

HUNPROTEXC

TELJESHOSSZÚSÁGÚ HUMÁN KOMPLEMENT PROTEÁZOK SZERKEZET-FUNKCIÓ VIZSGÁLATA



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROGRAM

AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE



Teljeshosszúságú humán komplement proteázok szerkezet-funkció vizsgálata



Probléma

A mozaikszerkezetű MASP-2 proteáz létfontosságú immunfolyamatok kulcsszereplője, és egyben fontos terápiás célpont is. Ugyanakkor a teljes molekula térszerkezete még feltáratlan.

Gál Péter

TTK Enzimológiai Intézet
Hozzájárulás: teljes hosszúságú MASP-2 előállítása

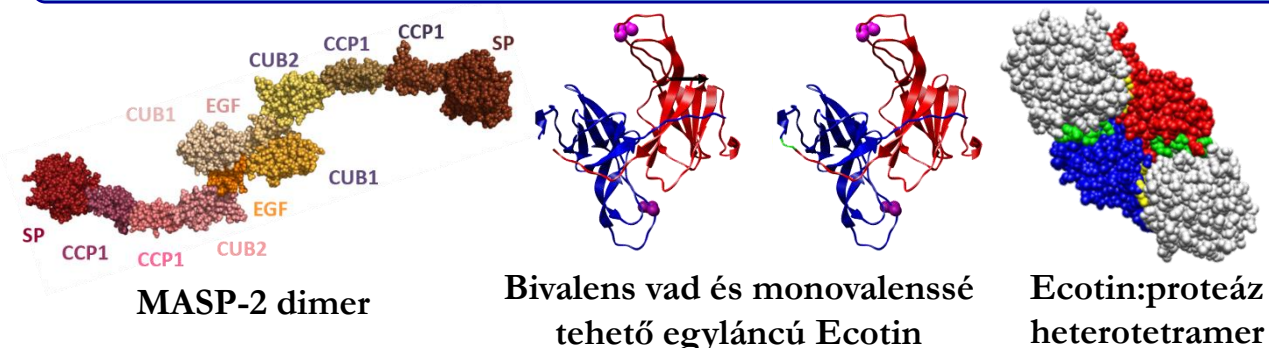
Pál Gábor

ELTE TTK
Biokémiai Tanszék
Hozzájárulás: MASP-2 gátló mono- és bivalens ecotin előállítása

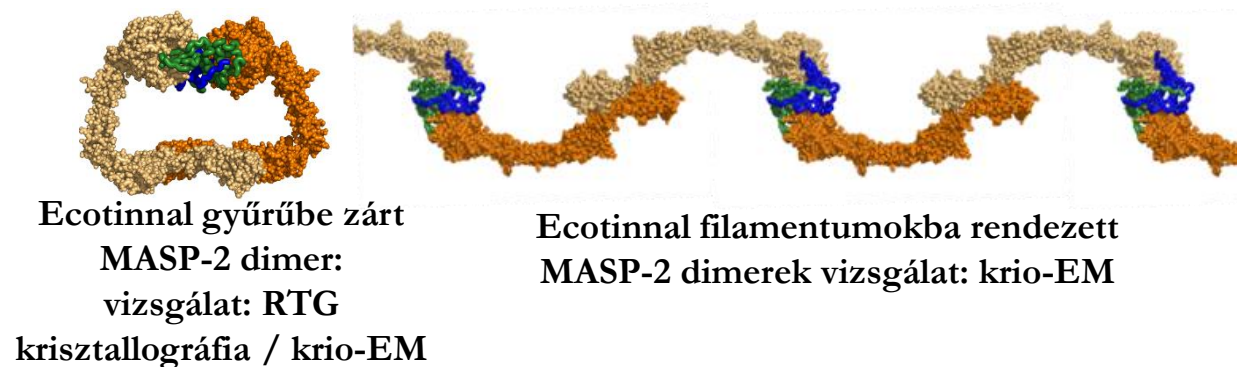
CÉLOK

Teljeshosszúságú, bivalens ecotinnal összerendezett, dimer MASP-2 proteáz atomi felbontású térszerkezet-meghatározása krio-EM vagy RTG krisztallográfia segítségével. A MASP-2 aktiváció mechanizmusának kiderítése monovalens és bivalens Ecotinokkal

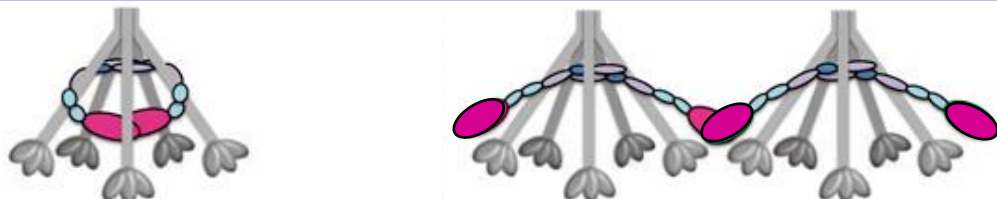
Molekuláris „eszközök”



Kísérletes megközelítés: szerkezet



Kísérletes megközelítés: funkció



A monovalens és bivalens ecotin formák általi gátlással meghatározható, hogy a MASP-2 aktivációja felismerőmolekula komplexen belül, vagy komplexek között zajlik

**Az Ecotin virulencia faktor számos patogén mikrobában.
Kimutattuk, hogy az Ecotin védi a baktériumot az emberi szérum számos
antimikrobiális aktivitásával szemben**



Nagy Zoltán Attila



Szakács Dávid



Héja Dávid



Sándor Noémi



Józsi Mihály



Oroszlán Gábor



Dobó József



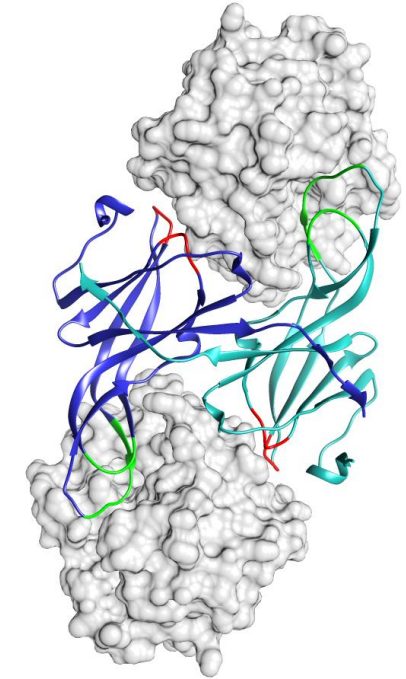
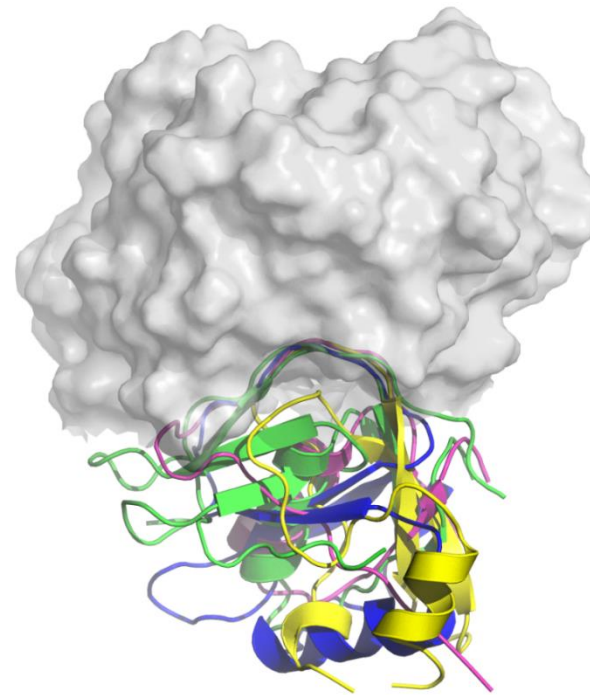
Gál Péter



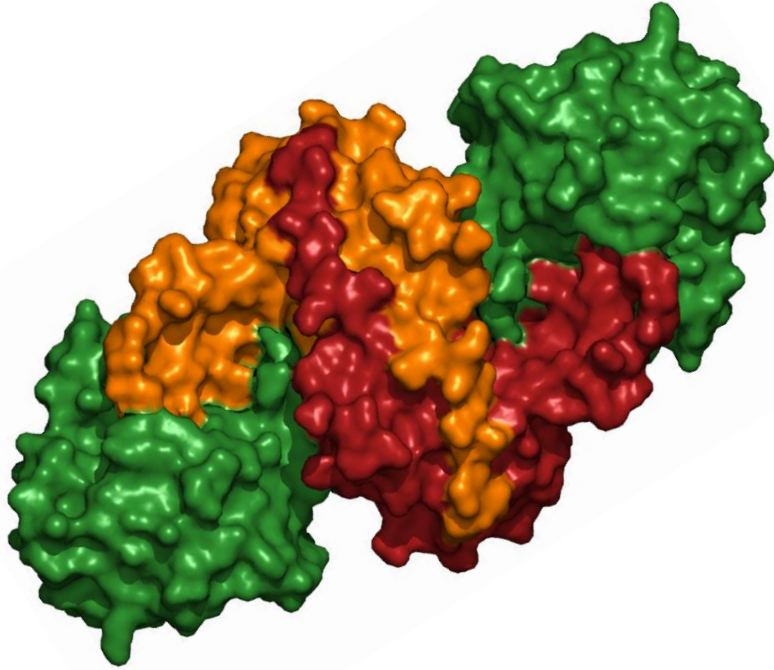
Az Ecotin a 18, függetlenül kialakult reverzibilis szerin-proteáz inhibitor családok egyike. Ugyanakkor szerkezete és kötődési módja egyedülálló

18 független család
azonos kanonikus kötőhurok
azonos Laskowski-mechanizmus
a specifitást az S1 zsebbe belépő
P1 oldallánc dominálja
*Egyikük sem gátolja a
komplementrendszer*

**Az Ecotin homodimer
egyszerre 2 szerin proteázzal
képez komplexet**



Az Ecotin széles specifitású: egy „Jolly Joker” P1 Met oldallánccal rendelkezik, és harapófogóba zár két proteázt. Mindkét proteázt egy kanonikus, és egy nem-kanonikus kötőhely fogja közre.



Gátolt proteázok:

tripszin, kimotripszin, elasztáz, humán leukocita elasztáz, fXa, fXIIa, plazma kallikrein

Eddig feltételezett biológiai szerepek:

Tripszin, kimotripszin, elasztáz elleni védelem az emésztőrendszerben
Védelem humán leukocita elasztáz ellen

Harvard Medical School
 THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
 Vol. 268, No. 18, Issue of September 20, pp. 13072-13076, 1993
 Purification from *Escherichia coli* of a Periplasmic Protein That Is a Potent Inhibitor of Pancreatic Proteases*
 (Received for publication, November 24, 1992)
 Chin Ha Chung¹, Harlan E. Ives, Sheri Almeda, and Alfred L. Goldberg
 From the Department of Physiology and Biophysics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115

ELTE
 ELSEVIER
 FEBS LETTERS
 FEBS Letters 342 (1994) 57-60
 FEBS 13811
 Alteration of the specificity of ecotin, an *E. coli* serine proteinase inhibitor, by site directed mutagenesis
 Gábor Pál^a, Gunther Sprengel^b, András Patthy^c, László Gráf^{a,*}

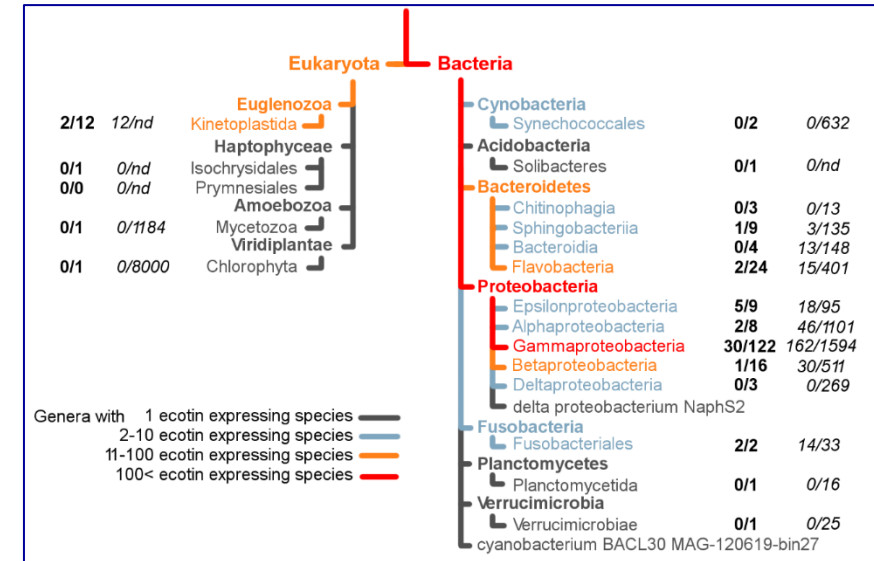
UCSF
 THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
 © 1991 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
 Vol. 266, No. 10, Issue of April 5, pp. 6020-6025, 1991
 Printed in U.S.A.
 The Sequence and Reactive Site of Ecotin
 A GENERAL INHIBITOR OF PANCREATIC SERINE PROTEASES FROM *ESCHERICHIA COLI**
 (Received for publication, September 12, 1990)
 Mary E. McGrath¹, Wade M. Hines², Judy A. Sakanari³, Robert J. Fletterick¹, and Charles S. Craik³
 From the ¹Departments of Biochemistry and Biophysics, ²Pathology, and ³Pharmaceutical Chemistry, University of California, San Francisco, California 94143-0446

Biochem. J. (2004) 378, 107-118 (Printed in Great Britain) 107
UCSF
 The periplasmic serine protease inhibitor ecotin protects bacteria against neutrophil elastase
 Christopher T. EGGERS¹, Iain A. MURRAY^{1†}, Valerie A. DELMART¹, Anthony G. DAY² and Charles S. CRAIK^{1*†2}
¹Department of Biochemistry and Biophysics, University of California at San Francisco, San Francisco, CA 94143-92280, U.S.A., ²Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California at San Francisco, San Francisco, CA 94143-92280, U.S.A., and ³Genencor International Inc., 925 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304, U.S.A.

