

HUNPROTEXC

KÜLÖNBÖZŐ WNT PARALÓGOKRA SPECIFIKUS WIF1 VARIÁNSOK ELŐÁLLÍTÁSA

Patthy László

Perczel András

Bányai László, Kerekes Krisztina, Trexler Mária

Fazekas Dóra, Fazekas Zsolt, Stráner Pál

TTK Enzimológiai Intézet, Jelátviteli és Funkcionális

ELTE TTK, Kémiai Intézet, Szerves Kémia Tanszék, MTA-

Genomika Kutatócsoport

ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport



Nemzeti kiválósági program: Fehérjetudomány és alkalmazásai Nemzeti Program, HunProtExc, 2018-1.2.1-NKP-2018-00005



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

- A WNT fehérjék nagyméretű (~ 40 kDa), ciszteingazdag extracelluláris növekedési faktorok, melyek minden Metazoa csoportban megtalálhatóak.



WNT5A_HUMAN [*Homo sapiens*] Protein Wnt-5a (380 residues)

- Az emberi genomban **19 Wnt gén** található, melyek 12 konzervatív alcsaládot alkotnak.
- A Wnt-k kulcsszerepet játszanak az embrionális fejlődés, a sejt differenciáció és az őssejt proliferáció folyamatainak szabályozásában.

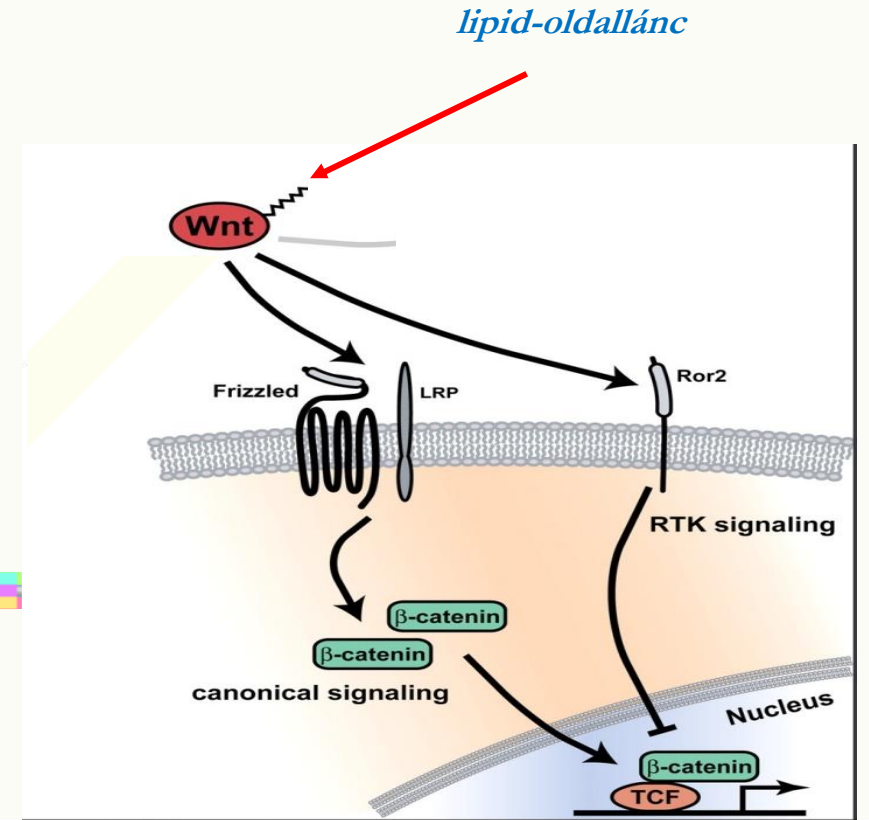
- A **Wnt-k** Frizzled-LRP receptor komplexekhez, illetve ROR-típusú receptor tirozin kinázokhoz kötődve **többféle jelátviteli út aktiválására képesek**.



FZD1_HUMAN [*Homo sapiens*] Frizzled-1 (647 residues)



ROR1_HUMAN [*Homo sapiens*] Tyrosine-protein kinase transmembrane receptor ROR1
EC=2.7.10.1 (937 residues)



- A Wnt fehérjék a Frizzled- és ROR receptorok cisztein gazdag **Fz-típusú doménjéhez** kötődnek.



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

- A Wnt-k aktivitásának szabályozásában fontos szerepet játszanak az **SFRP** és a **Wnt Inhibitory Factor-1** fehérjék.

