

# HUNPROTEXC

TELJESHOSSZÚSÁGÚ HUMÁN KOMPLEMENT PROTEÁZOK SZERKEZET-FUNKCIÓ VIZSGÁLATA

*GÁL PÉTER, PÁL GÁBOR*

**ELTE**

Harmat Veronika  
Nagy Zoltán Attila  
Pál Gábor

**ELKH**

Kocsis Andrea  
Végh Barbara  
Dobó József  
Gál Péter



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI  
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL  
MEGVALÓSULÓ  
PROJEKT



# 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

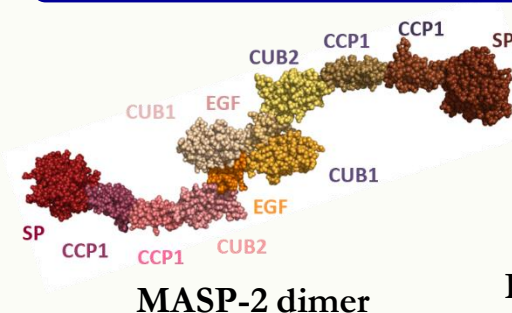
ELTE TTK  
Biokémiai Tanszék  
Hozzájárulás: MASP-2 gátló mono- és bivalens ecotin előállítása

## CÉLOK

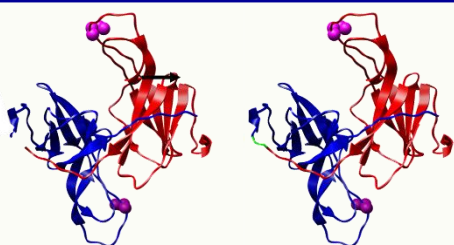
Teljeshosszúságú, bivalens ecotinnal összerendezett, dimer MASP-2 proteáz atomi felbontású térszerkezet-meghatározása krio-EM vagy RTG krisztallográfia segítségével. A MASP-2 aktiváció mechanizmusának kiderítése monovalens és bivalens Ecotinnal

## Molekuláris „eszközök”

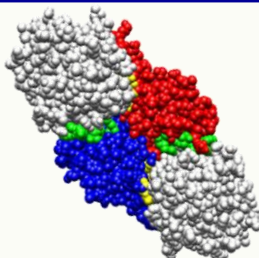
## Kísérletes megközelítés: szerkezet



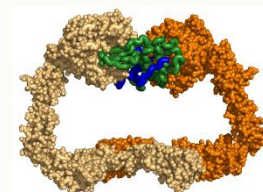
MASP-2 dimer



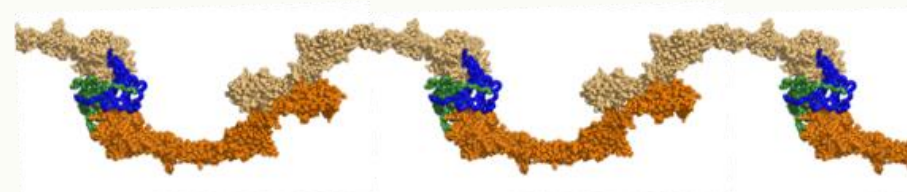
Bivalens vad és monovalenssé tehető egyláncú Ecotin