Biochemistry 1994, 33, 3949-3958 **Genentech** 3949
 Ecotin Is a Potent Anticoagulant and Reversible Tight-Binding Inhibitor of Factor Xa
 Jana L. Seymour,¹ Robert N. Lindquist,^{1,3} Mark S. Dennis,¹ Barbara Moffat,¹ Daniel Yansura,¹ Dorothea Reilly,⁴ Mary E. Wessinger,² and Robert A. Lazarus^{1,4}
 Departments of Protein Engineering, Protein Chemistry, Cell Genetics, Fermentation Research and Development, and Cardiovascular Research and Development, Genentech, Inc., 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, California 94080
 Received September 24, 1993; Revised Manuscript Received January 13, 1994*

FEBS 15538 **Genentech** FEBS Letters 365 (1995) 159-163
 Ecotin is a potent inhibitor of the contact system proteases factor XIIa and plasma kallikrein
 Jana S. Ulmer, Robert N. Lindquist^{**}, Mark S. Dennis, Robert A. Lazarus^{*}
 Department of Protein Engineering, Genentech Inc., 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, CA 94080, USA
 Received 21 March 1995; revised version received 19 April 1995

Baktériumok százai és néhány eukarióta is termel Ecotint. Az Ecotin-expresszió patogéneknél gyakoribb



AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROGRAM

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE

Mi fejlesztettük ki elsőként irányított evolúcióval a MASP-1, MASP-2 és MASP-3 kanonikus inhibitorait

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, NO. 34, pp. 23299–23302, June 8, 2012
© 2012 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Published in the U.S.A.

Monospecific Inhibitors Show That Both Mannan-binding Lectin-associated Serine Protease-1 (MASP-1) and -2 Are Essential for Lectin Pathway Activation and Reveal Structural Plasticity of MASP-2*

Received for publication, February 17, 2012, and in revised form, March 30, 2012. Published, JBC Papers in Press, April 16, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.354332

Dávid Héja^{1,2}, Veronika Harmat^{3,4,5}, Krisztián Fodor⁶, Matthias Wilmanns⁶, József Dobó^{1,2}, Katalin A. Kékesi^{1,3,4,6}, Péter Závodszy¹, Péter Gál^{1,2}, and Gábor Pál^{1,2}

Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2

Dávid Héja^a, Andrea Kocsis^b, József Dobó^b, Katalin Szilágyi^b, Róbert Szász^c, Péter Závodszy^b, Gábor Pál^{a,1,2}, and Péter Gál^{b,1,2}

^aDepartment of Biochemistry, Eötvös Loránd University, H-1117, Budapest, Hungary; ^bInstitute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, H-1113, Budapest, Hungary; and ^cSecond Department of Internal Medicine, Health Science Center, University of Debrecen, H-4032, Debrecen, Hungary

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked

Received: 03 May 2016

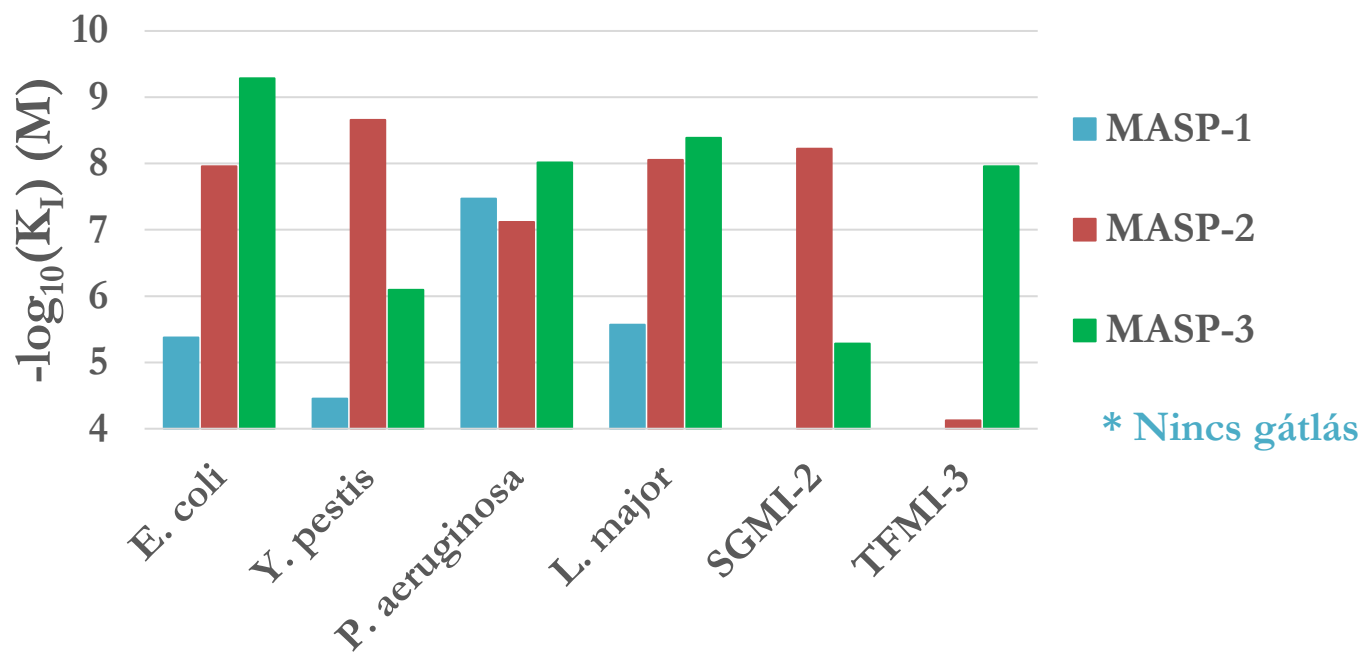
Accepted: 29 July 2016

Published: 18 August 2016

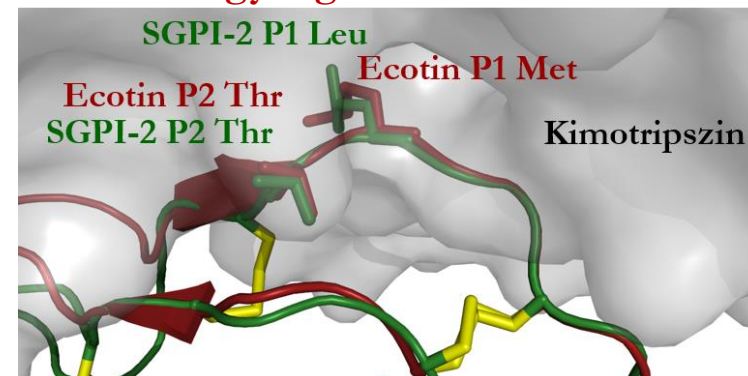
József Dobó¹, Dávid Szakács¹, Gábor Oroszlán¹, Előd Kortvely³, Bence Kiss², Eszter Boros², Róbert Szász², Péter Závodszy¹, Péter Gál¹ & Gábor Pál²

E. coli, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Leishmania major* eredetű *Ecotin*

MASP-gátló képessége

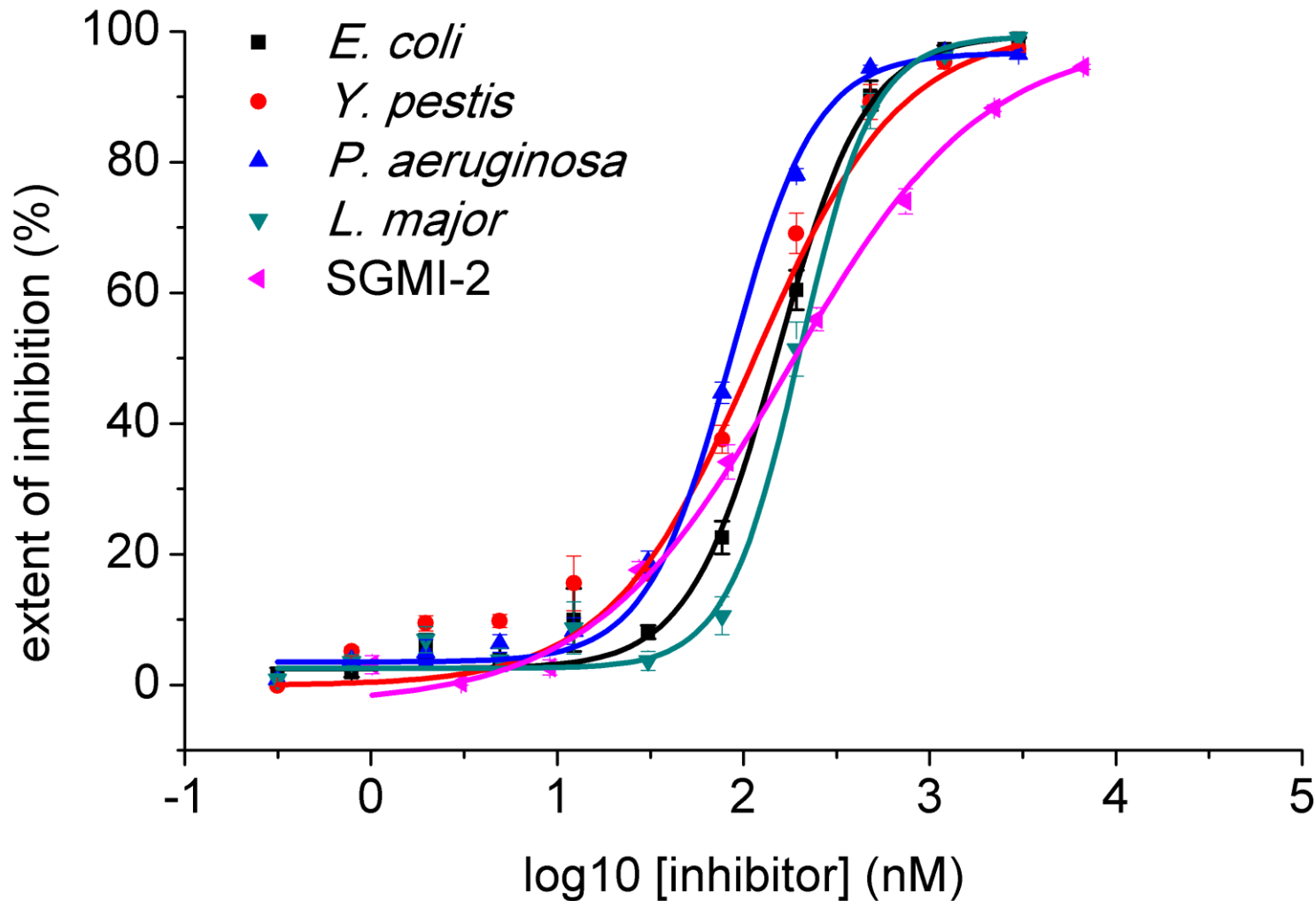


Az ecotin hurok-stabilizáló mechanizmusa hasonlított az egyik gátlószerünkére



Lehet, hogy az Ecotin MASP-inhibitor?

Az összes Ecotin ortológ hatékony lektin-út gátló



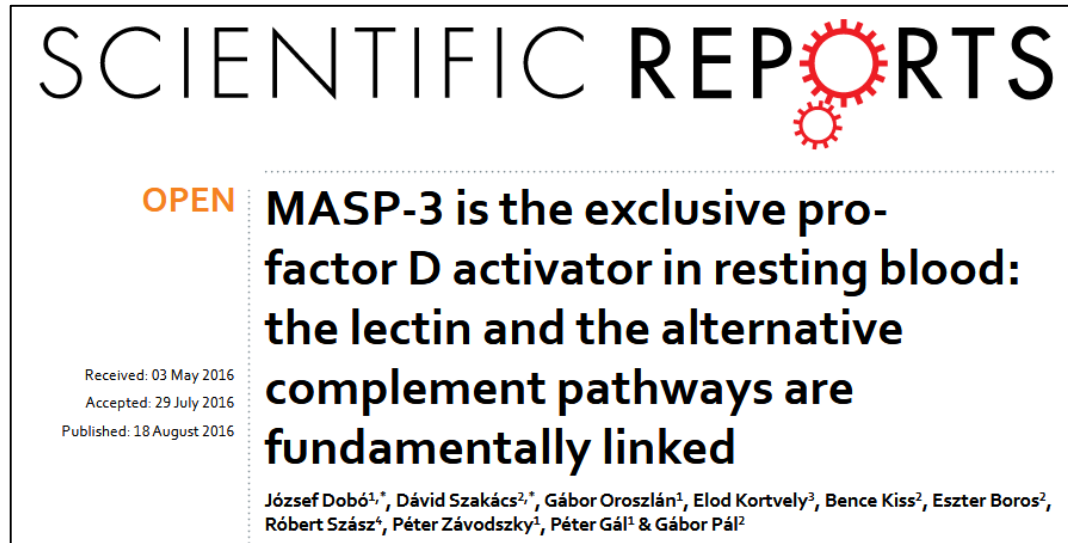
**Mannán-indukált C3
depozíció 2%
szérumból**

<i>E. coli</i> ecotin	IC ₅₀ = 153 nM
<i>Y. pestis</i> ecotin	IC ₅₀ = 114 nM
<i>P. aeruginosa</i> ecotin	IC ₅₀ = 86 nM
<i>L. major</i> ecotin	IC ₅₀ = 192 nM
SGMI-2	IC ₅₀ = 205 nM

**Az Ecotin ortológok legalább olyan jó
lektin út inhibitorok, mint az irányított
evolúcióval kifejlesztett MASP-2
inhibitor, SGMI-2**

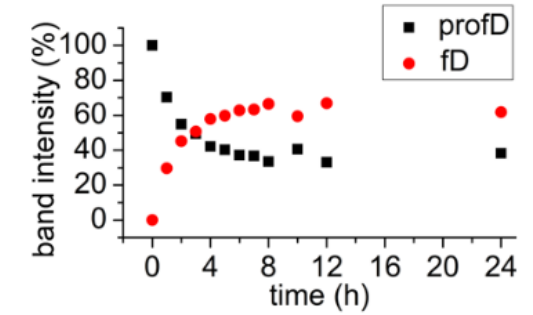
A MASP-3 gátlása által az *E. coli* Ecotin gátolja a szérumban a pro-FD aktivációt

- Ahogy korábban igazoltuk, a MASP-3 az egyedüli pro-FD aktivátor nyugvó vérben

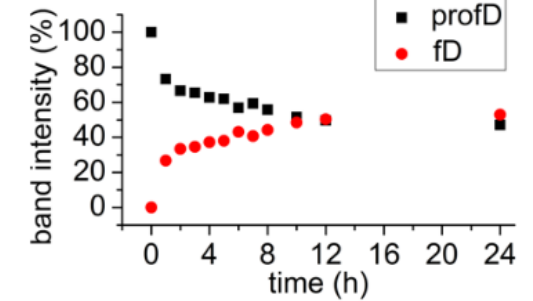


- TFMI-3: szelektív *in vitro* evolált MASP-3 inhibitor
- a TFMI-3 és az *E. coli* Ecotin is gátolja a MASP-3 általi pro-FD aktivációt

