2C18 SC 2,1 mmX150, American Pharmacia Biotech) équilibrées dans un tampon phosphate de potassium 5mM avec un gradient linéaire d'acétonitrile (0 à 70% en 50 min) à 200 μl/min. Les nucléopeptides ont été identifiés en réalisant une obtention simultanée à 214, 254 et 280 nm par comparaison des profils chromatographiques obtenus pour la NDPK-B, en présence ou non d'oligonucléotide, avec ou sans irradiation. Ces espèces présentent des caractéristiques spectrales typiques avec un rapport d'absorbance à 254 nm et 280 nm de environ 2.

MALDI-TOF

La désorption et l'ionisation simultanée des peptides et des oligonucléotides est délicate. Plusieurs matrices ont été testées. Les résultats les meilleurs pour cette gamme de masse ont été obtenus avec un mélange 8:2 (w/w) de 2-ABANANA saturé dans acétonitrile:DHAC 100 mM préparé extemporanément. La spermine a été ajoutée pour permettre une meilleure co-cristallisation et, en présence de sels d'ammonium permet d'éliminer la majorité des adduits avec une bonne résolution dans la gamme de masse étudiée. Les cubes en ions ont été rincés dans un bain de carbonate d'ammonium saturé. Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre MALDI-TOF Voyager STR (Applied Biosystems) par irradiation sous laser N₂ (337nm, impulsion 20 ns, fluence juste au dessus du seuil de désorption) en mode négatif linéaire avec une faible déviation d'extraction (100-150eV).

Modèle structural du complexe NDPK-B/ADN



(A) Empreintes structurales du complexe NDPK-B/d[T₁₀-G] ou NDPK-B/d[T₂₉-G]. Dans cette représentation du dimère, les peptides Q50-K56, E129-K143 et S144-E152 liés à d[T₁₀-G] sont en rouge, les peptides liés à d[T₂₉-G] sont en orange ou en jaune. Le résidu K135 (site de complexation) est en vert.

(B) Modèle structural du complexe NDPK-B/11-mer ADN simple brin

(C) Vue du trimère selon l'axe de symétrie d'ordre 3 (cadre B) et de l'hexamère selon l'axe d'ordre 2 (cadre C). Ce modèle a été construit en utilisant InsightII (Molecular Simulations) en utilisant les données de cette étude de crosslinking par irradiation laser.

Conclusion

Nous avons utilisé l'association du cross-linking par UV laser et du MALDI-TOF pour identifier les points de contact entre des aptamers simple brin et la NDPK-B. Le laser pulsé avec des impulsions de quelques nanosecondes est suffisamment rapide pour « geler » le complexe protéine-acide nucléique existant en minimisant le couplage artificiel protéine-protéine. Nous avons pu déterminer l'affinité de couplage (0,15 μM). NDPK-A ne réagit pas par crosslinking avec les aptamers, seul NDPK-B est complexé.

La différence observée entre la masse théorique et la masse expérimentale du seul nucléo-peptide E129-K143 observé peut provenir tout d'abord d'une mauvaise résolution de cette espèce de faible rapport S/B observée en mode linéaire négatif vraisemblablement accompagnée d'adduits de potassium. De plus la chimie de la complexation elle-même n'est pas connue. Enfin l'oligonucléotide lui-même est modifié lors de l'irradiation.

Les études de préparation de l'échantillon à partir de conditions relativement défavorables (tampon phosphate de potassium et présence de tensioactif zwitterionique) afin d'observer simultanément oligonucléotide et peptide nous ont permis de rendre compte de la présence de sels d'ammonium tout au cours de l'analyse étant indispensable et que le mélange 2-ABANANA 8:2 (w/w) avec la spermine comme additif était la matrice la plus adaptée pour de petits oligonucléotides (m/z < 8000) en mode linéaire négatif. Des études complémentaires ont montré que cela n'est pas vrai pour de plus longues chaînes nucléotidiques, la spermine pouvant elle-même former des adduits non résolus.

Les 3 mêmes peptides sont impliqués dans l'interaction NDPK-B/d[T₁₀-G], E129-K143, Q50-K56 et F40-K49. Trois acides aminés différents de NDPK-A et NDPK-B: S131, K135 et K143 (tous dans E129-K143). Seul K135 permet de rendre compte de la différence de réactivité de NDPK-A et NDPK-B. En effet la chaîne latérale de S131 pointe vers l'intérieur de la structure protéique et K143 est éloigné du site actif de la protéine. De plus K143 est strictement conservé dans tous les NDPK-B.

Contacts : joelle.vinh@espci.fr

References

Raveh S, Vinh J, Rossier J, Agou F, Véron M; *Biochemistry* 2001 40(20):5882-5893. Peptide Determinants and Structural Model of Human NDP Kinase B (Nm23-H2) Bound to Single Strand DNA