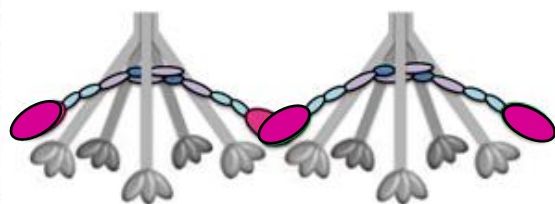
Ecotin:proteáz heterotetramer



Ecotinnal gyűrűbe zárt MASP-2 dimer: vizsgálat: RTG krisztallográfia / krio-EM



Ecotinnal filamentumokba rendezett MASP-2 dimerek vizsgálat: krio-EM



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

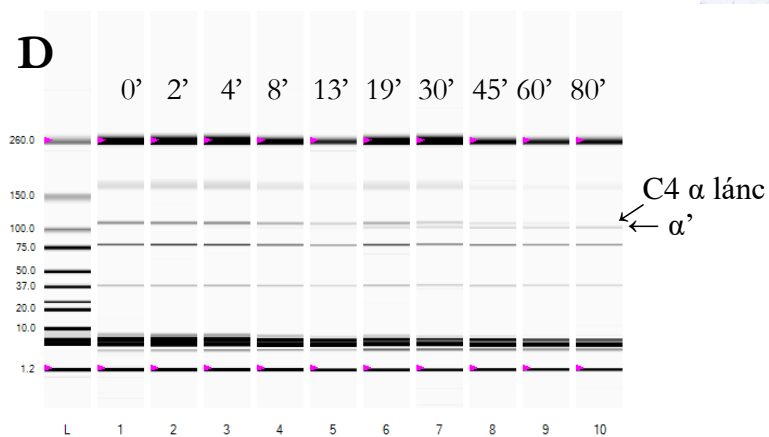
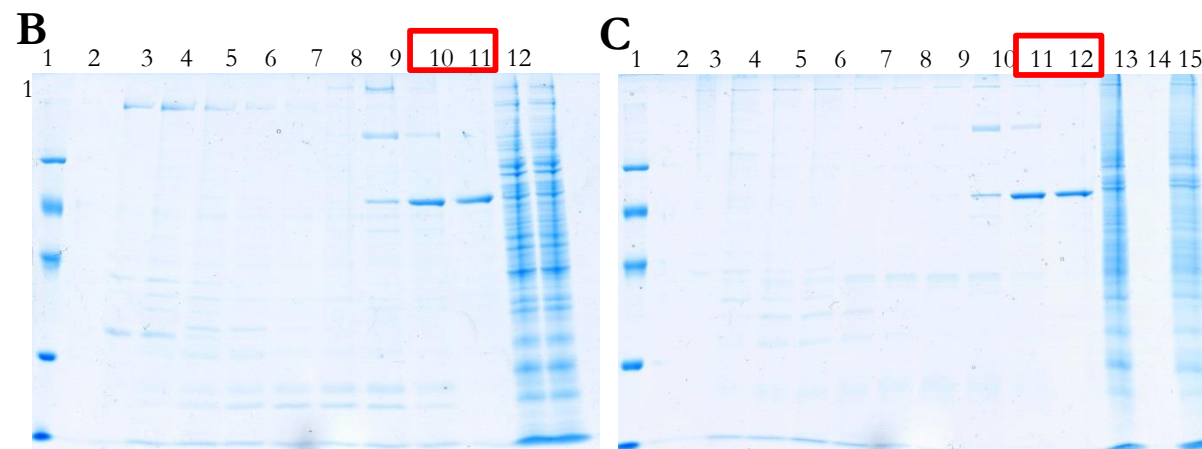
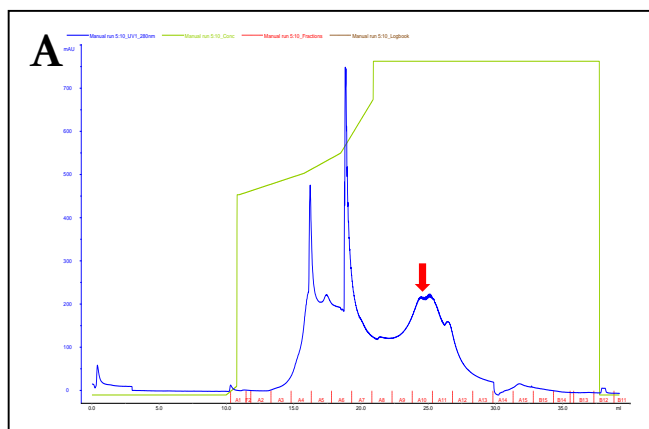


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

# Aktív, teljes hosszúságú MASP-2 előállítása

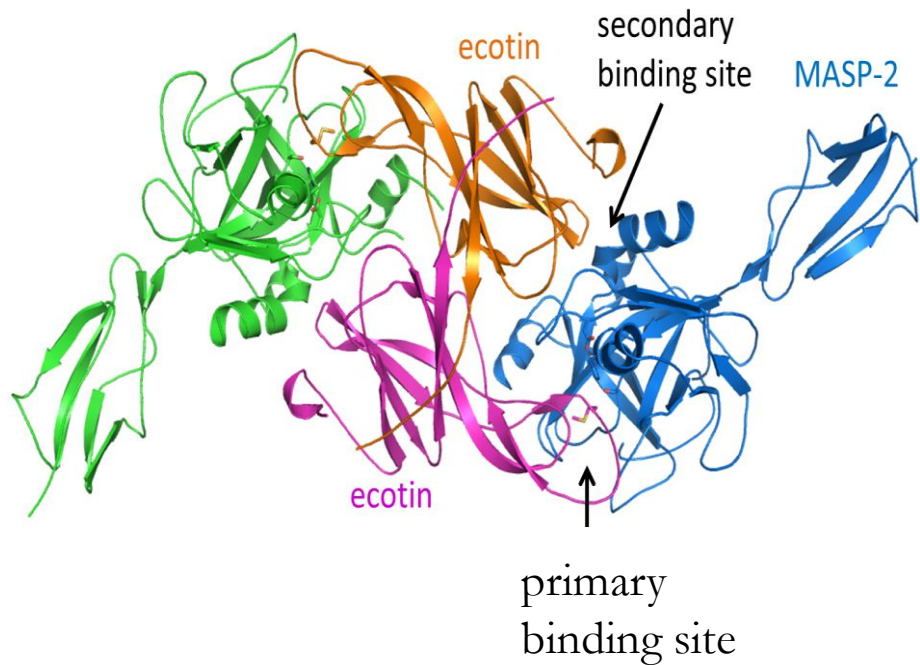
- A teljes MASP-2 gén klónozása pVL1393 rovarsejt expressziós vektorba His-tag nélkül
- Zimogén MASP-2 termelése Sf9 rovarsejt rendszerben
- (A) Sejtfelülészó tisztítása affinitás kromatográfiával MBL-oszlopon
- Tisztítási frakciók ellenőrzése SDS-PAGE gélen
- (B) redukált, (C) nemredukált
- Zimogén MASP-2 aktiválása termolizinnel
- A teljes hosszúságú MASP-2 aktivitásának vizsgálata természetes szubsztrátján, a C4 fehérjén (D) kapilláris gélelektroforézissel



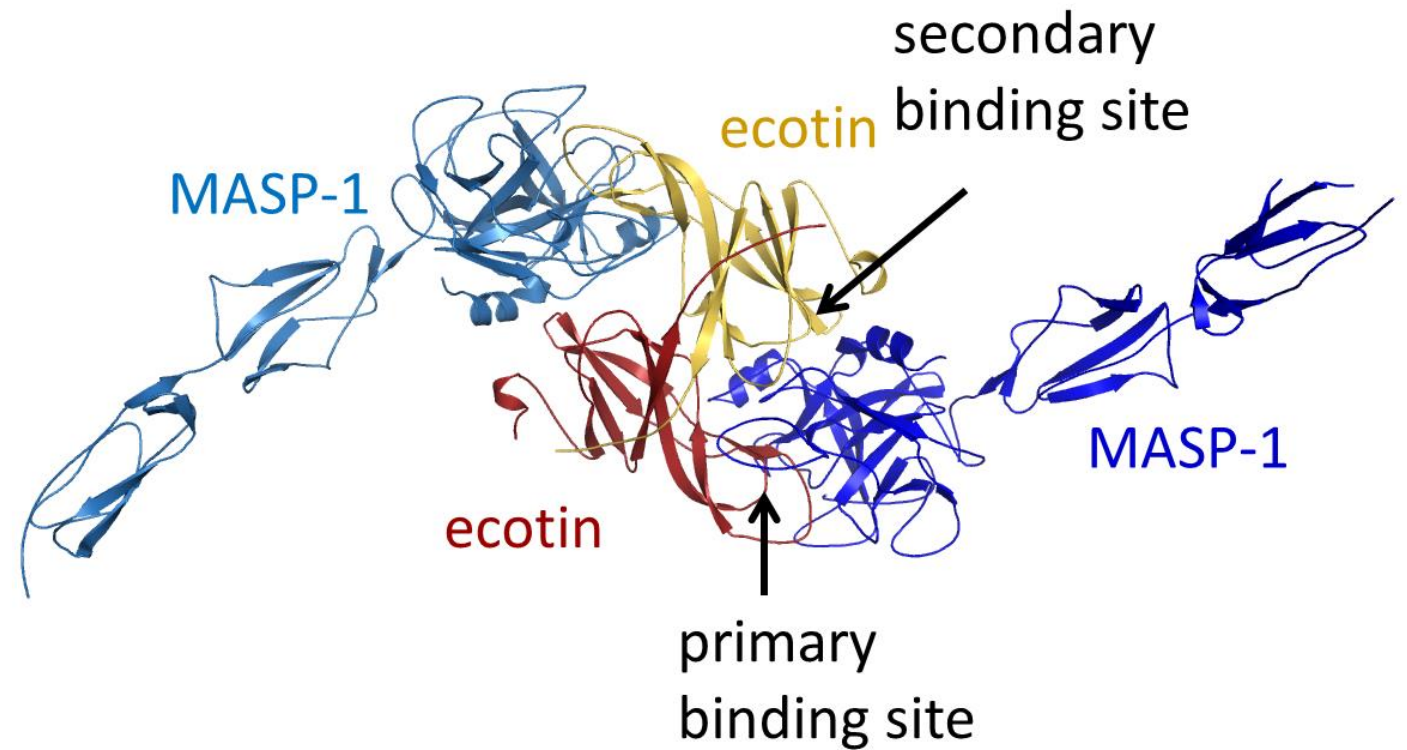
60 perc után a C4 fehérje  $\alpha$  láncát a MASP-2 enzim teljesen elhasította, a gélen csak az  $\alpha'$  hasított lánc látszódik.

# Rövid enzim formák esetében sikerült feltárni a MASP-2 : ecotin és a MASP-1 : M84R ecotin kristályszerkezetét

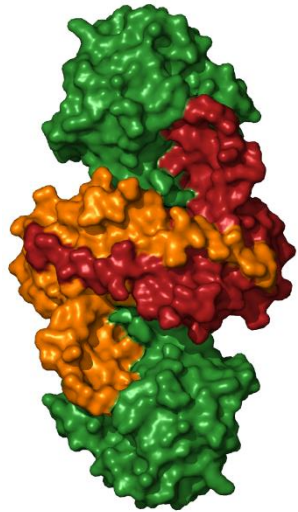
MASP-2 : WT ecotin komplex



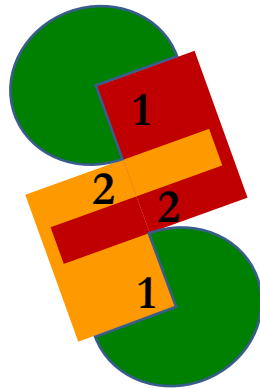
MASP-1 : M84R ecotin komplex



# Az ecotin mind a 3 MASP enzimet gátolja. Kérdés, hogyan?



Heterotetramer komplex



**Első megközelítés**  
az enzimkötő helyek módosítása

Site1 gyengítés: **M84A**

Site1 erősítés: **M84R**

Site2 gyengítés: **R108A/N110A**



RESEARCH ARTICLE

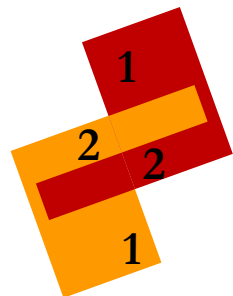
Ecotin, a microbial inhibitor of serine proteases, blocks multiple complement dependent and independent microbicidal activities of human serum

Zoltán Attila Nagy<sup>1\*</sup>, Dávid Szakács<sup>1\*</sup>, Eszter Boros<sup>1</sup>, Dávid Héja<sup>1,2</sup>, Eszter Vigh<sup>1</sup>, Noémi Sándor<sup>3</sup>, Mihály Józsi<sup>3</sup>, Gábor Oroszán<sup>4</sup>, József Dobó<sup>4</sup>, Péter Gál<sup>4</sup>, Gábor Pál<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, ELTE, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary, <sup>2</sup> Department of Nephrology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, United States of America, <sup>3</sup> Department of Immunology, ELTE, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary, <sup>4</sup> Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

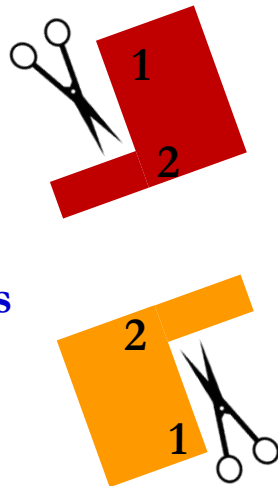
**Második megközelítés**

A Site1/Site2 pre-organizáció elrontása: **Δ133-142**



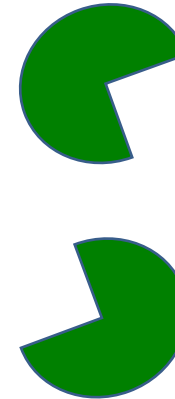
Stabil dimer

Irányított mutagenézis  
**Δ133-142**

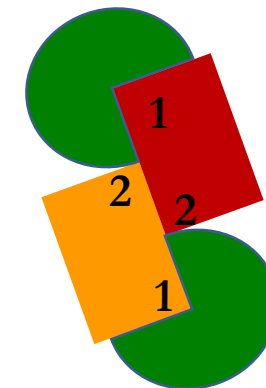


Stabil monomerek

+



↔

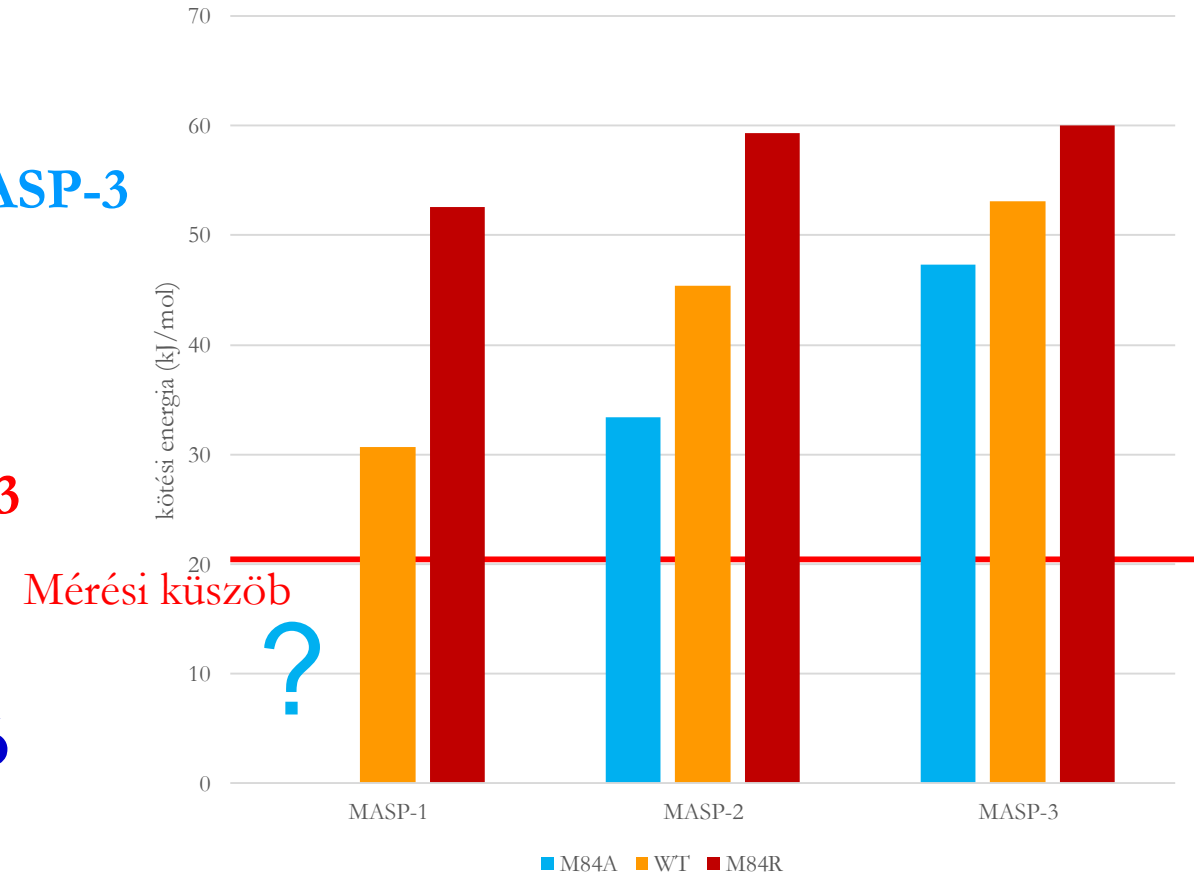


Működőképes Site1 és Site2 esetén monomerből is létrejehet a heterotetramer komplex, de kevésbé stabil

# A Site1 hozzájárulás mértéke MASP enzim függő

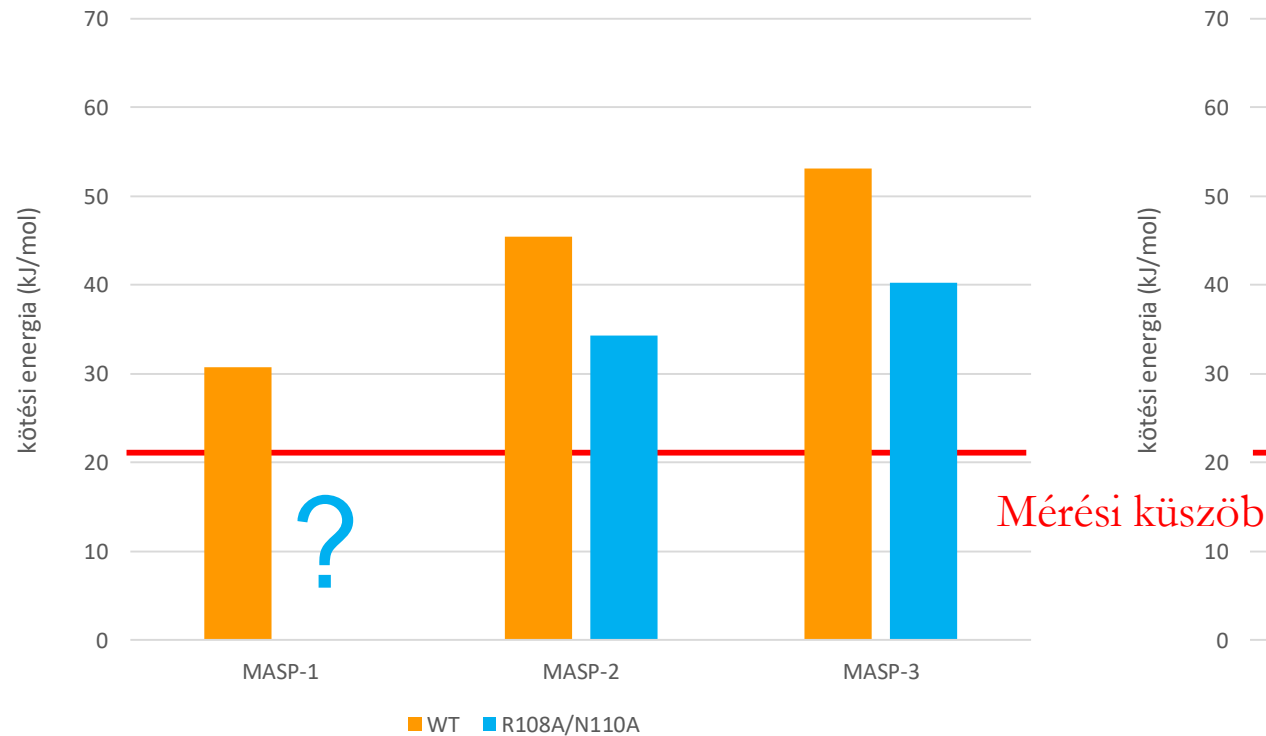
- M84A Site1 kölcsönhatás gyengül
- Gyengülés sorrendje: MASP-1 (?) > MASP-2 > MASP-3
- M84R Site1 kölcsönhatás erősödik
- Erősödés sorrendje: MASP-1 > MASP-2 > MASP-3

A MASP-1 csak Arg P1 esetén gátolható hatékonyan, míg a MASP-2 és MASP-3 Met P1 esetén is

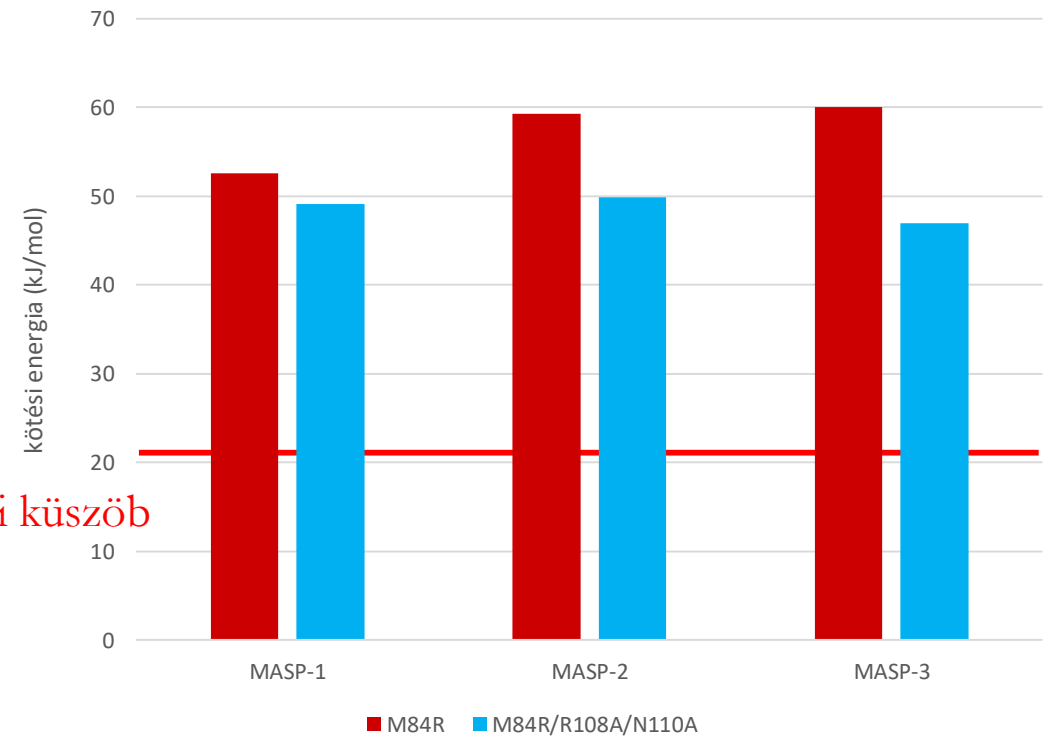


# A Site2 hozzájárulás mértéke szintén MASP enzim függő

## M84 (eredeti) Site1 esetén



## M84R (erősített) Site1 esetén

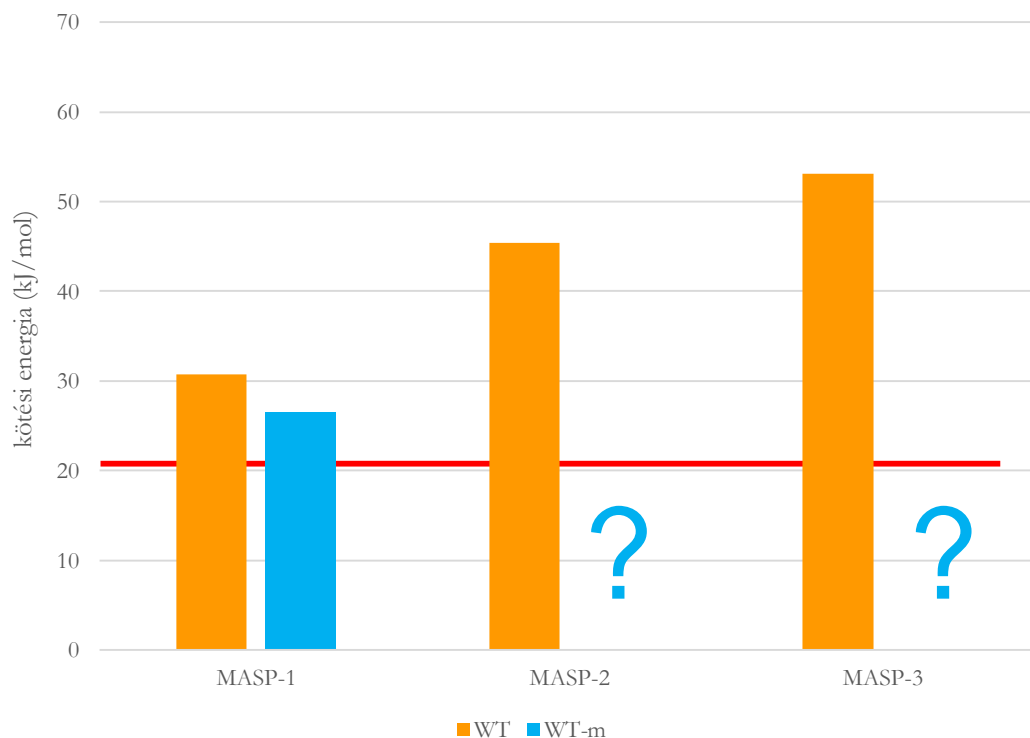


A sorrend megfordult: MASP-3 > MASP-2 > MASP-1

A MASP-3 és MASP-2 számára kimagaslóan fontos a Site2 kölcsönhatás

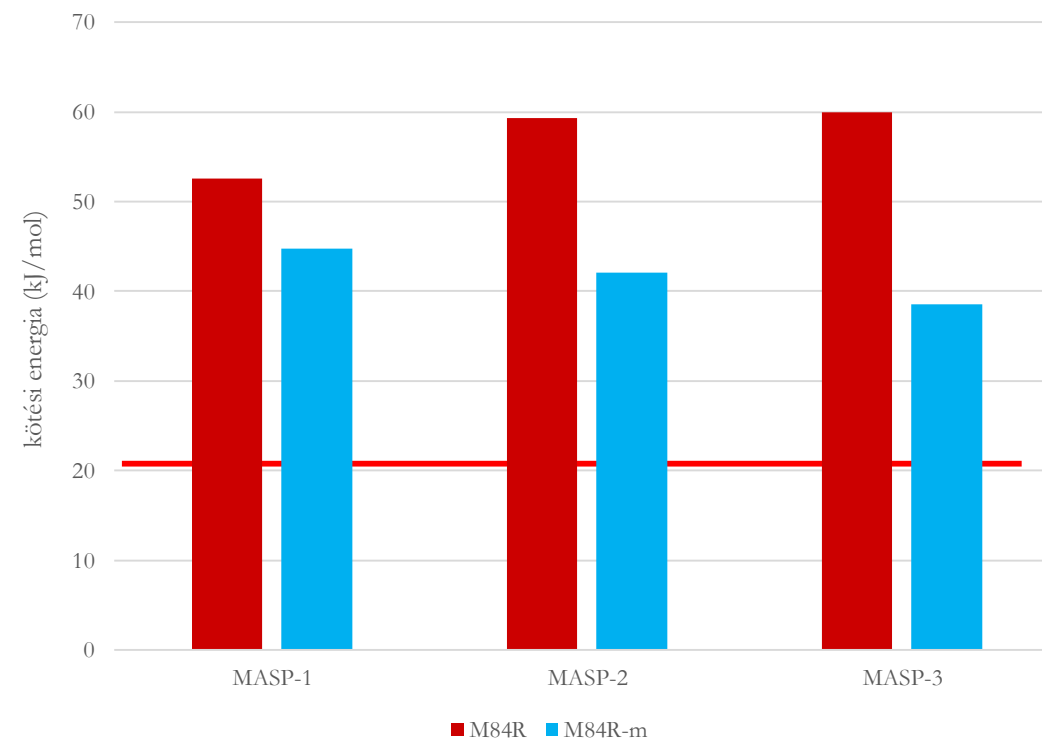
# A Site1/Site2 pre-organizáció hozzájárulása szintén MASP enzim függő

## M84 (eredeti) Site1 esetén



A sorrend: MASP-3 > MASP-2 > MASP-1

## M84R (erősített) Site1 esetén



A MASP-3 és MASP-2 számára kimagaslóan fontos a Site1/Site2 pre-organizáció



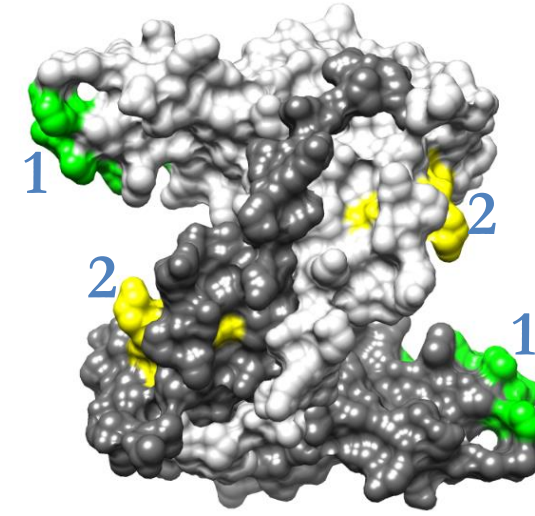
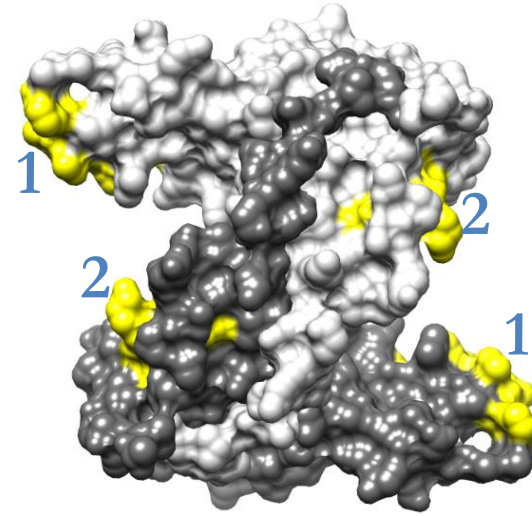
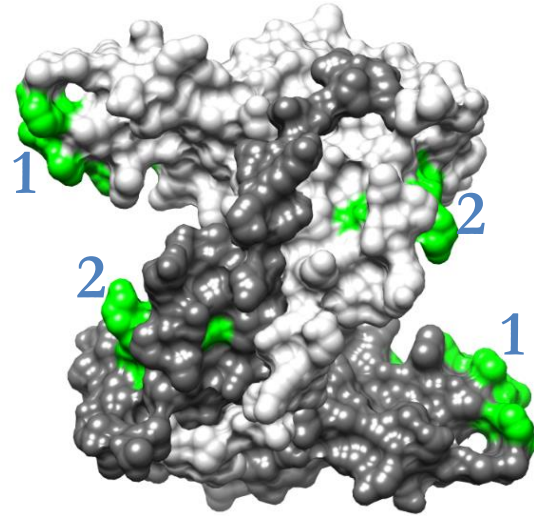
# Az egyes kötőhelyek és pre-organizációjuk energetikai szerepe

Célenzim:

MASP-1

MASP-2

MASP-3



$\Delta\Delta G_0$   
(kJ/mol)

0-5

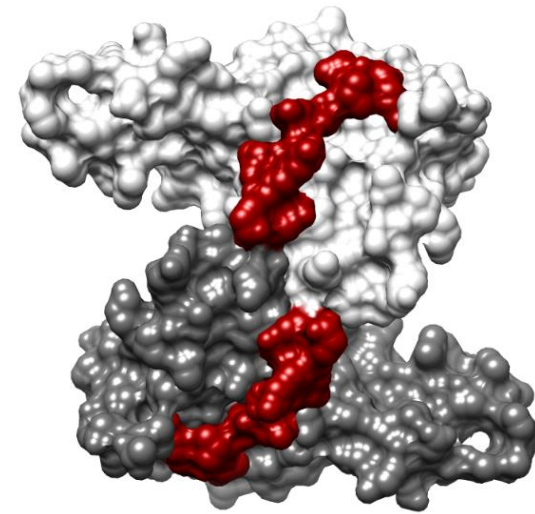
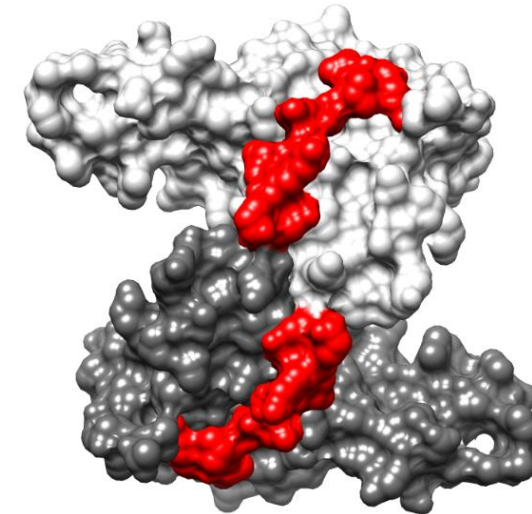
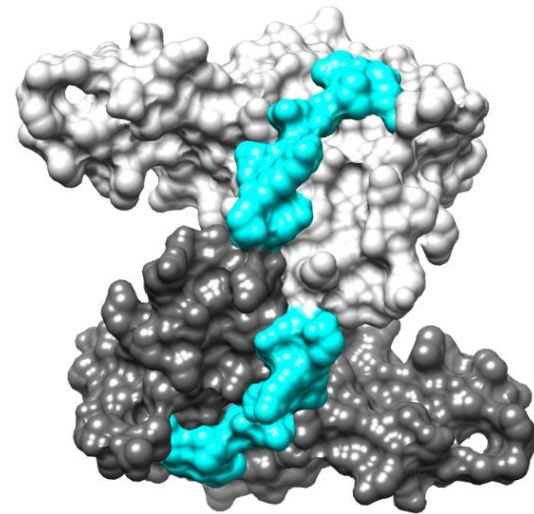
5-10

10-15

15-20

20-25

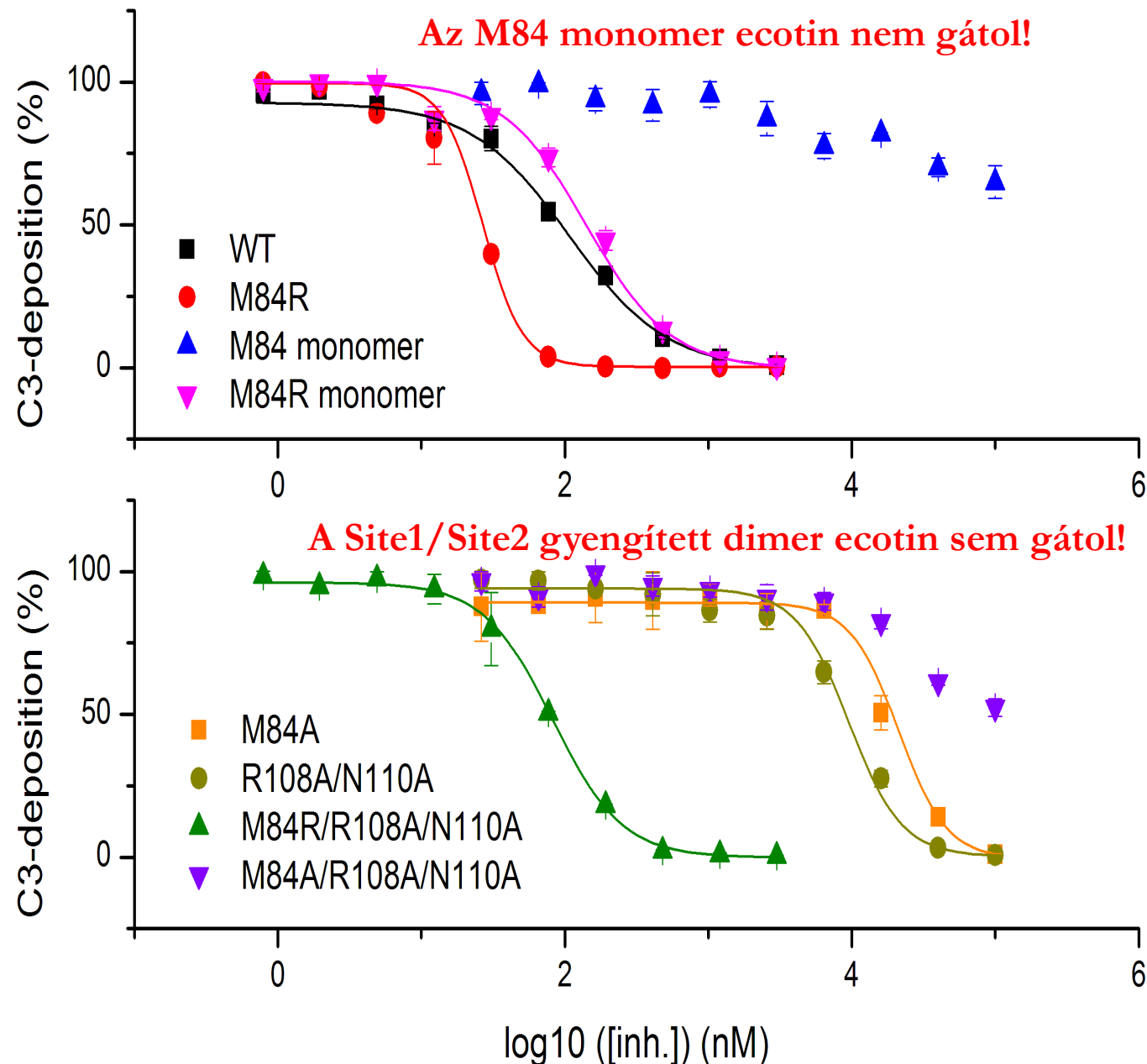
25+



# Az egyes kötőhelyek és a pre-organizáció szerepe a lektin út gátlásban

Háttér infó: akár a MASP-1, akár a MASP-2 enzimet gátoljuk, az lektin út gátlást okoz

Variáns	IC50 (nM)
• WT	107
• M84-monomer	ND
• M84R	29
• M84R monomer	141
• M84A	21000
• R108A/N110A	9540
• M84R/R108A/N110A	82
• M84A/R108A/N110A	ND



## Következtetések

- Az ecotin kimotripszin-szerű enzimek gátlását is biztosító M84 Site1 felszíne csak gyenge MASP-1 gátlást biztosít, mert a MASP-1 gátlás előfeltétele az R84 Site1
- A lektin út gátláshoz azonban elegendő a MASP-2 gátlás is, ezért lehet a MASP-2 evolúciósan előnyös „célpont”
- A MASP-2 és MASP-3 esetében az erős Site2 kölcsönhatás kompenzálja a gyenge Site1 kölcsönhatást
- A Site1 / Site2 pre-organizáció a MASP-2 és MASP-3 gátlás alapvető feltétele
- Site1 / Site2 pre-organizáció hiányában, azaz monomer ecotinnal a lektin út nem gátolható
- Az ecotin dimerizációt gátolni képes anyagok ígéretes antibiotikum vezérmolekulák lehetnek



# Köszönjük a figyelmet!