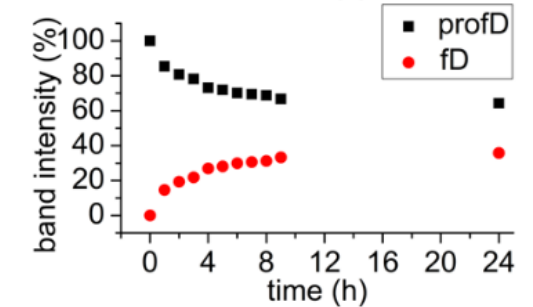
kontrol
 $t_{1/2} \approx 3$ h



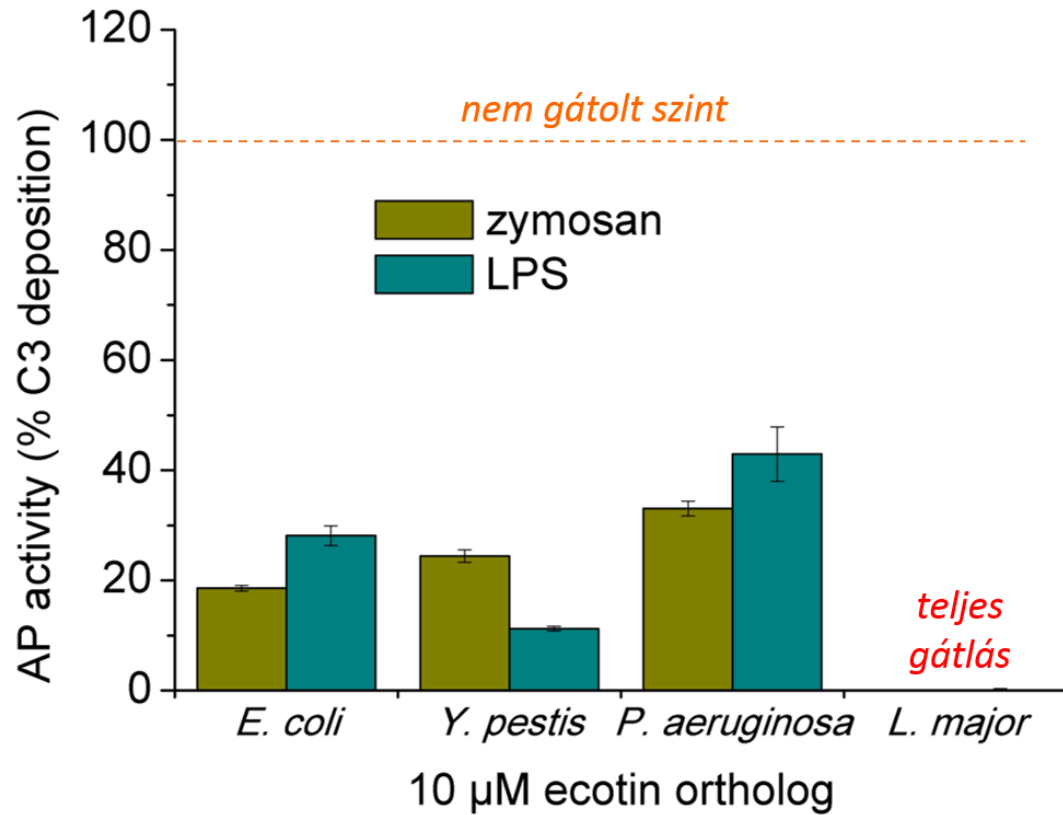
1 μ M *E. coli* Ecotin
 $t_{1/2} \approx 10$ h



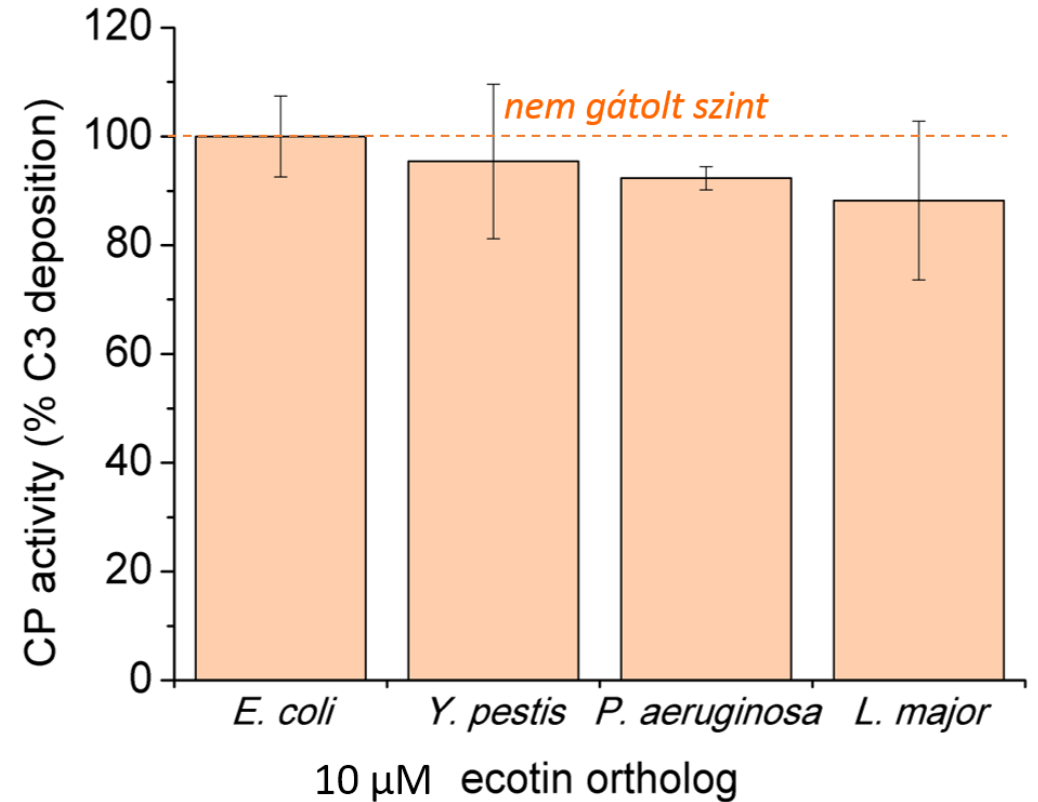
1 μ M TFMI-3
 $t_{1/2} \approx 40$ h



- 10 μ M koncentráción az Ecotin ortológok blokkolják az **alternatív utat**



- 10 μ M koncentráción az Ecotin ortológok nem gátolják a **klasszikus utat**

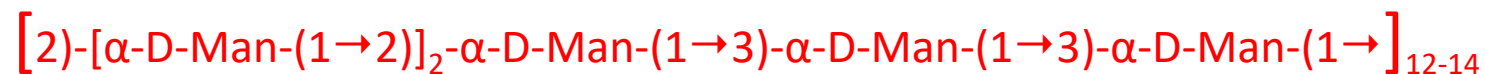


E. coli ATCC 23505

Az O antigénje polimannán, O9 szerocsoport, innentől O9 sejt

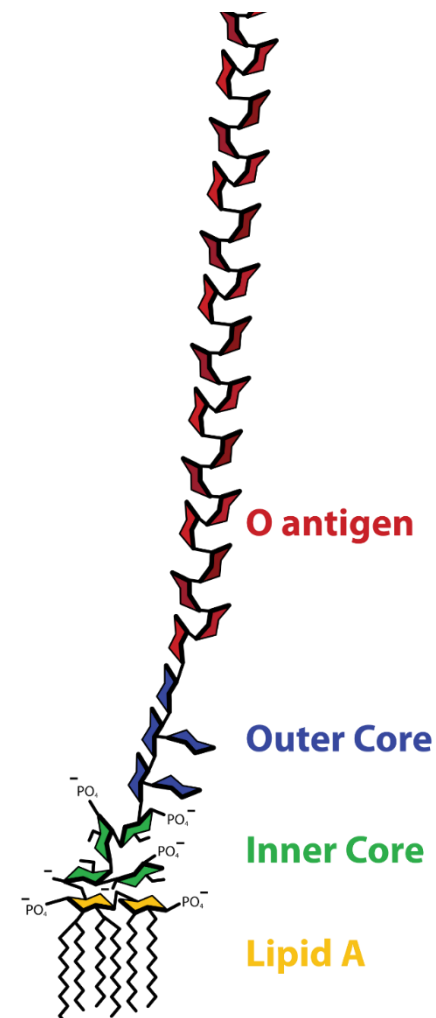
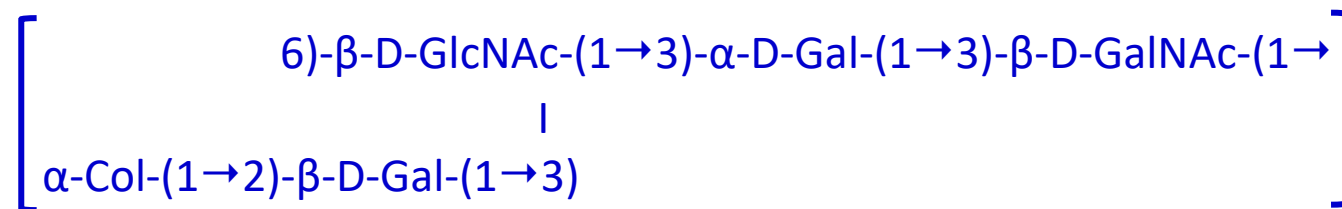
Ennek a törzsnek aktiválnia kéne a lektin és alternatív utat.

(Zhao, L. *et al.* LPS-induced platelet response and rapid shock in mice: contribution of O-antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system. *Blood* 100, 3233-3239 (2002).)



E. coli ATCC 12014

Az O antigén 4-féle cukrot tartalmaz, O55 szerocsoport, innentől O55 sejt
enteropatogén törzs, aminek az izolált LPS-ét gyakran használják immunológiai kísérletekben

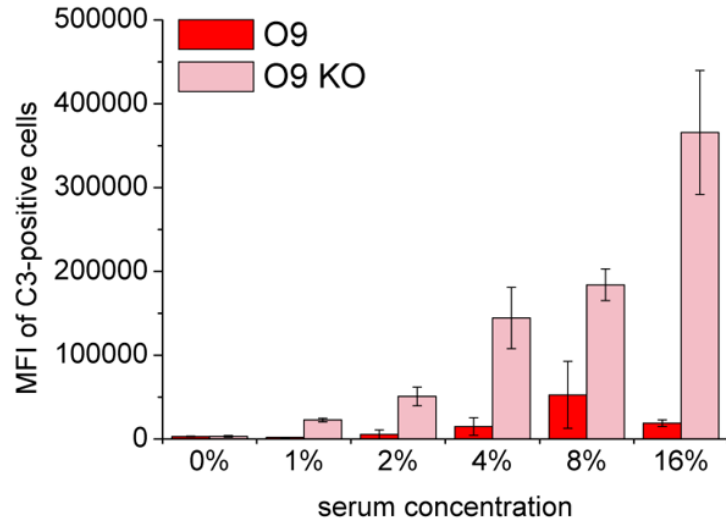


Mindkét törzsből Ecotin *KO* verziót készítettünk

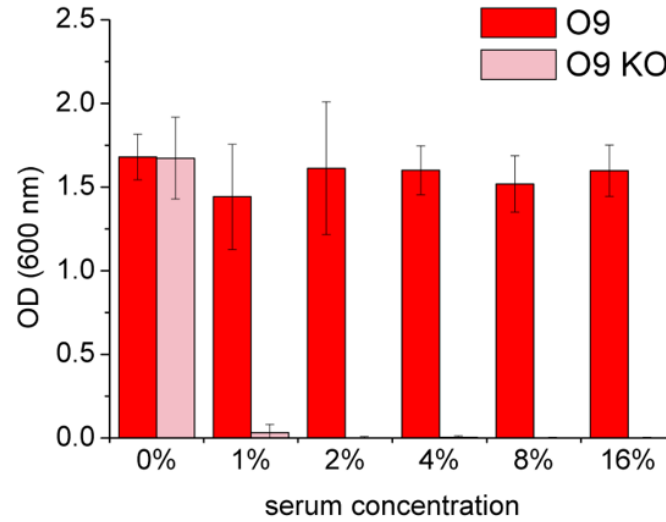
O9 / O9KO
O55 / O55KO

Az Ecotin gén kiütésének törzsspecifikus hatásait szérumkezelt baktériumokon követtük, C3-lerakódást és baktérium életképességet mértünk.

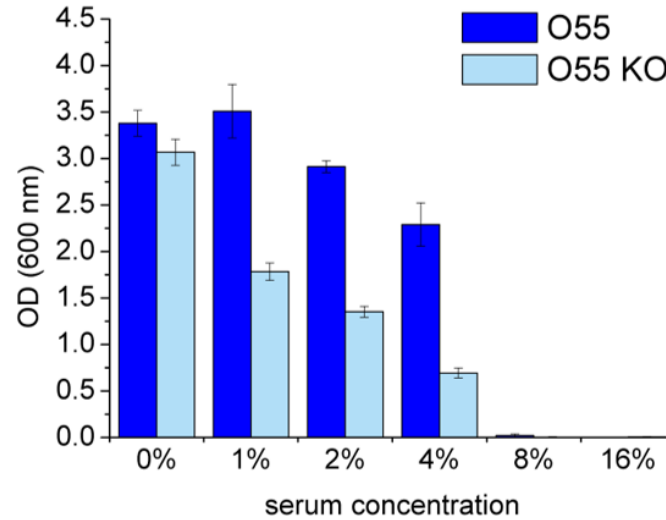
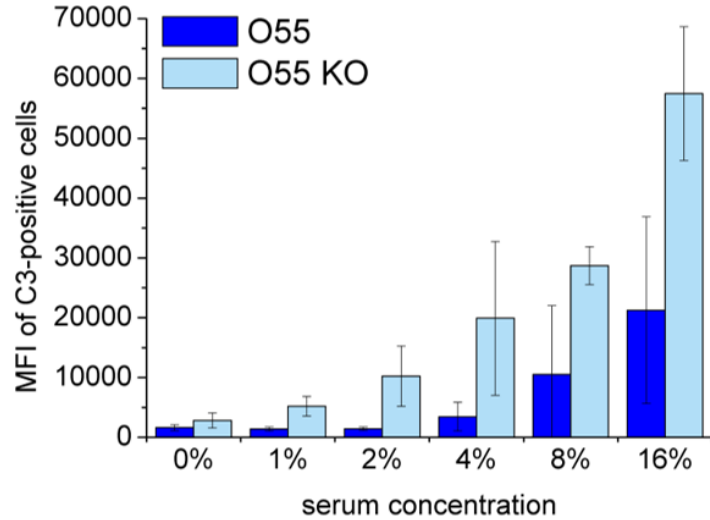
C3 lerakódás