- Az SFRP (Secreted frizzled-related protein) **Fz** doménje felelős a Wnt kötéséért, és a Wnt aktivitás gátlásáért.



SFRP3_HUMAN [Homo sapiens (Human)] Secreted frizzled-related protein 3 (325 residues)

- A WIF-1 (Wnt Inhibitory Factor-1) fehérje **WIF** doménje felelős a Wnt kötéséért, és a Wnt aktivitás gátlásáért.



WIF1_HUMAN [Homo sapiens (Human)]



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

- A Wnt Inhibitory Factor 1 –t (WIF1) kódoló tumor szuppresszor gén epigenetikai elcsendesítése a Wnt-jelátviteli út kóros túlműködését okozza, és ez a rendellenesség gyakran áll daganatok kialakulásának hátterében.
- A WIF1 expressziójának helyreállításával vagy rekombináns WIF1 fehérje alkalmazásával gátolni lehet a tumor progressziót, ezért az érdeklődés középpontjába kerültek a WIF1-alapú tumorterápiás megközelítések.
- Ennek a megközelítésnek korlátot szab az a tény, hogy a humán genom egyetlen WIF1 fehérjét kódol és ez a fehérje nagyon eltérő hatékonysággal köti a 19 Wnt paralóg fehérjét: a vad típusú fehérjén alapuló terápia nem elég hatékony és specifikus ahhoz, hogy alkalmas legyen valamennyi, a karcinogenezisben szerepet játszó Wnt gátlására.
- A Wnt-WIF1 kölcsönhatás szerkezeti alapjainak tisztázása alapul szolgálhat olyan WIF1 variánsok előállításához, melyek a különböző Wnt paralógokhoz nagyobb affinitással és specifikusabban kötődnek és így hatékonyabban alkalmazhatók tumor specifikus terápiás eljárásokban.

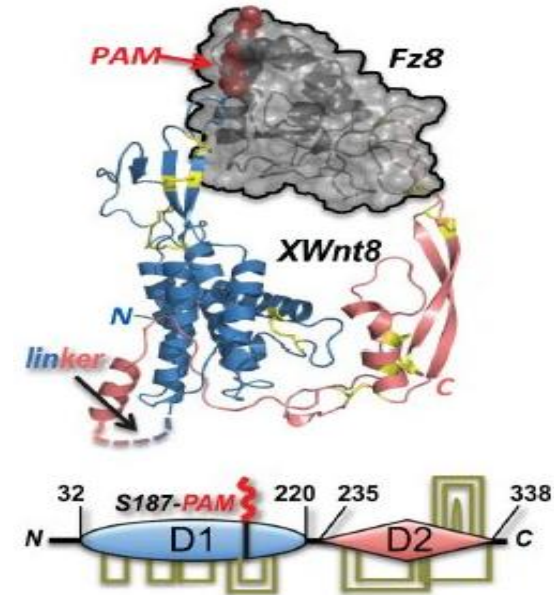
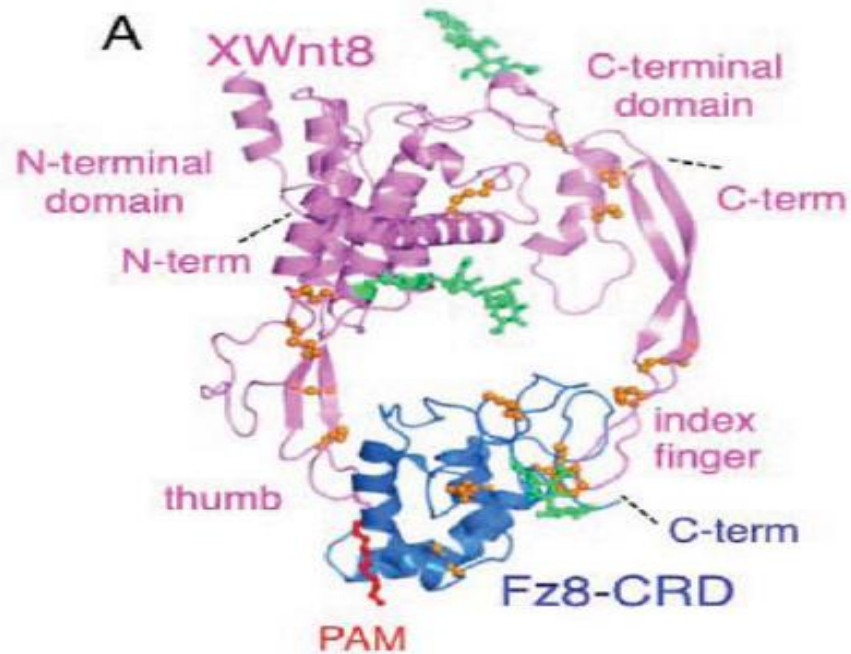
- A nagyméretű „Wnt-domén” valójában **két doménből áll**: az N-terminális saposin-doménből (D1) és a C-terminális citokin-doménből (D2). A Wnt a Frizzled receptor **Fz-doménjének két ellentétes felszínéhez kötődik**: az egyik felszínhez a D1 domén ‘thumb’ régiója, a másik felszínhez a D2 domén ‘index finger’ régiója kötődik.



WNT5A_HUMAN [Homo sapiens] Protein Wnt-5a (380 residues)



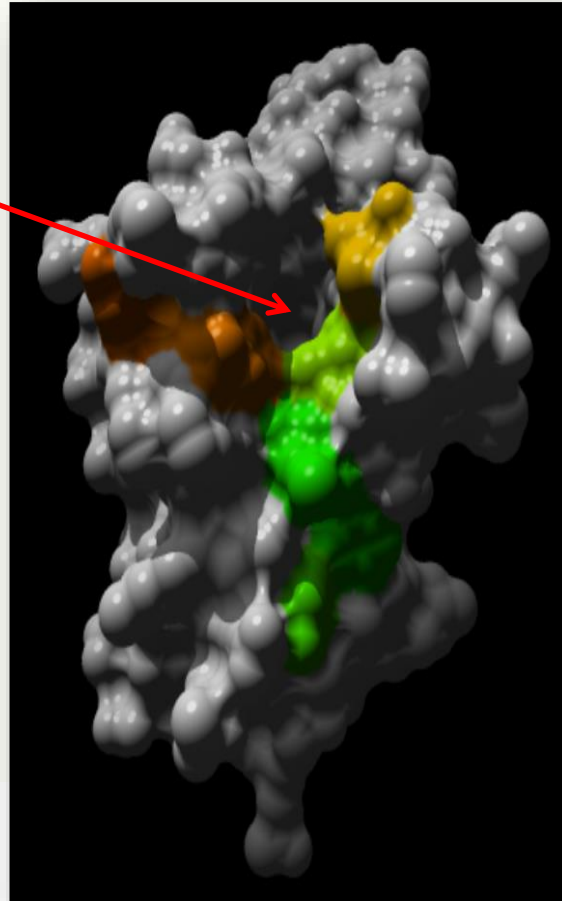
FZD1_HUMAN [Homo sapiens] Frizzled-1 (647 residues)



Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science*. 2012 Jul 6;337(6090):59-64.
 Bazan JF, Janda CY, Garcia KC. Structural architecture and functional evolution of Wnts. *Dev Cell*. 2012 Aug 14;23(2):227-32.

- A WIF1 fehérje WIF-doménje felelős a Wnt kötéséért és a Wnt aktivitás gátlásáért

- A WIF-domén felületén egy **alkil-kötőhelyet** azonosítottunk, melyről feltételeztük, hogy kulcsszerepet játszik a Wnt-k N-terminális doménjén található **esszenciális lipid-oldallánc** **kötésében.**



A WIF-domén Wnt5a–WIF kölcsönhatásban szerepet játszó felszíne. Kiemelve azok az oldalláncok, melyek arginines szubsztitúciója gyengítette (sárga), illetve erősítette (zöld) a kölcsönhatást.

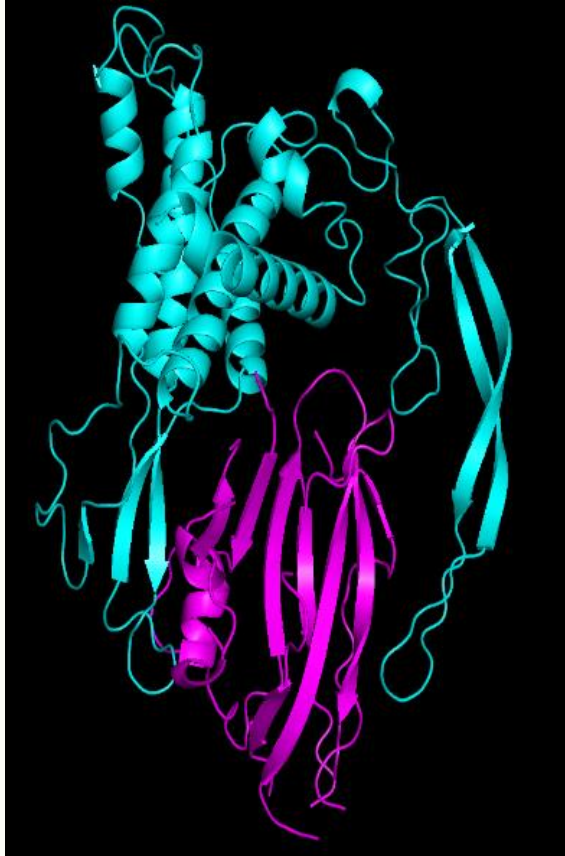
- L. Banyai, K. Kerekes, L. Patthy, Febs Lett. : Vol.586, 3122–3126 (2012)

Liepinsh, E., Banyai, L., Patthy, L., Otting, G. NMR structure of the WIF domain of the human Wnt-inhibitory factor-1. (2006) J. Mol.Biol. 357: 942-950



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT



A WIF1 WIF domén - Wnt komplex
feltételezett szerkezete

- Mutagenezis vizsgálataink arra utalnak, hogy a WIF doménen **két jól elkülönülő Wnt-kötő felszín** található. Eredményeink alapján feltételezett **szerkezeti modell** szerint az egyik felszínhez a Wnt-k saposin-doménjei, a másikhoz a citokin doménjei kötődnek.

- Kerekes K, Bányai L, Patthy L. Wnts grasp the WIF domain of Wnt Inhibitory Factor 1 at two distinct binding sites. FEBS Lett. 2015 Oct 7;589(20 Pt B):3044-51.

CÉLKITŰZÉS

A különböző Wnt paralógokra specifikus WIF1 variánsok előállítása érdekében szerkezetbiológiai módszerekkel (**NMR spektroszkópia, krio-elektronmikroszkópia**) kívánjuk feltárni a WIF – Wnt komplex kialakításában részt vevő kötőfelszínek pontos szerkezetét.

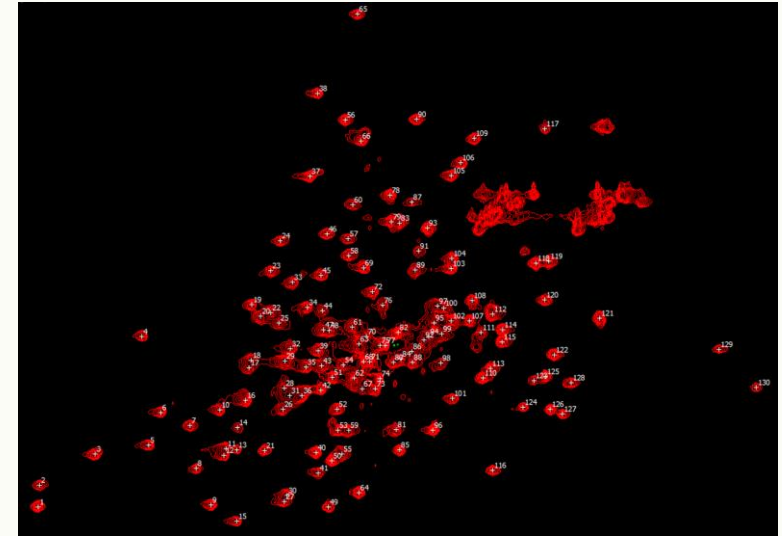


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

EREDMÉNYEK

- A **Wnt3a** fehérjét egér L sejtekben állítottuk elő, hogy NMR spektroszkópiai módszerekkel vizsgálhassuk a WIF domén-Wnt kölcsönhatást. A WIF1 fehérje N15-izotópjelölt WIF-doménjét baktériális expressziós rendszerben állítottuk elő és meghatároztuk a fehérje HSQC spektrumát.
- Egér L sejtekben **koexpresszáltuk a teljes hosszúságú WIF1 és a Wnt3a** fehérjéket annak érdekében, hogy krio-elektronmikroszkópiával meghatározzuk a Wnt3a-WIF1 komplex térszerkezetét.



A Brij-35 detergenssel refoldált WIF domén 1H-15N HSQC spektruma PBS pufferben (0,46 mM WIF, pH = 6,0). A HSQC jeldiszperzió alapján a fehérje jól feltekeredett, a jelek kémiai eltolódása pedig a korábban publikált asszignáció alapján megfelelőek (a kis különbségek a pH- és oldószerbeli eltérésekből fakadhatnak).



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT

KÖSZÖNÖM A FIGYELMET!



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROJEKT