



# 不同生物的先天免疫受體，其預測結構特性的比較

慈濟大學

指導老師：賴孟君老師 組員：陳汝竟、黃證潔、蔣瑋庭

## 摘要

現今存在著各種疾病，免疫系統為研究的重點之一，其中人類Nod-like receptors (NLRs)其結構區塊 — Leucine-rich repeats(LRRs)，功能為感應訊息並啟動免疫反應，扮演免疫機制關鍵角色。希望透過比較不同物種更加深入了解其結構特性，進而促進醫學與生物研究的發展。

## 動機與目的

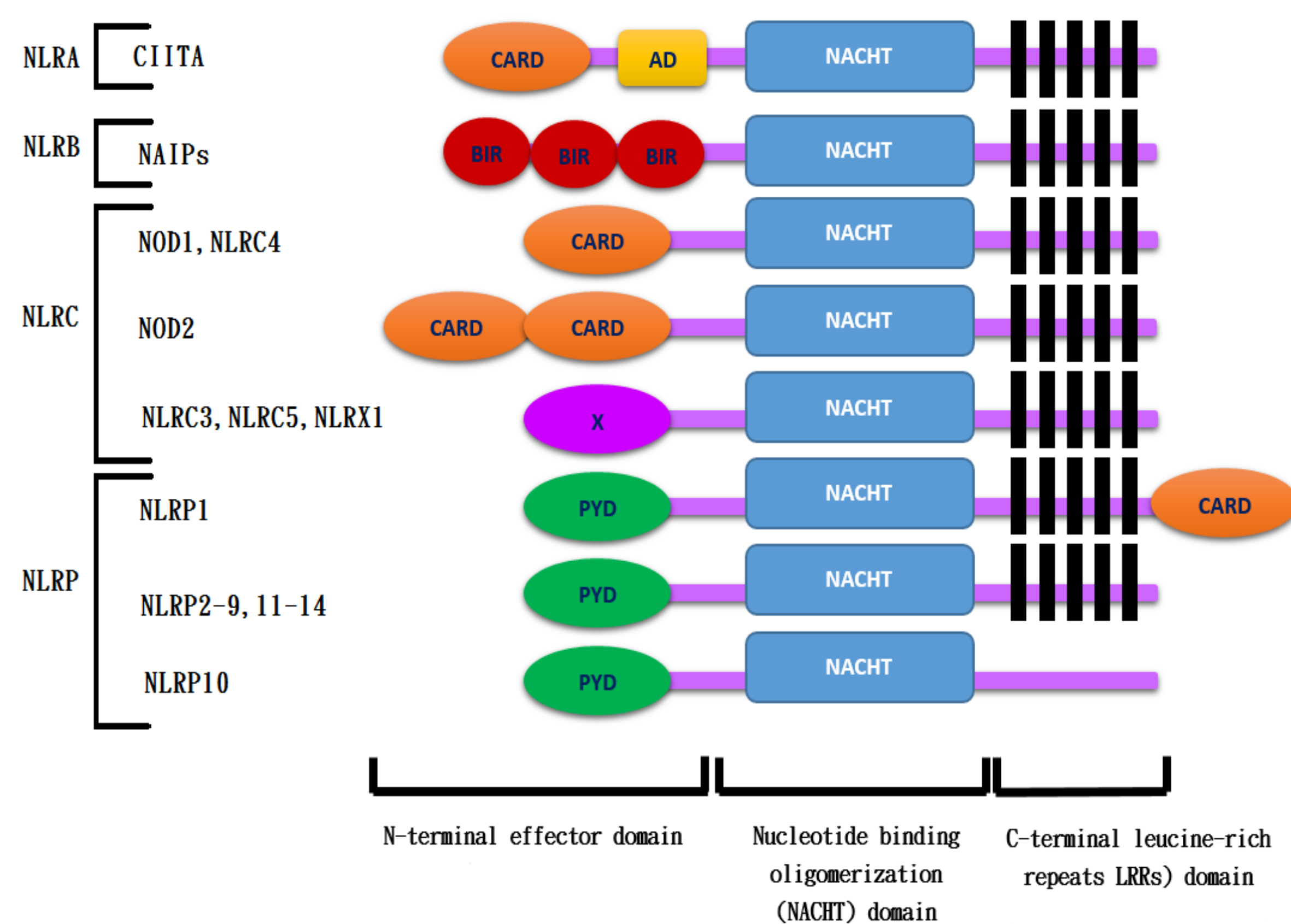
過去文獻針對人類NLR研究佔居多，為了了解人類NLR與不同物種間的差異，故挑選十種代表性的脊椎動物，建立人類NLR與物種的同源蛋白質模擬結構，進一步計算NLR-LRR區塊的疏水性及電荷，最後進行不同物種之間該區塊的比較。

成果以網頁(HTML、PHP、JavaScript、Jmol)呈現，讓使用者深入了解LRR的特徵與分析結果。

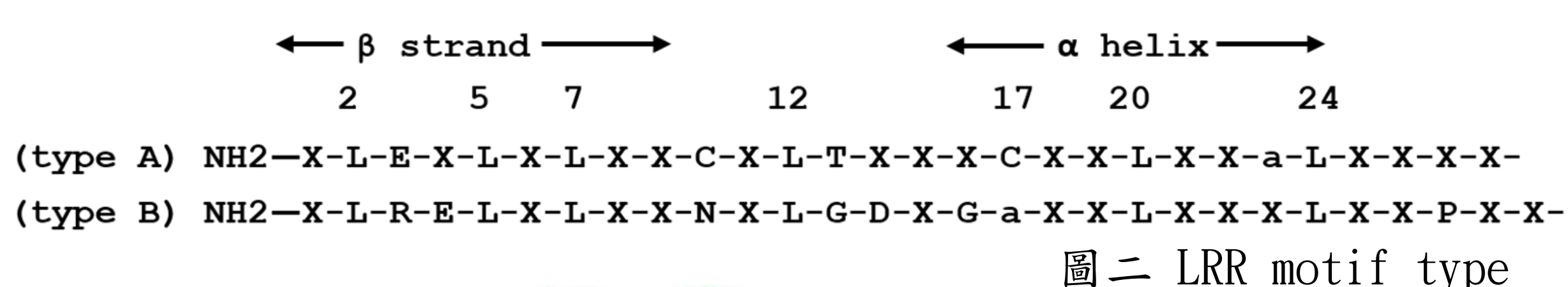
## 背景

本專題主要研究先天免疫系統中的NLR，其主要作用是識別病原體和危險信號，以及調節免疫反應，如：發炎反應、細胞凋亡。

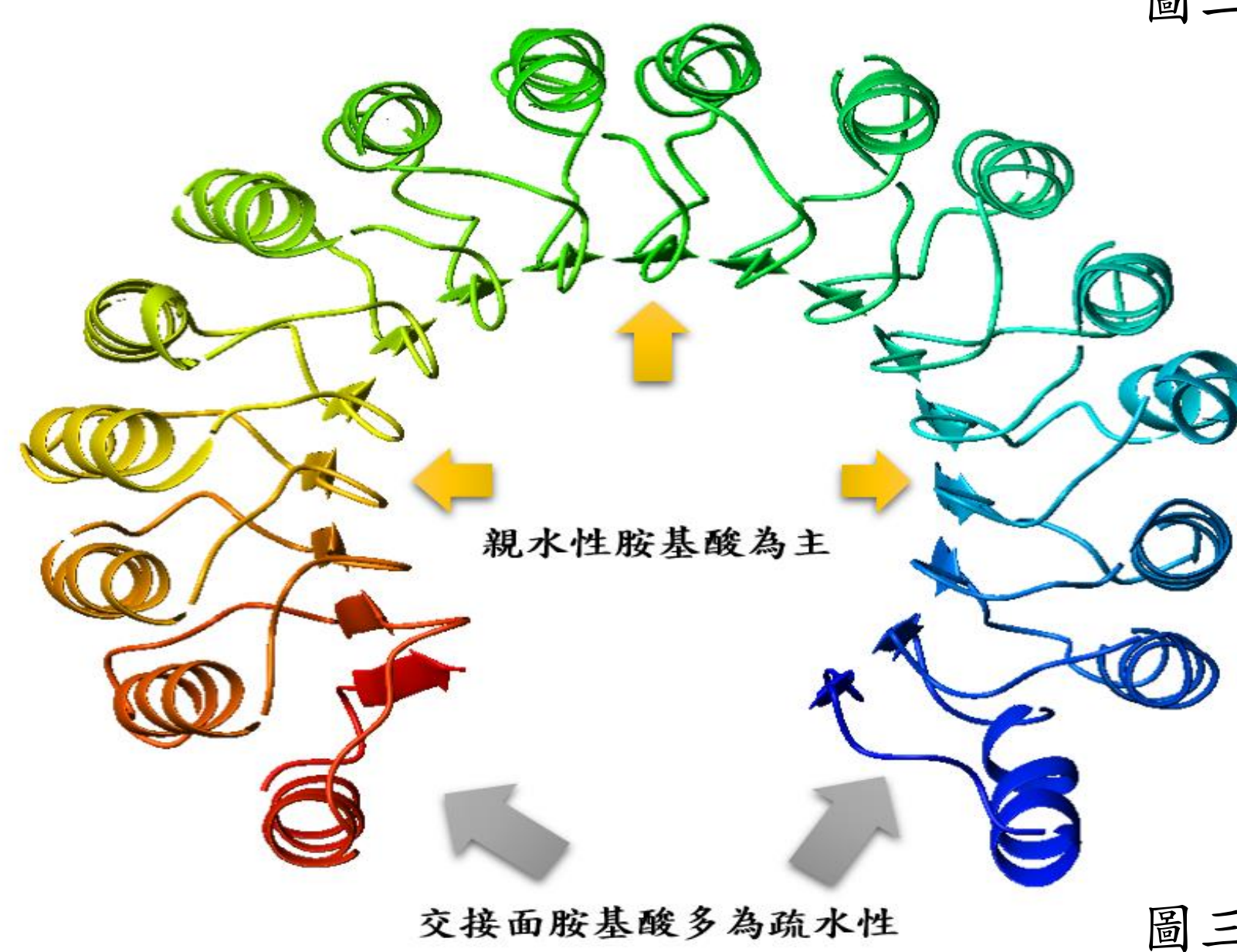
自然界發現具有LRR的蛋白質超過2000種。多數的LRR是由20-30個胺基酸單元，單元重複2到42次，折疊成開放的馬蹄形結構。以下介紹典型LRR— Ribonuclease Inhibitor(RI)，456個胺基酸組成的多肽鏈中，存在兩種LRR motifs的類型。



圖一 NLR結構區塊及分類

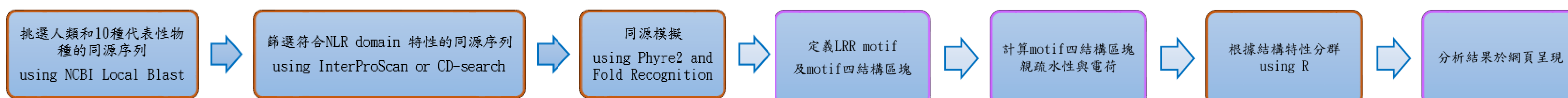


圖二 LRR motif type



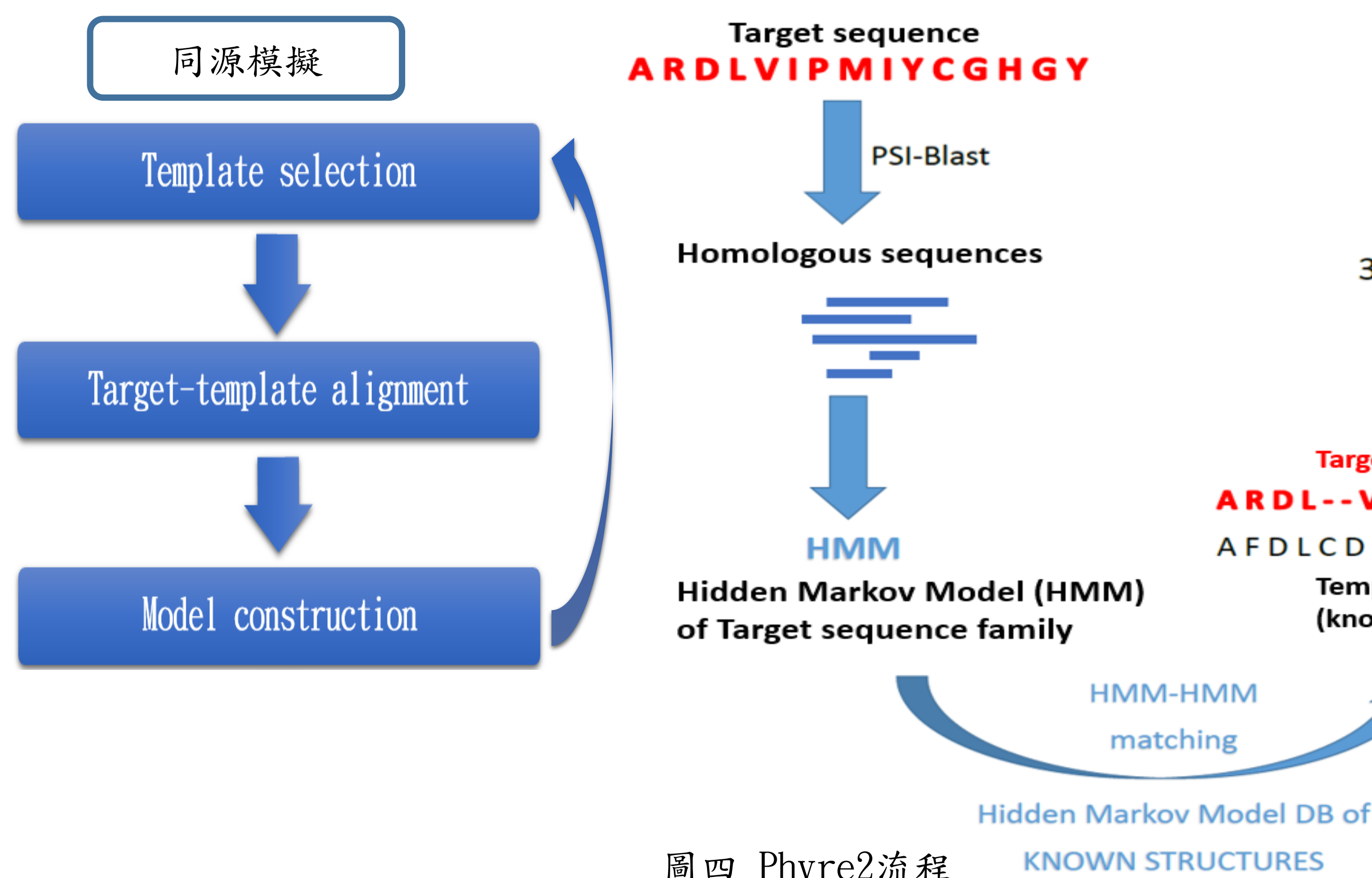
圖三 RI(PDB:2BNH)

## 專題流程



## 同源模擬

本專題使用Phyre2進行同源模擬。



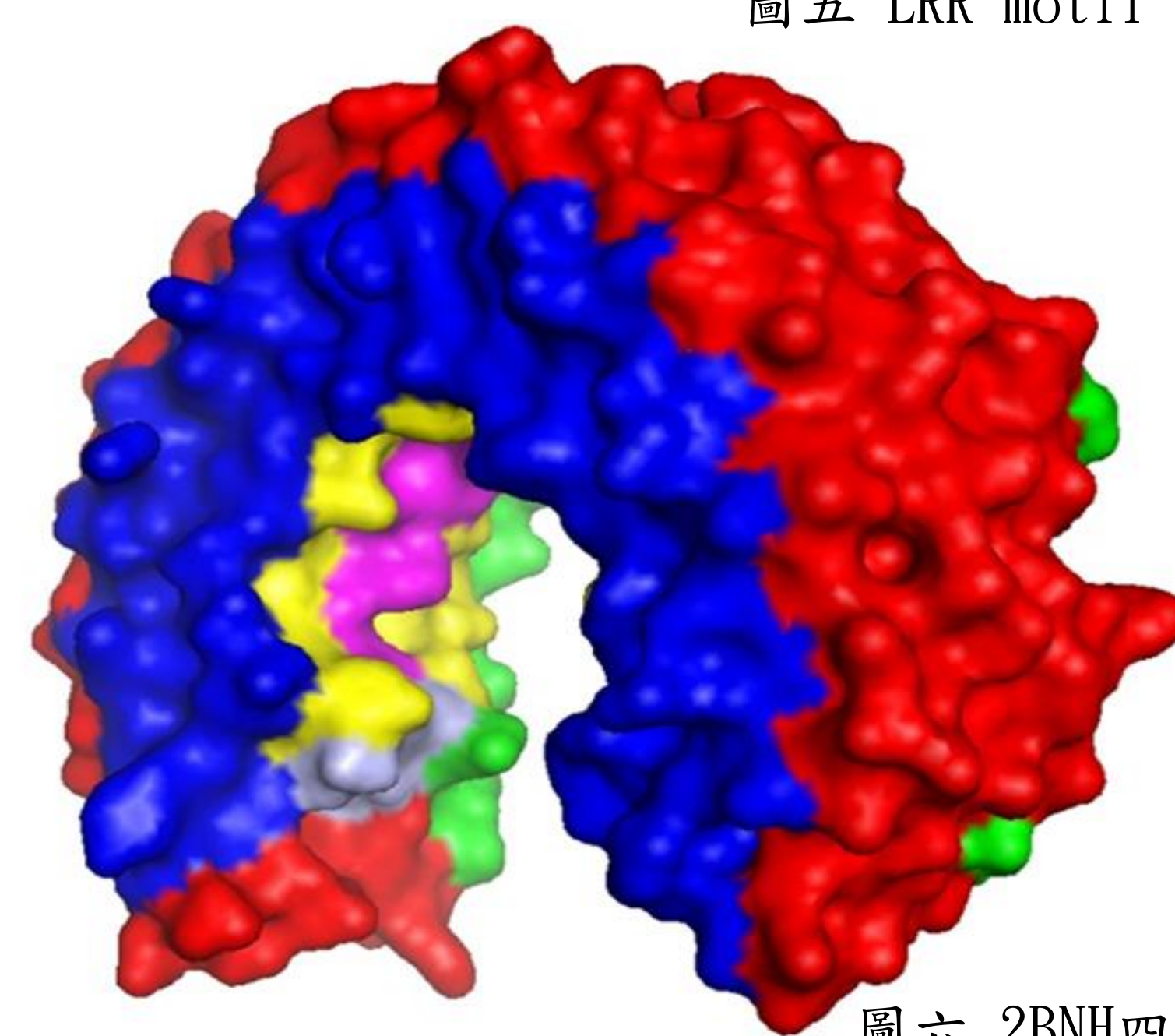
圖四 Phyre2流程

## LRR motif 四結構區的定義

根據參考文獻1定義的LRR motif，依蛋白質結構將motif分為四區塊。



圖五 LRR motif format



圖六 2BNH四結構區塊



# 不同生物的先天免疫受體， 其預測結構特性的比較



指導老師：賴孟君老師 組員：陳汝竟、黃證潔、蔣瑋庭

## 結構特性的計算

根據Hydropathy Score和pH=7環境下的Charge Score，計算LRR motif各區塊的平均疏水性和平均電荷。

已知蛋白質有n條 LRR motif，任一條設為i，其中各區塊的平均電荷 $q_i$ 與疏水性 $h_i$ ，每個區塊得到4個特徵值(共16個特徵值)為分群的特徵資料。

$$m_k = \frac{1}{n^{k+1}} \sum_{i=1}^n (i - i_0)^k f_i, \text{ where } f_i \text{ is either } q_i \text{ and } h_i$$

$$i_0 = \begin{cases} \frac{n}{2}, & n \text{ is odd} \\ \frac{n+1}{2}, & n \text{ is even} \end{cases}, \text{ and } k = 0, 1, 2, 3$$

Amino Acid	Hydropathy Score	Amino Acid	Hydropathy Score
I	4.5	S	-0.8
V	4.2	Y	-1.3
L	3.8	P	-1.6
F	2.8	H	-3.2
C	2.5	E	-3.5
M	1.9	Q	-3.5
A	1.8	D	-3.5
G	-0.4	N	-3.5
T	-0.7	K	-3.9
W	-0.9	R	-4.5

表一 Hydropathy Score

Amino Acid	Charge Score
D	3.9
E	4.2
K	10.5
R	12.5
H	6

表二 Charge Score

## 分群

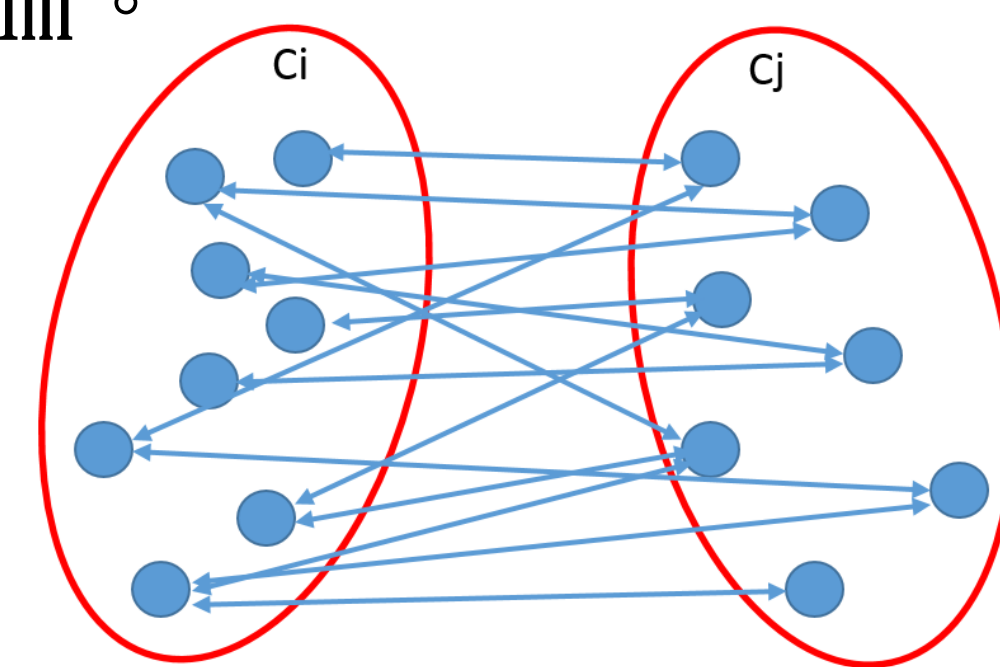
採用階層分群法(Hierarchical Clustering)由樹狀結構的底部開始層層建構。

1. 將每筆資料視為一個群  $C_i$  ( $i=1 \sim n$ )
2. 找出所有群之間距離最接近的兩個群  $C_i$ 、 $C_j$
3. 合併  $C_i$ 、 $C_j$  成為一個新的群
4. 重複步驟2和3，直到全部合併為一群

- 兩點之間的距離:使用Euclidean Distance  $n$  dimensions:

$$d(i, j) = \sqrt{(|x_{i1} - x_{j1}|^2 + |x_{i2} - x_{j2}|^2 + \dots + |x_{in} - x_{jn}|^2)}$$

- 兩群之間的距離:兩群中任意兩點間的平均距離，採用 Average - Linkage Agglomerative Algorithm。



圖七 兩群之間距離

$$D(C_i, C_j) = \frac{1}{|C_i|} \frac{1}{|C_j|} \sum_{x_m \in C_i} \sum_{x_q \in C_j} D(x_m, x_q)$$

## 研究成果與未來展望

- 疏水分佈的分析  
如左上圖，與人類NLR最相近的物種為 Chimpanzee、Domestic horse、Little brown bat、Dog、Mouse。

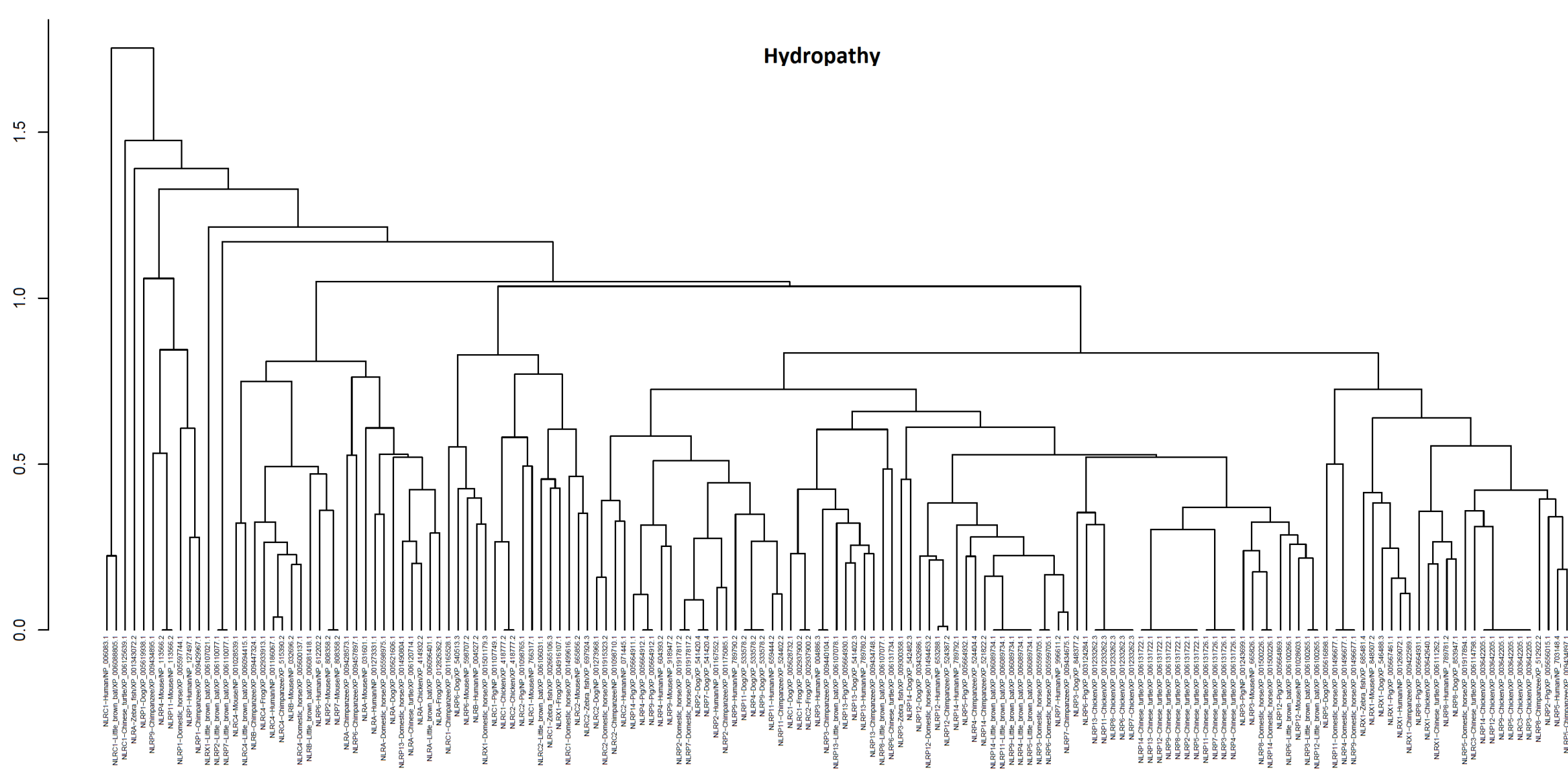
- 電荷分佈的分析  
如左下圖，人類NLR最相近的物種除了Pig、Chimpanzee、Little brown bat、Dog 之外，少部分與Chicken 與 Chinese turtle 較接近。

以上兩種分析整合發現與人類NLR相似的物種大多為特定幾種哺乳類動物，特別不同的是電荷分佈的結果中人類NLR與鳥類或爬蟲類較為相似，可能原因有兩個：

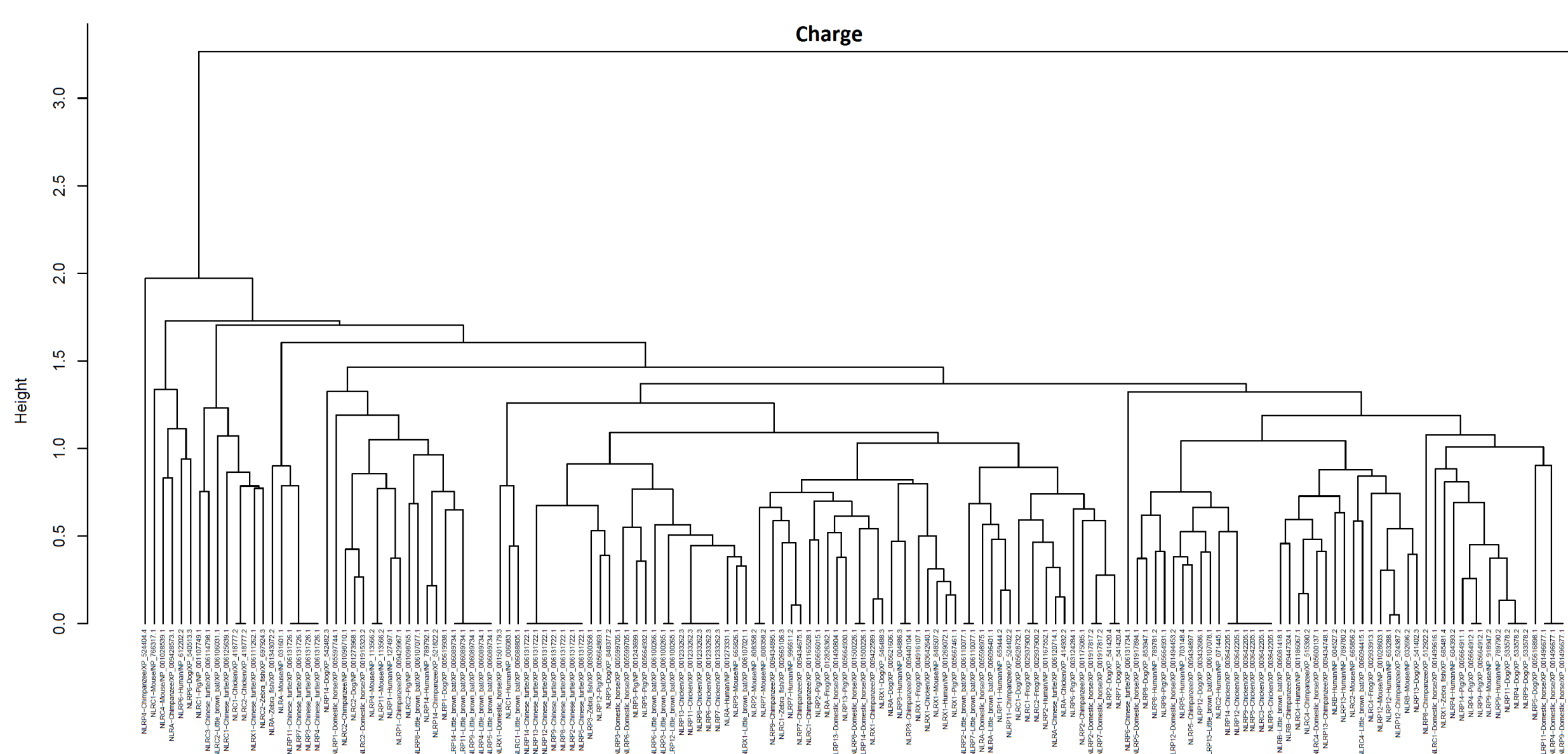
- 一. 專案過程中結構模擬挑選模板的疏忽，造成人類與鳥類或爬蟲類的相似。
- 二. 先天免疫廣泛存在於動物中，可能因不同生物面對的環境挑戰不同，加上後續啟動的免疫反應也有物種的差別，因而NLR辨識Ligand的LRR也漸產生物種間的差異。

以上是針對結果進行推測，亦是欲更深入研究之因。

2014年的Oviedo-Boysso J, N. 等人(參考文獻6)探討了人類NLR與Agonist的相互作用，可以對應分析結論，將人類及相近物種的同源模擬結構進行Dock探討 Receptor與Ligand的相互作用，進一步研究NLR-LRR的作用機制，亦或是探討NLR蛋白質與發炎疾病的關聯性。



圖八 疏水分群結果



圖九 電荷分群結果

## 參考文獻

1. Andrei Y Istomin and Adam Godzik, Understanding diversity of human innate immunity receptors: analysis of surface features of leucine-rich repeat domains in NLRs and TLRs, BMC Immunol, 2009 Sep 3
2. Carl Ivar Branden, John Tooze, Introduction to Protein Structure, Taylor & Francis, 1999/01/01, P.55~P.56
3. Söding J. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison. Bioinformatics 21, 951-960. doi:10.1093/bioinformatics/bti125.
4. Protein Folding Requires Crowd Control in a Simulated Cell. Jefferys BR, Kelley LA and Sternberg MJE Journal of Molecular Biology (2010) Volume 397, Issue 5, 16 April 2010, Pages 1329-1338.
5. Kyte J, Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 1982, 157:105-132.
6. Oviedo-Boysso J, N. et al. Collaborative Action of Toll-Like and Nod-Like Receptors as Modulators of the Inflammatory Response to Pathogenic Bacteria. Mediators Inflamm, doi:10.1155/2014/432785