növekedés szérum-tartalmú tápoldatban

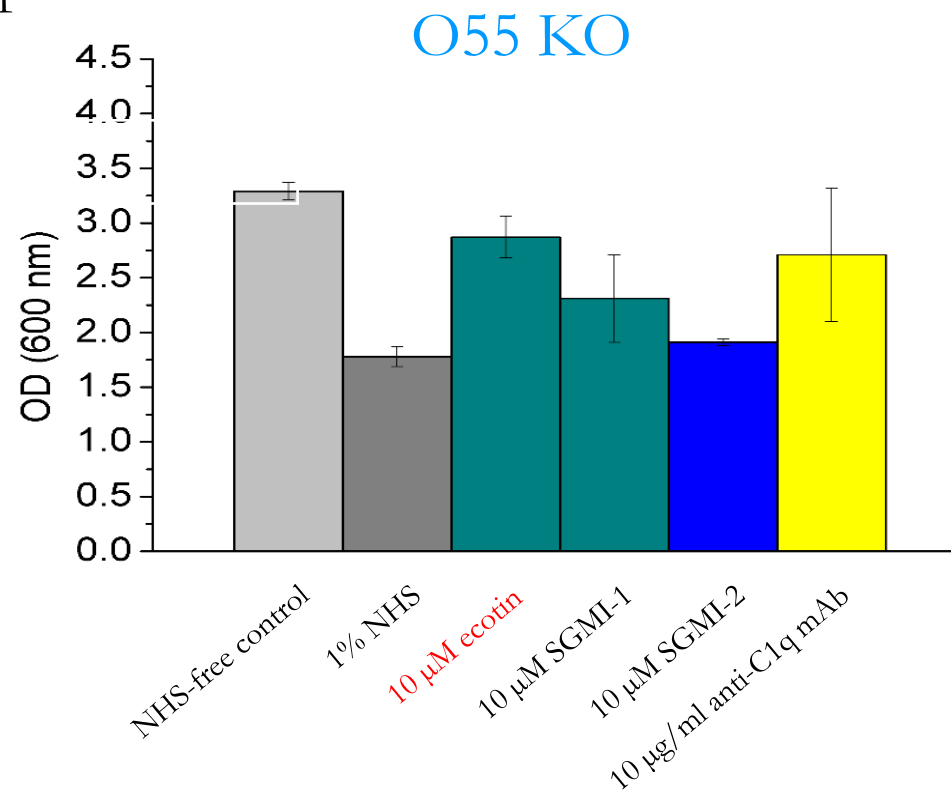
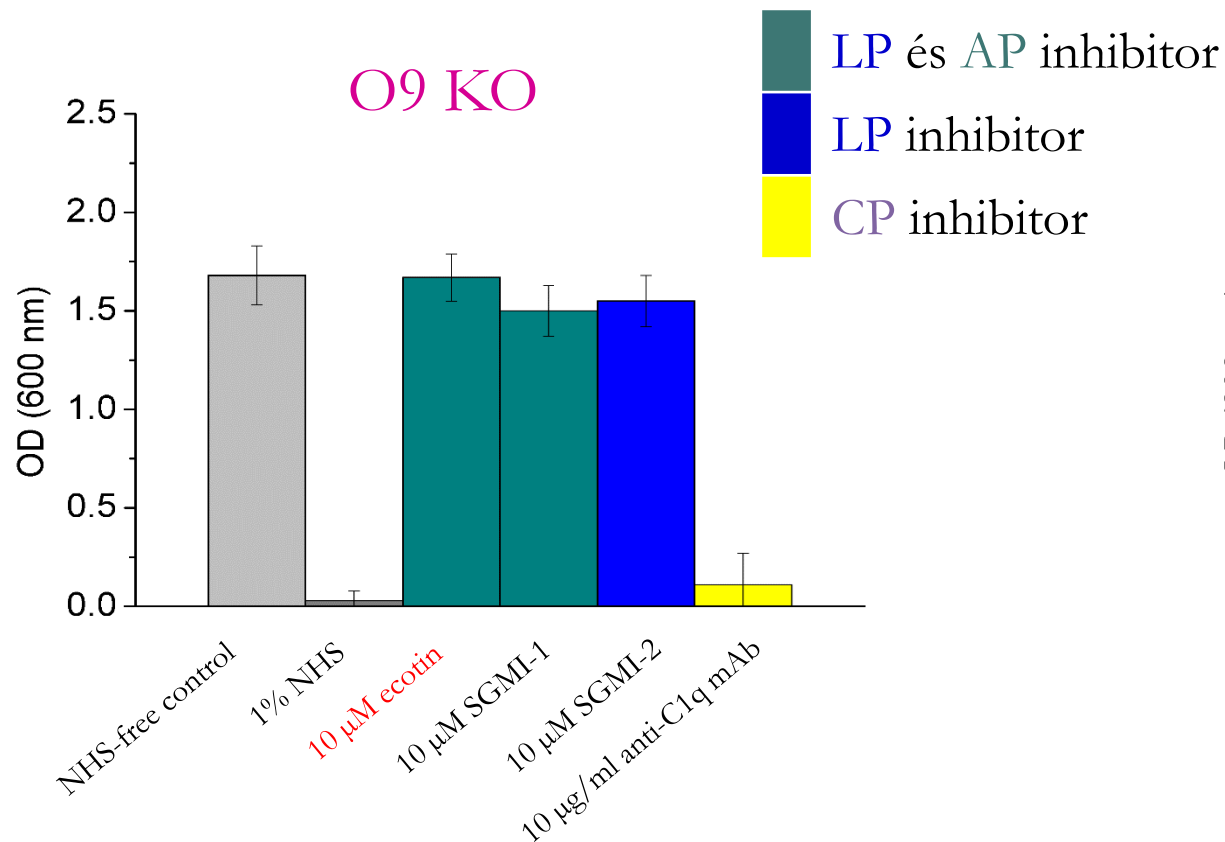


O9



O55

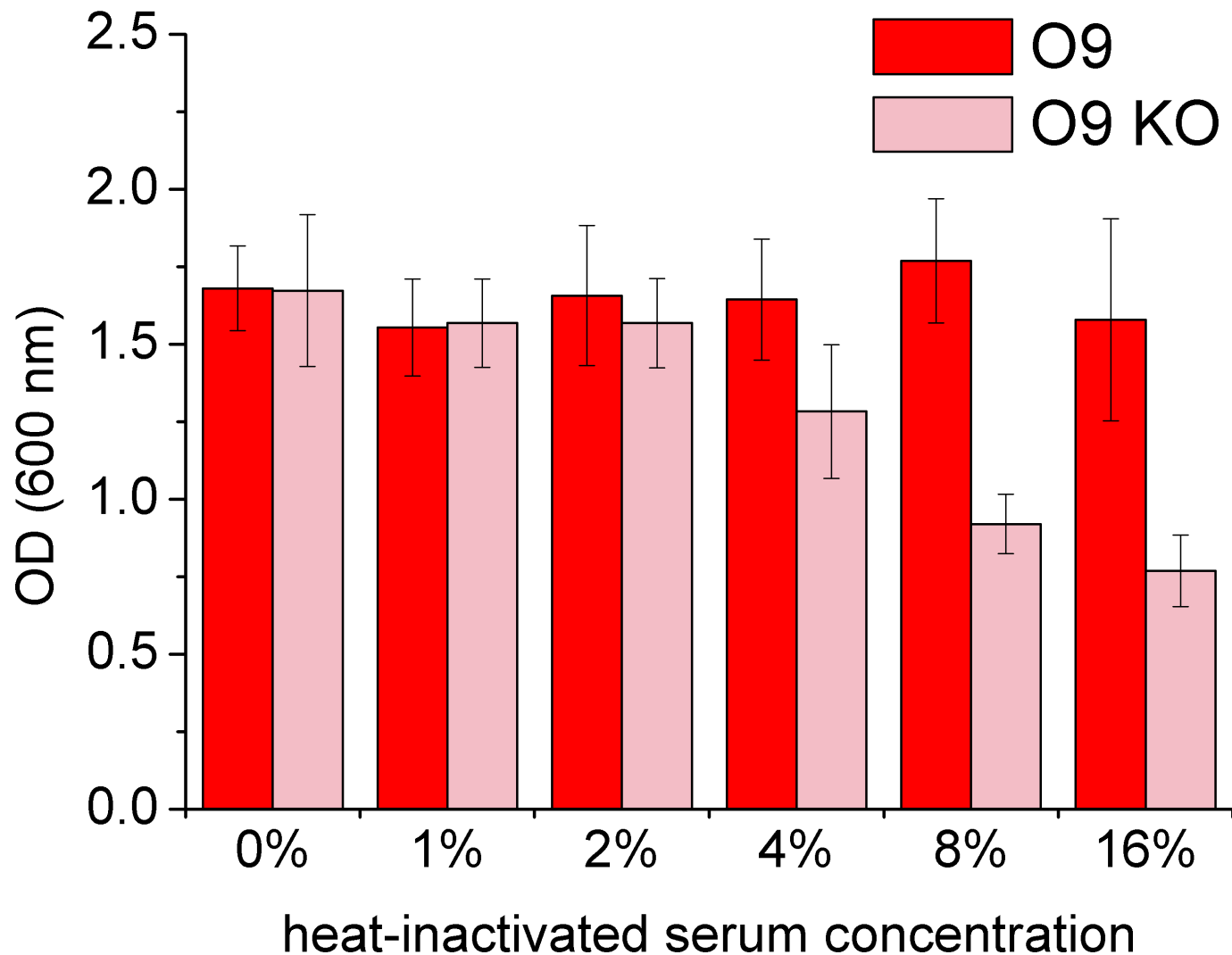
Specifikus inhibitorokkal teszteltük, melyik komplement útvonal járul hozzá a sejtpusztuláshoz



A szérum általi sejtölés LP-alapú

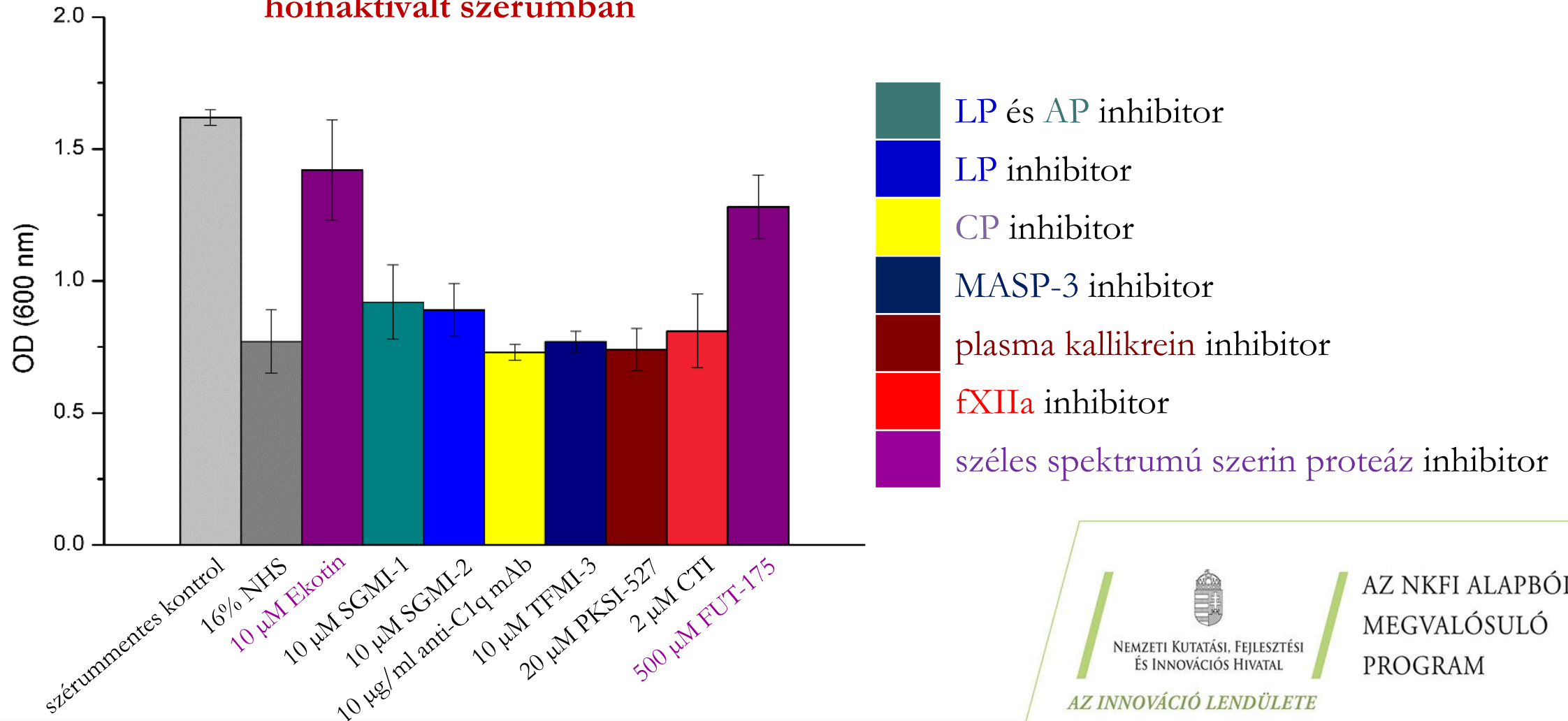
A szérum általi sejtölés (CP + AP)-alapú

Az Ecotin az O9 sejteket egy, hő-inaktivált szérumban detektált támadás ellen is védi.



Specifikus inhibitorokkal igyekeztünk azonosítani a komplement-független antibakteriális faktort

Egyes inhibitorok hatása az O9 KO sejtek túlélésére hőinaktivált szérumban



KÖVETKEZTETÉSEK

- Az Ekotin ortológok mindhárom MASP enzimet gátolják
- Az Ecotin az elsőként felfedezett természetes kanonikus lektin út inhibitor
- Az *E. coli* Ekotin gátolja a MASP-3 általi pro-FD aktivációt
- Az Ekotin, ami számos patogén mikroba virulencia faktora, védi az *E. colit* a szérumban az LP és az AP támadásától.
- Az Ekotin nem gátolja a klasszikus utat
- Az Ekotin egy azonosítatlan eredetű, hő-inaktivált szérumban is jelenlévő támadás ellen is védi a baktériumot.
- **Összefoglalva: az Ecotin hatékony védelmet biztosít a szimbiotikus és patogén mikrobáknak a veleszületett immunitás számos aktivitása ellen.**



Köszönöm a figyelmet!





NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROGRAM

AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE