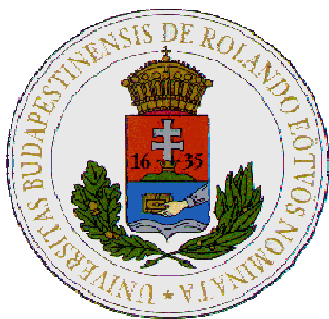


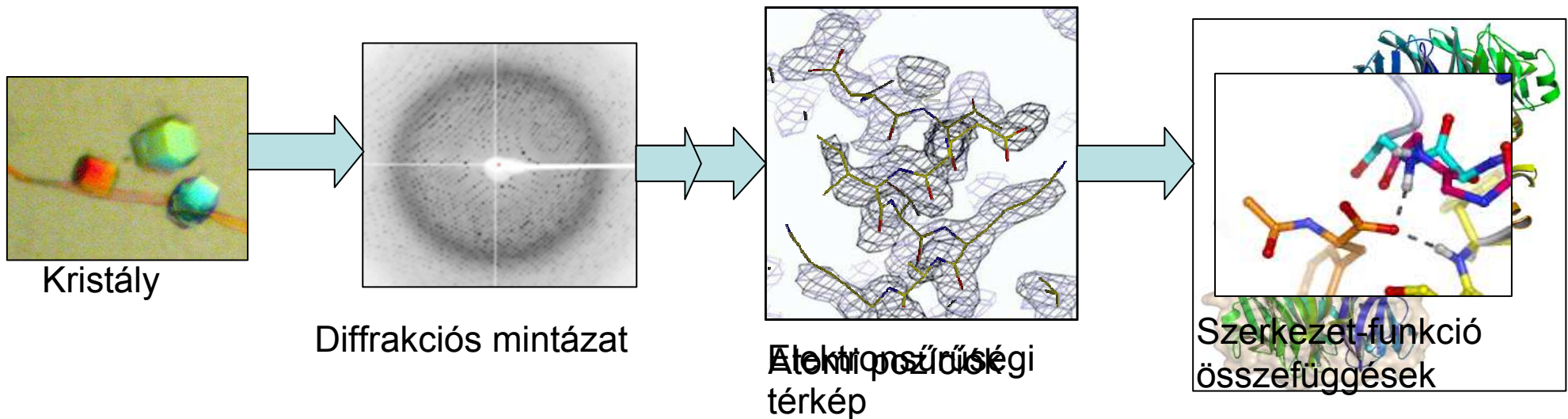
# A polipeptidlánc szabályozott lebontása: mit mondanak a fehérjekristályok?



**Harmat Veronika**

ELTE Kémiai Intézet, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium  
MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport

# Fehérjék röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálata



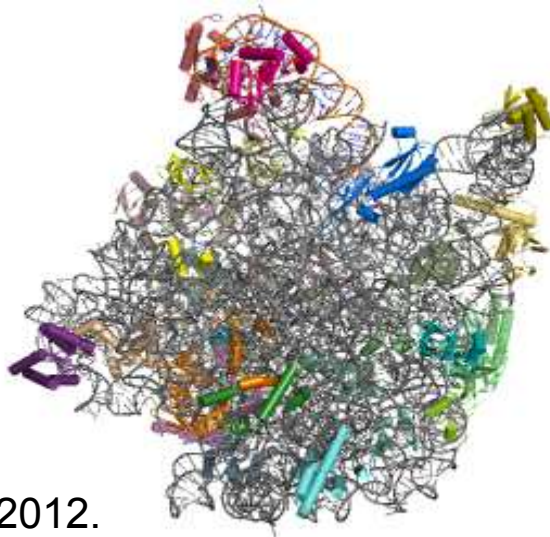
**Jelentősége:** kémia a biológia mögött

- Térszerkezet a kristályban atomi szinten
- Fehérjekrisztallográfia és Bio-NMR egymást kiegészítő módszerek
- PDB szerkezeti adatbank: 86008 db. szerkezet,  
88% röntgendiffrakcióval, 97% fehérjék és komplexeik

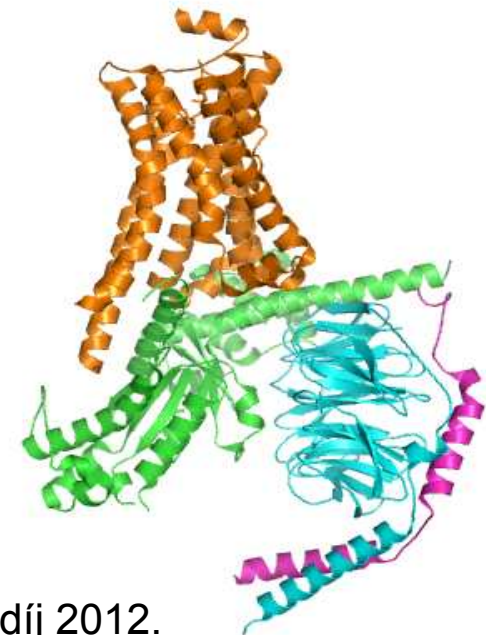
# Fehérjekristallográfia: atomi szintű információ a molekulákról

## Térszerkezet a kristályban

- A vizsgálathoz egykristály előállítása szükséges
- Stabil konformációjú fehérjék vizsgálhatók (globuláris fehérjék)
- A konformáció az oldatban és a kristályban általában hasonló
- Nincs elvi méretbeli korlát

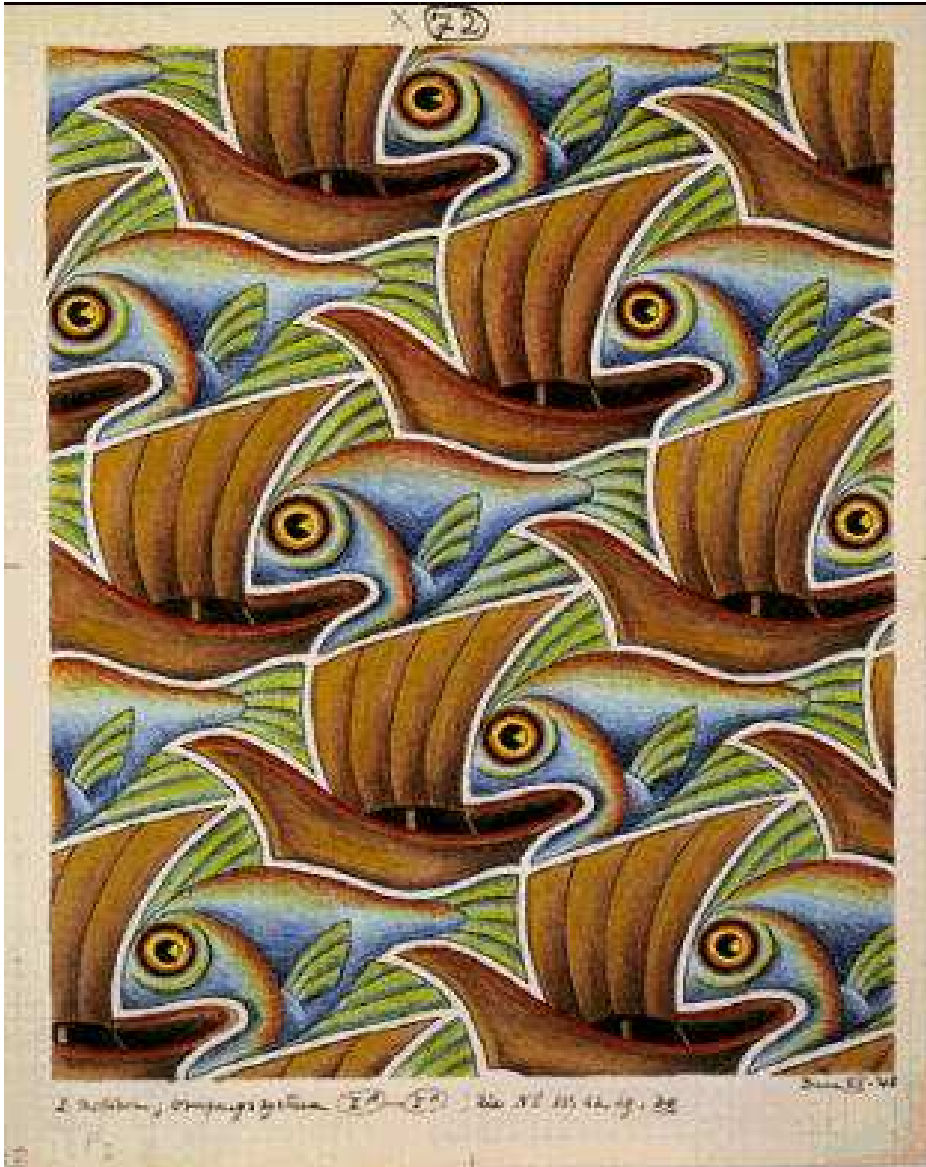


Kémiai Nobel díj 2012.  
Venkatraman Ramakrishnan,  
Thomas A. Steitz , Ada E. Yonath  
riboszóma



Kémiai Nobel díj 2012.  
Brian Kobilka, Robert Lefkowitz  
G-fehérje kapcsolt receptorok

# Fehérjekrisztallográfia: atomi szintű információ a molekulákról



**A mérési eredményből a kristálybeli elektronsűrűség térbeli és időbeli átlaga számítható ki**

- Dinamika helyett kristálybeli mozgékonyág
- Kölcsönhatások, molekuláris felismerés
- Kémiai reakció mechanizmusa
- Funkciós csoportok térbeli elhelyezkedése
- „Befagyasztott” reakciólépések megjelenítése

Maurits Cornelis Escher: Szimmetria E72.

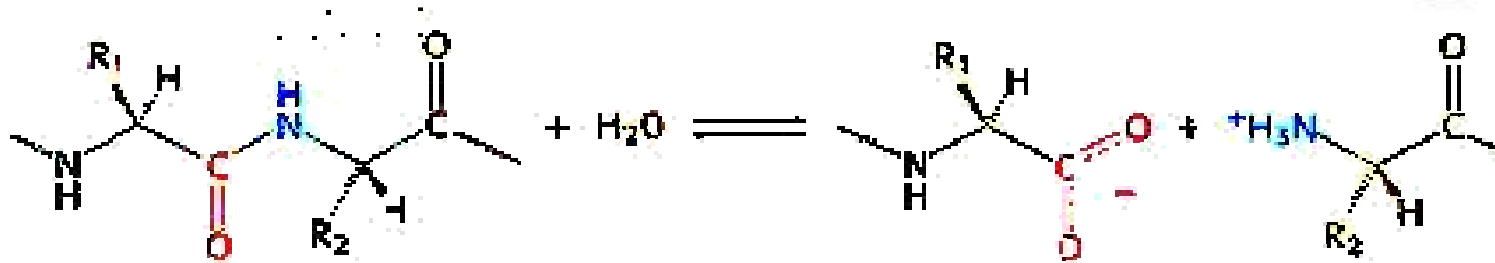
# Peptidkötés hidrolízise



## Kémiai stabilitás:

Vizes közegben kinetikai stabilitás

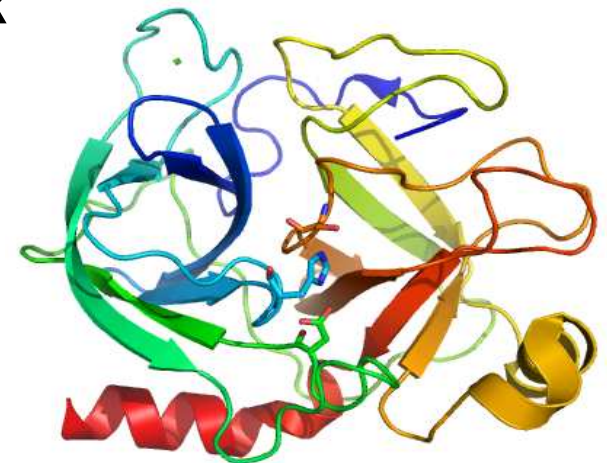
- Klasszikus módszer a fehérje teljes elhidrolizálására: 6 mol/dm<sup>3</sup> sósav, 24 órás főzés



## A szervezetben enyhébb és szabályozott körülmények

- Katalizátorok (enzimek: proteázok, peptidázok)
- Fehérjék lebontása: potenciális veszély  
Helyhez és időhöz kötött, szabályozott aktivitás

- Keletkezés: inaktív proenzim, aktiválás
- Az aktivitás befolyásolása: inhibitorok, aktiváló kofaktorok
- Lebontás



marha tripszin

Marquart M et al Acta Cryst.B39:480 (1983)

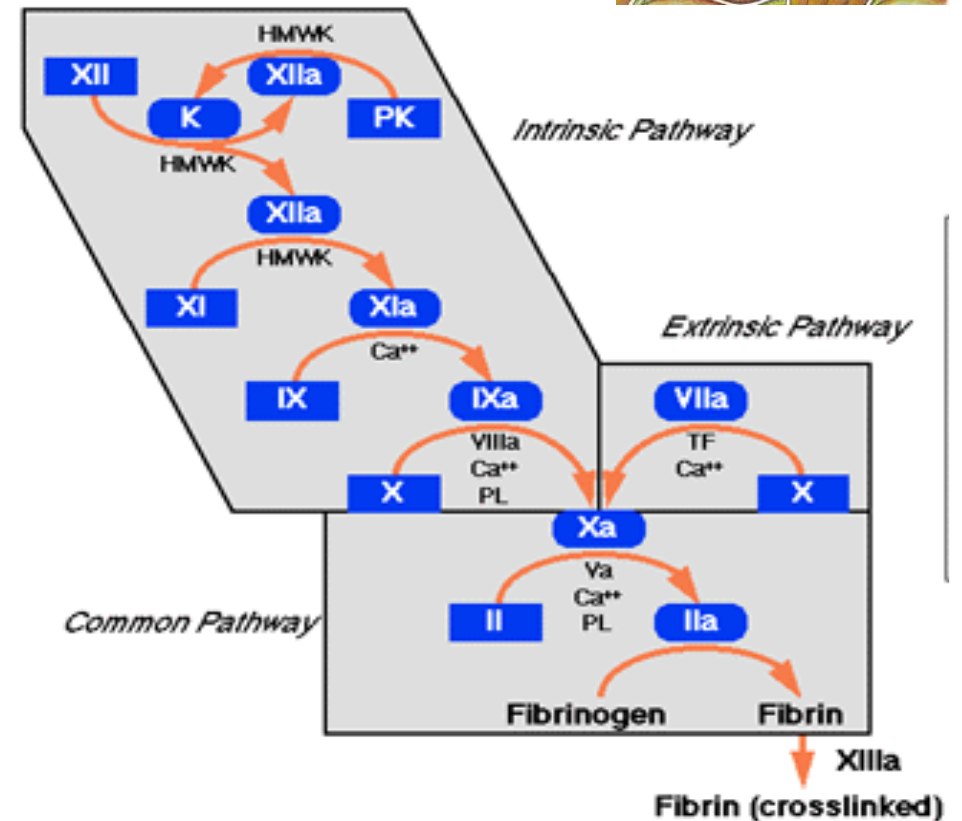
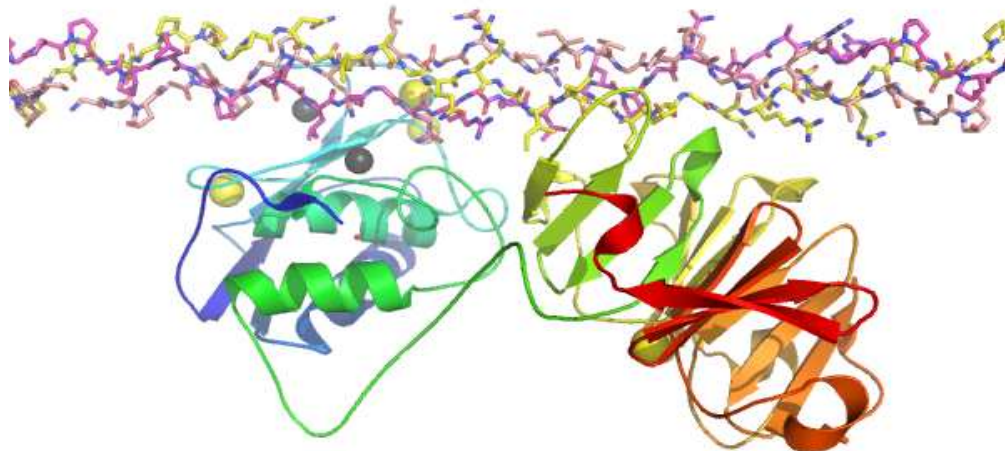
# Proteázok: specializáció



Molekuláris felismerés

- Emésztés: széles specificitás
- Véralvadás és immunrendszer kaszkádjai: szűk specificitás

•Kollagén láncok fellazítása a hidrolízis előtt:  
mátrix metalloproteinázok



Forrás: [tollefsen.wustl.edu/coagulation](http://tollefsen.wustl.edu/coagulation)

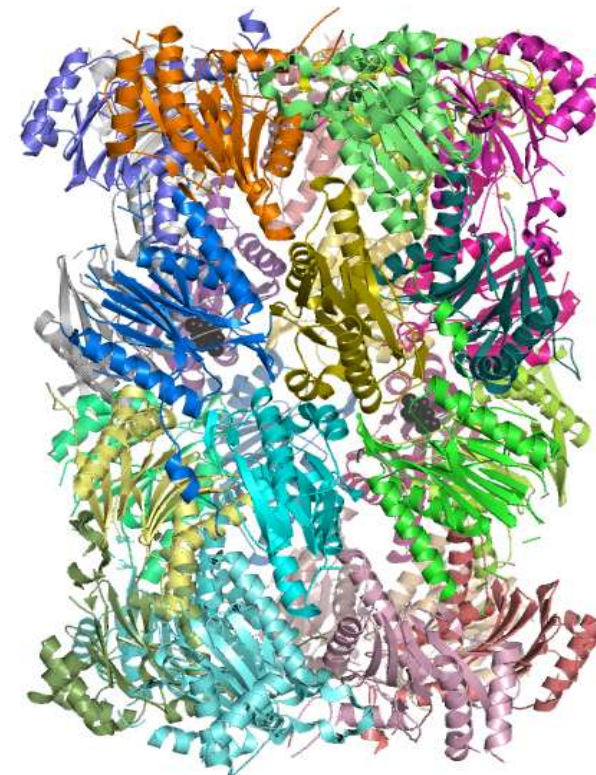
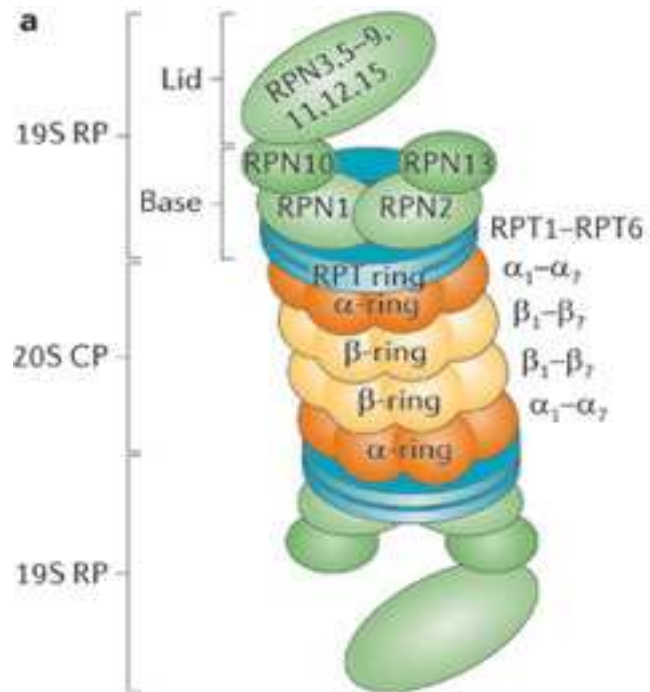
Mátrix metalloproteináz I – kollagén komplex  
Manka SW et al. PNAS **109**:12461 (2012)

# Proteázok: specializáció



Önszerveződő rendszerek

- Hibás fehérjeláncok lebontása: ubikvitinnel jelölt fehérjék felismerése, letékerése, lebontása (proteaszóma)



26S proteaszóma

Allan M. et al Nature Rev Mol Cell Biol  
12:605 (2011)

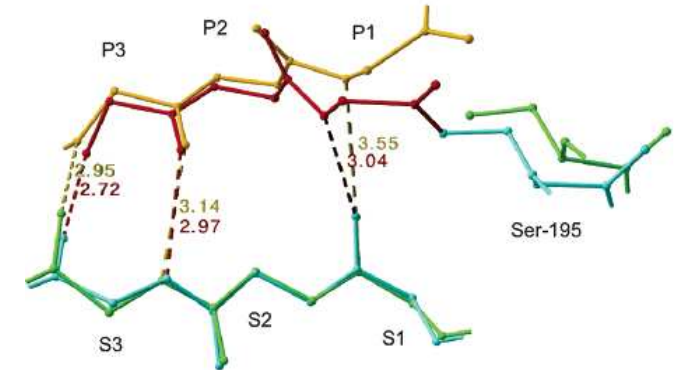
Katalitikus régió (20S), kismolekulás inhibitorral  
Groll M. et al J Am Chem Soc 130:14981 (2008)

# Példák

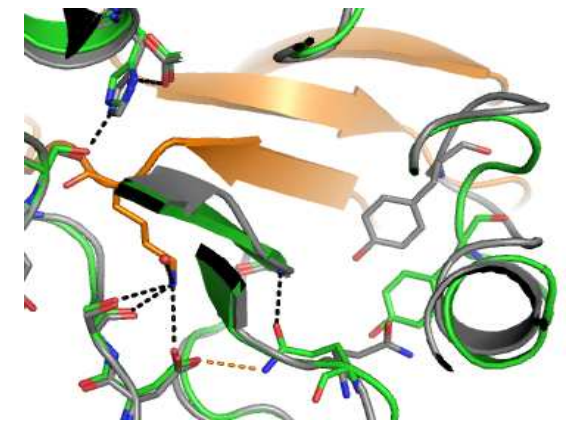


## Szerin proteázok

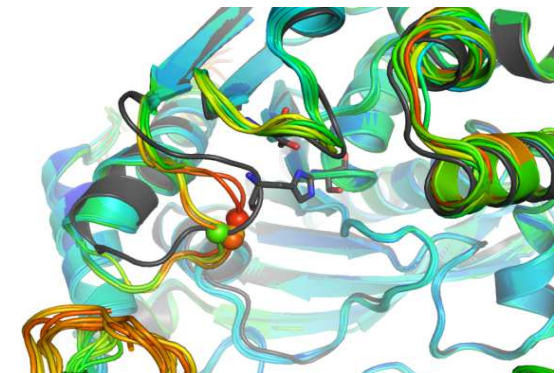
1. Katalitikus mechanizmus vizsgálata a kimotripszin családban



2. Specifikus kötődés molekuláris háttere: MASP-1 és MASP-2 és kanonikus inhibitoraik komplexei

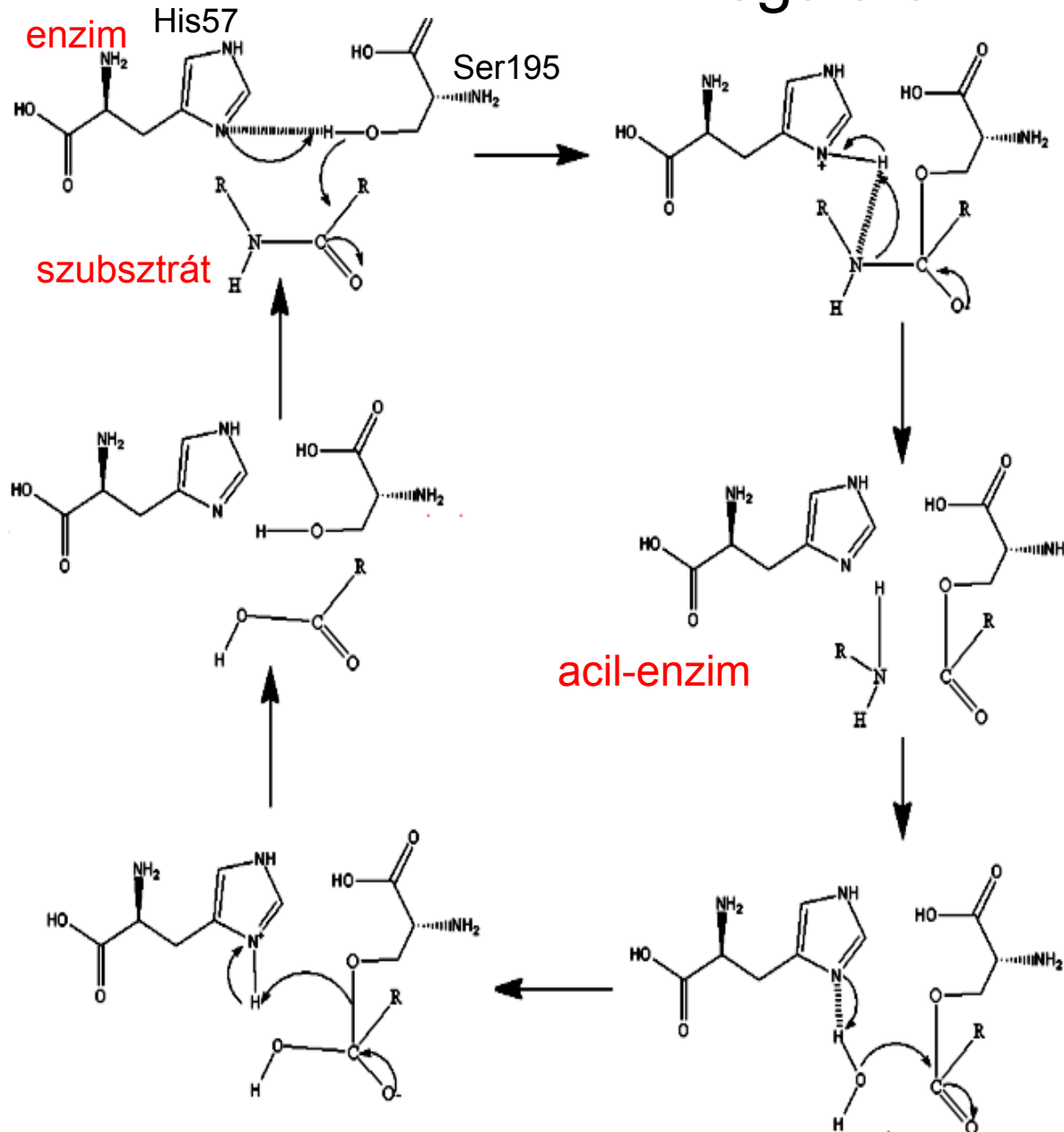


3. Szubsztrát méretszelekció oligopeptidázokban: dinamikus mozgások vagy önszerveződés



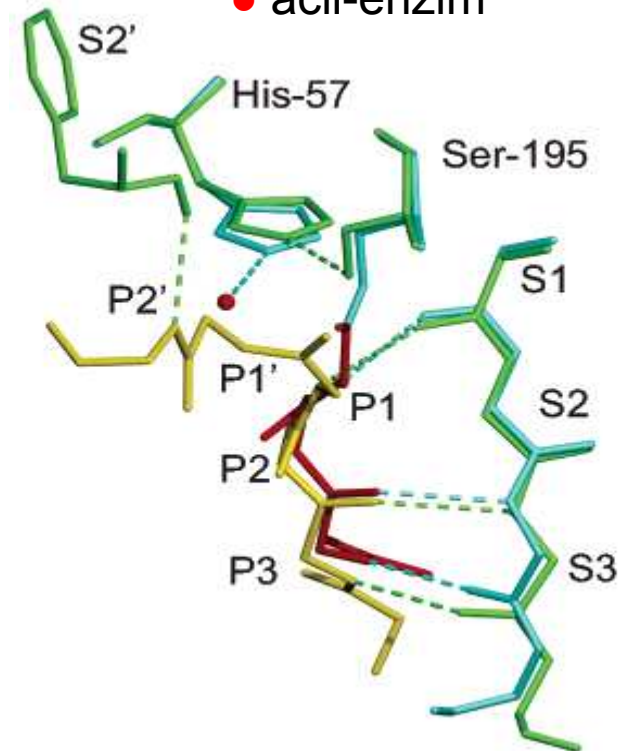


# 1. Szerin proteázok katalitikus mechanizmusának vizsgálata



A szerin proteázok katalitikus ciklusának állomásai atomi felbontású szerkezetekkel

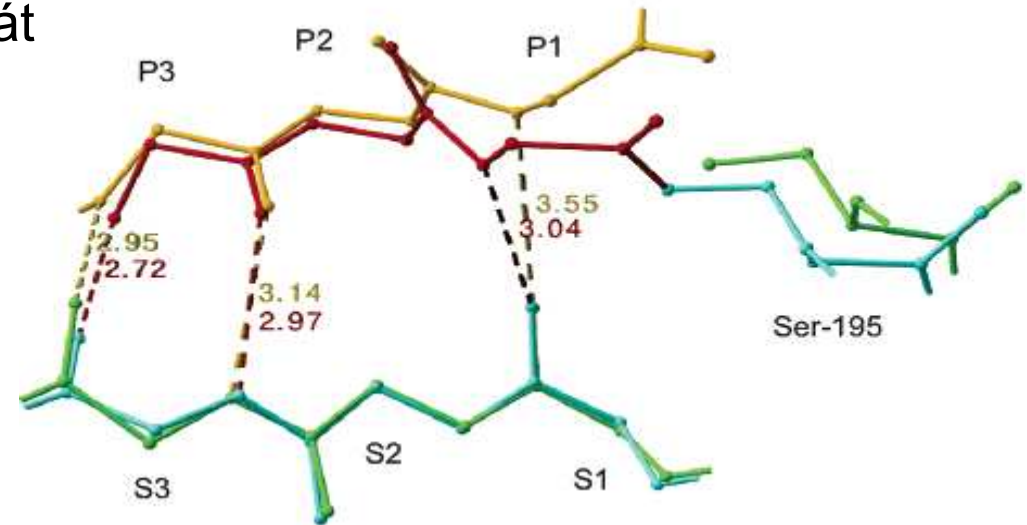
- ● enzim/inhibitor komplex
- acil-enzim



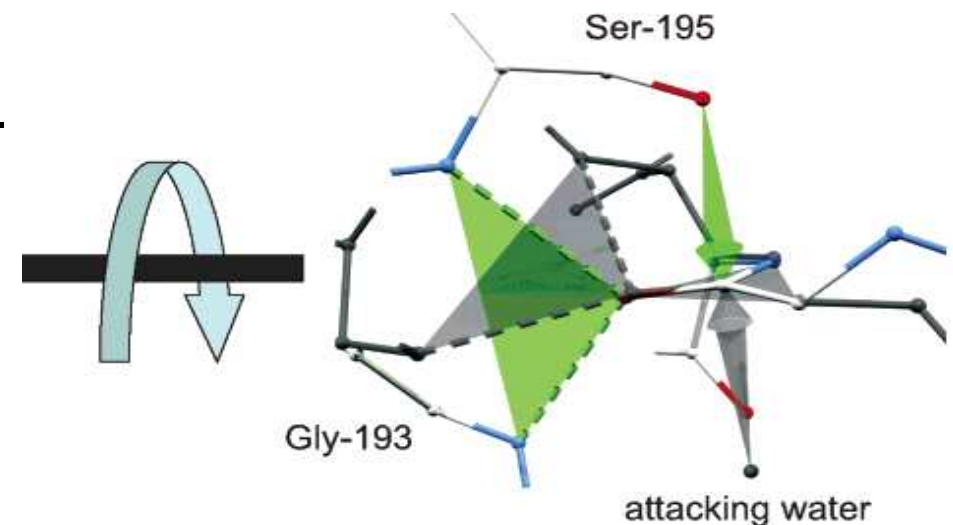
# 1. Szerin proteázok katalitikus mechanizmusának vizsgálata



- Az acil-enzimet rövidebb enzim-szubsztrát hidrogénkötések stabilizálják



- Mindkét kémiai reakcióban a merőlegesen helyezkedik el a támadó csoport az amid-ill. észtercsoport síkjára



## 2. MASP-1 és MASP-2 komplexek: a specificitás molekuláris háttere

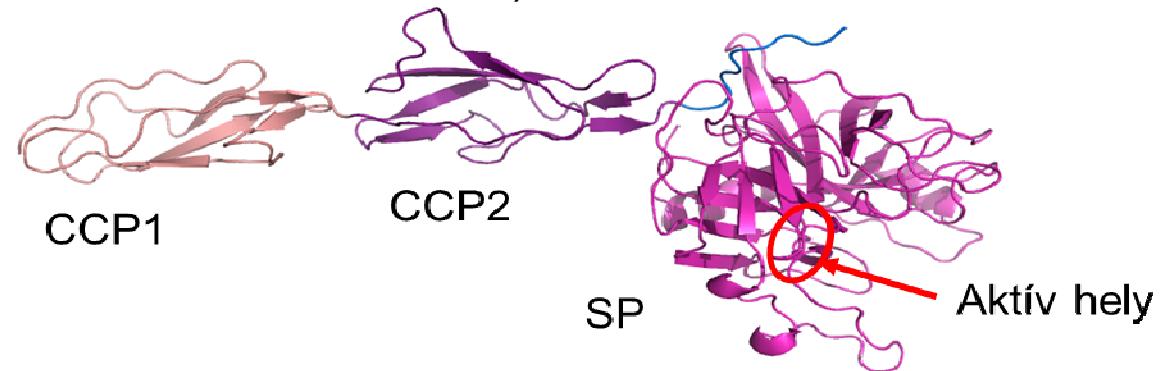


A komplement a veleszületett immunitás fontos eleme.

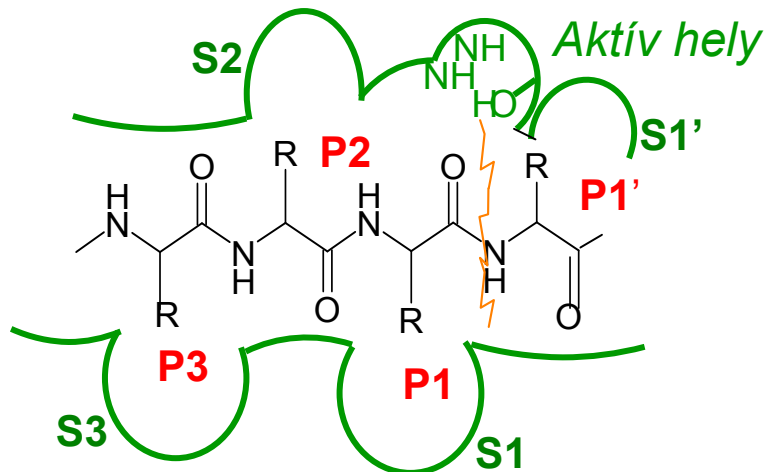
Enzimkaszád rendszer a vérplazmában.

Aktiválódásának kezdeti lépései a MASP-ok aktiválódása (lektin út):

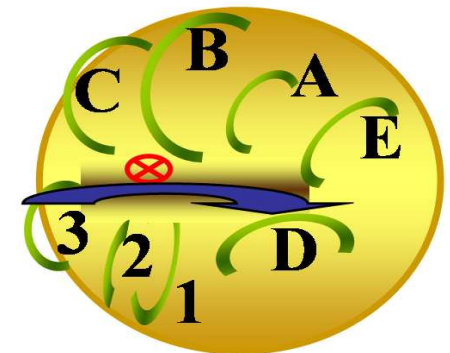
- Felismerő molekula (pl. lektin) kötődése az idegen szénhidrát-struktúrákhoz
- MASP-ok autoaktiválódnak (egyláncú proenzim forma hasítása)
- Szelektíven hasítják és aktiválják a kaszkád következő tagját



A szubsztrátkötő zsebek elnevezése:



A szubsztrátkötő árkot  
körülvevő hurokrégiók:



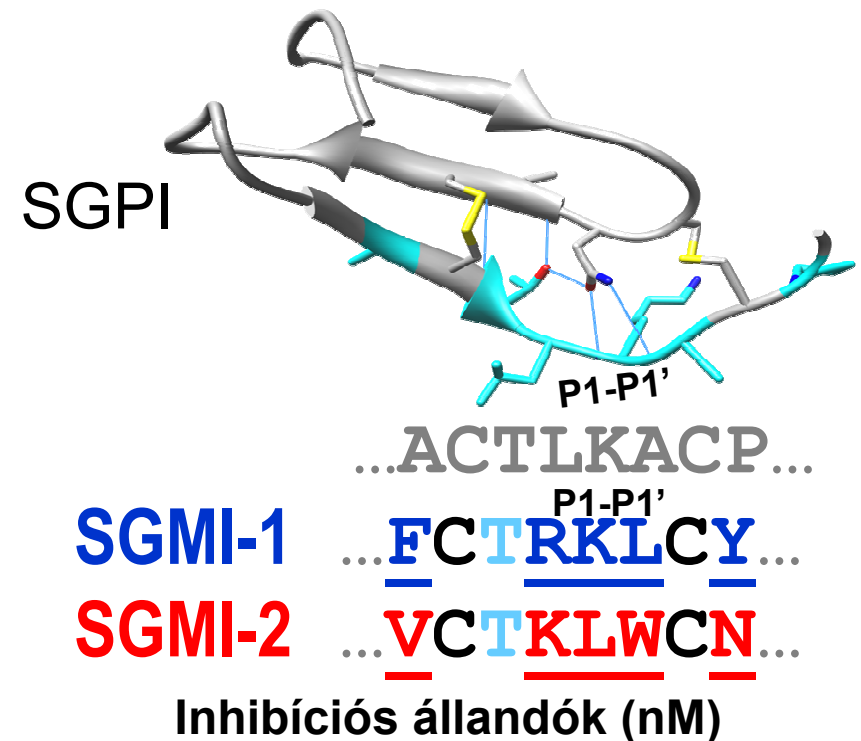
## 2. MASP-1 és MASP-2 komplexek: inhibitorok



### SGMI-1 és SGMI-2 inhibitorok kifejlesztése:

Cél: a MASP-1 és MASP-2 egymástól független szerepének tisztázása

- Kanonikus szerin proteáz inhibitor vázon
- *In vitro* evolúciós (Fág bemutatás) technikával kifejlesztett inhibitorok



	MASP-1	MASP-2
<b>SGMI-1</b>	<b>7</b>	<b>58000</b>
<b>SGMI-2</b>	<b>n.m.</b>	<b>6</b>

## 2. MASP-1 és MASP-2 komplexek: proteázok



### MASP-2

- A szubsztrátkötő árok szűk
- Szűk specificitás

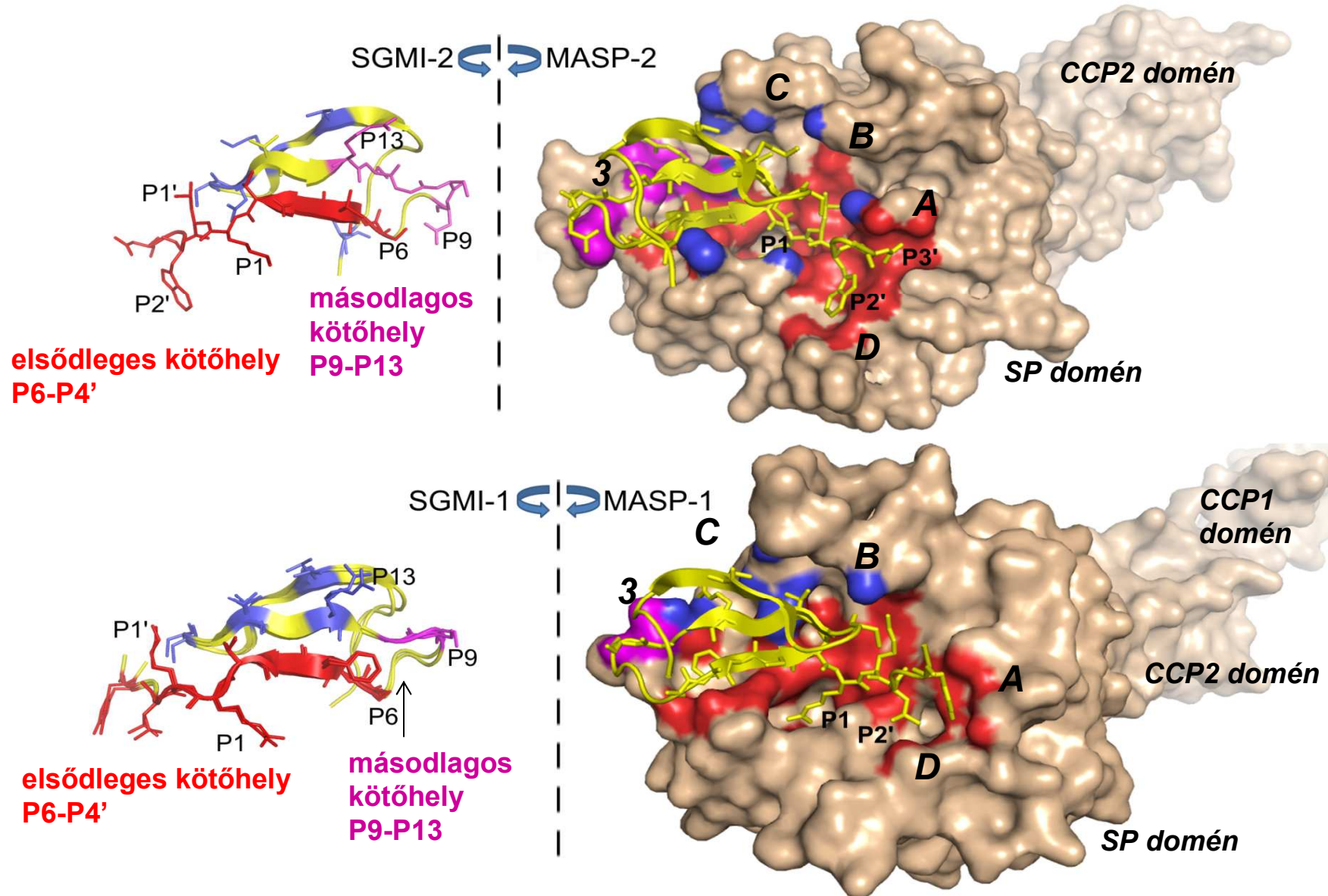
Szubsztrát/inhibitor	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
C2	S	L	G	R	K	I	Q
C4	G	L	Q	R	A	L	E
C1-inhibitor	S	V	A	R	T	L	L
SFMI-2	Y	C	S	R	S	Y	P
SGMI-2	V	C	T	K	L	W	C

### MASP-1

- A szubsztrátkötő árok szélesebb
- Szélesebb specificitás

Szubsztrát/inhibitor	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
MASP-1	L	M	A	R	I	F	N
C2	S	L	G	R	K	I	Q
C1-inhibitor	S	V	A	R	T	L	L
Fibrinogén	F	S	A	R	G	H	R
Antitrombin III	I	A	G	R	S	L	N
F XIII	V	V	P	R	G	V	N
SFMI-1	I	C	S	R	S	L	P
SGMI-1	F	C	T	R	K	L	C

## 2. MASP-1 és MASP-2 komplexek: kiterjedt kölcsönható régió

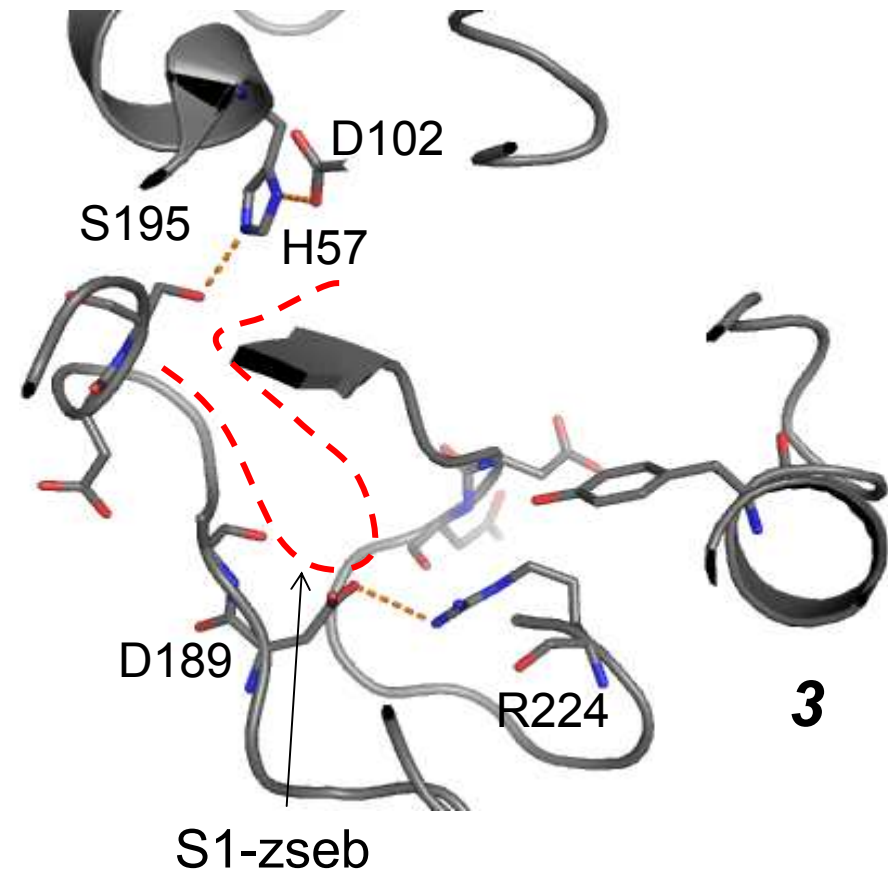
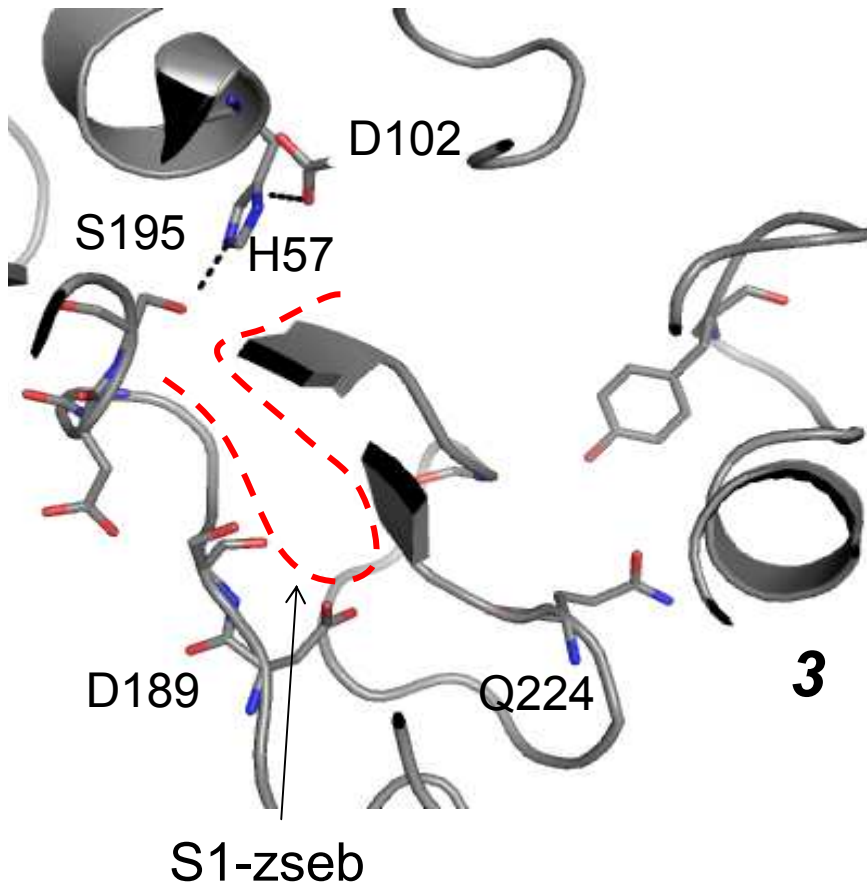


## 2. MASP-1 és MASP-2 komplexek: az S1 zseb átrendeződése



Komplexátatlan MASP-2 •

Komplexátatlan MASP-1 •

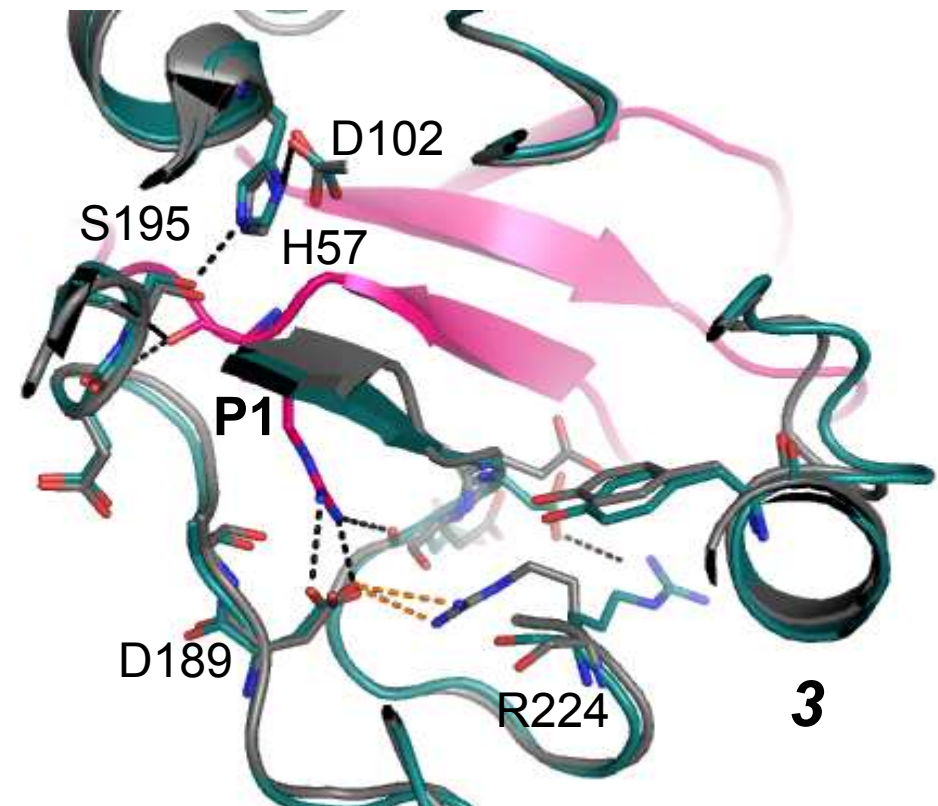
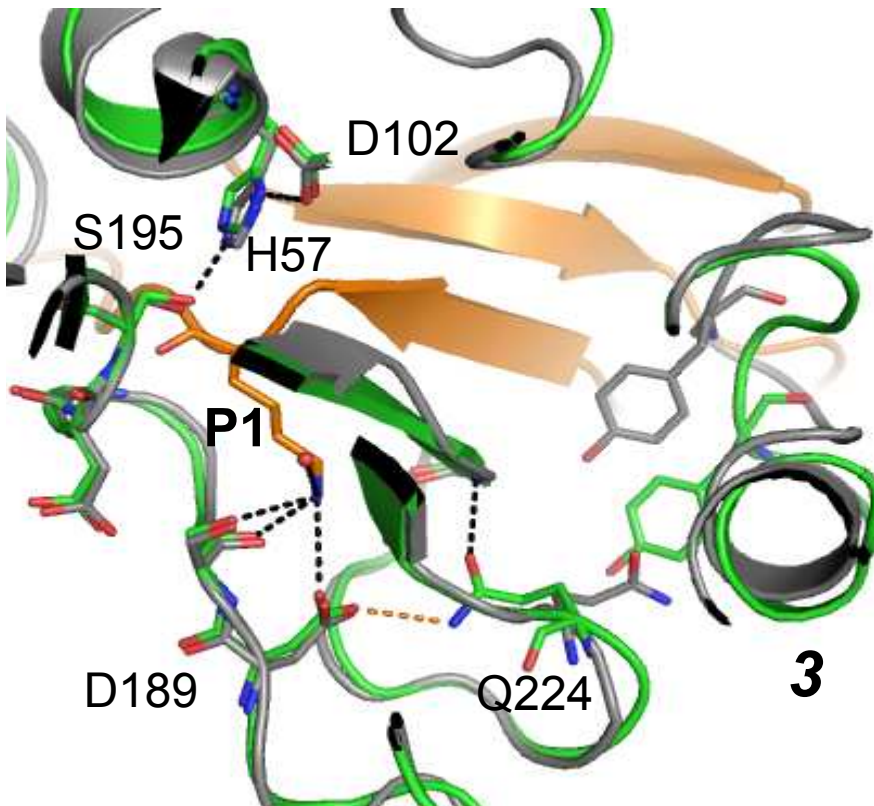


## 2. MASP-1 és MASP-2 komplexek: az S1 zseb átrendeződése



Komplexátlan MASP-2 ●  
MASP-2.SGMI-2 ● ●

Komplexátlan MASP-1 ●  
MASP-1.SGMI-1 ● ●



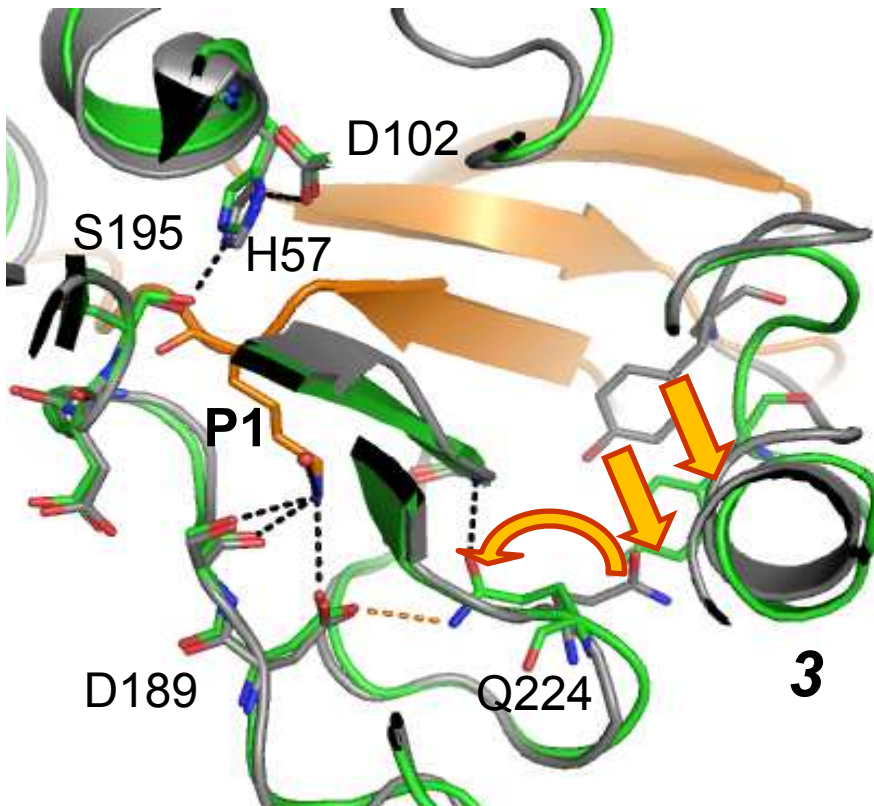


## 2. MASP-1 és MASP-2 komplexek: indukált konformációváltozás

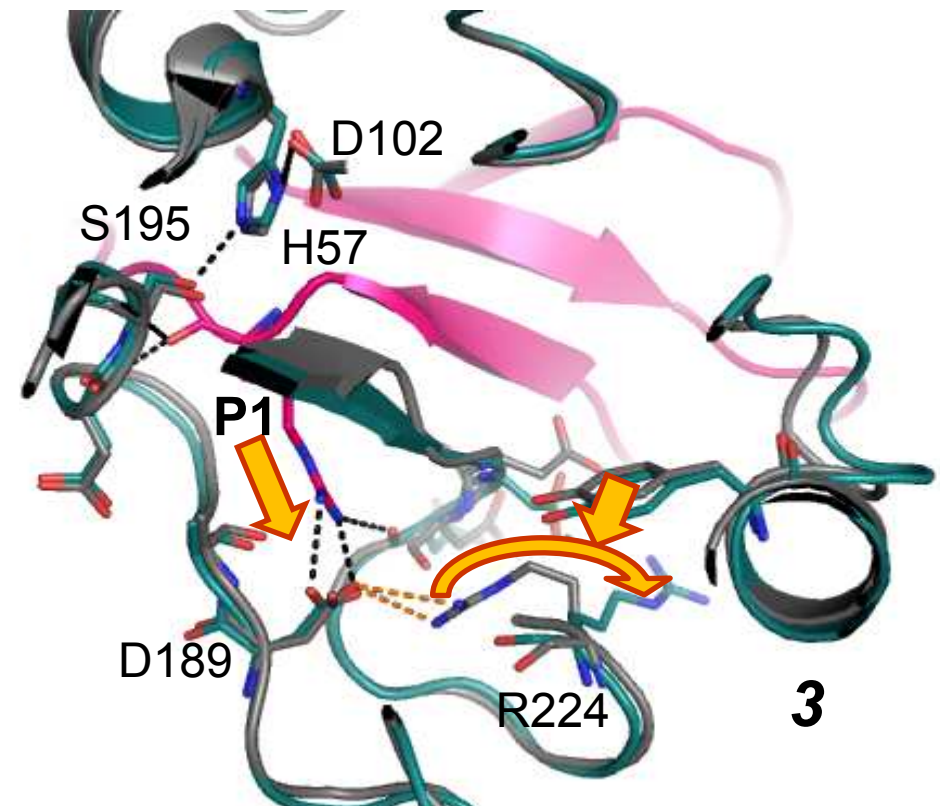


Komplexátlatlan MASP-2 ●  
MASP-2.SGMI-2 ● ●

Komplexátlatlan MASP-1 ●  
MASP-1.SGMI-1 ● ●



A 3 hurok eltolódása >>  
Q224 befordulása  
P1 Arg és Lys kötődése is kedvező



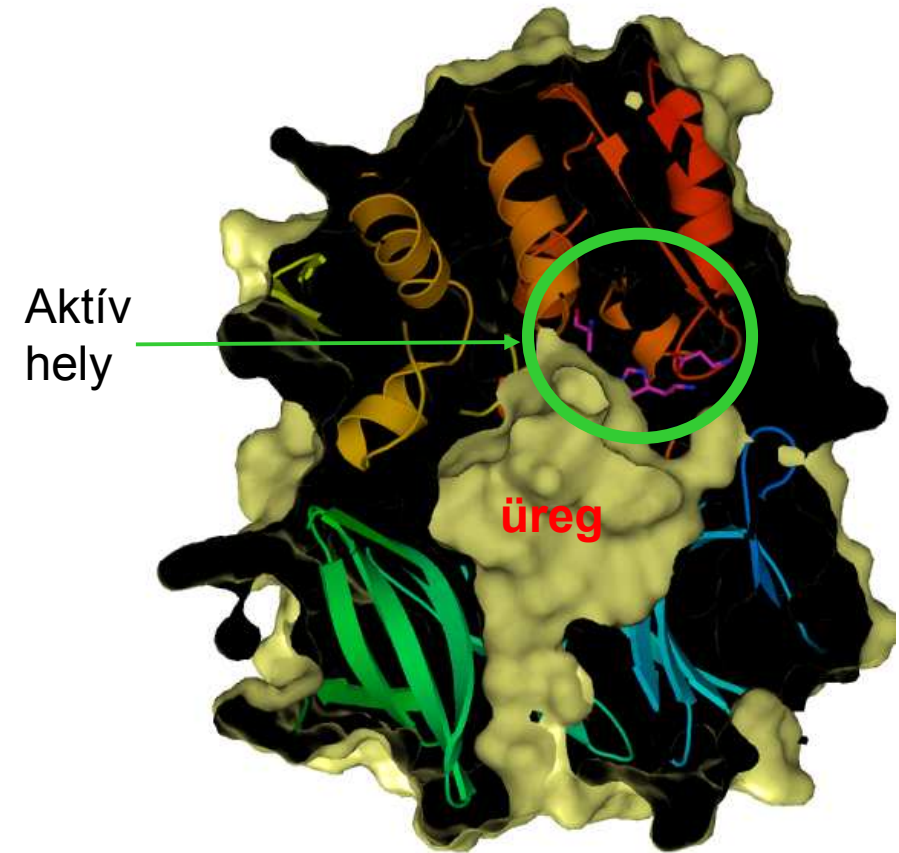
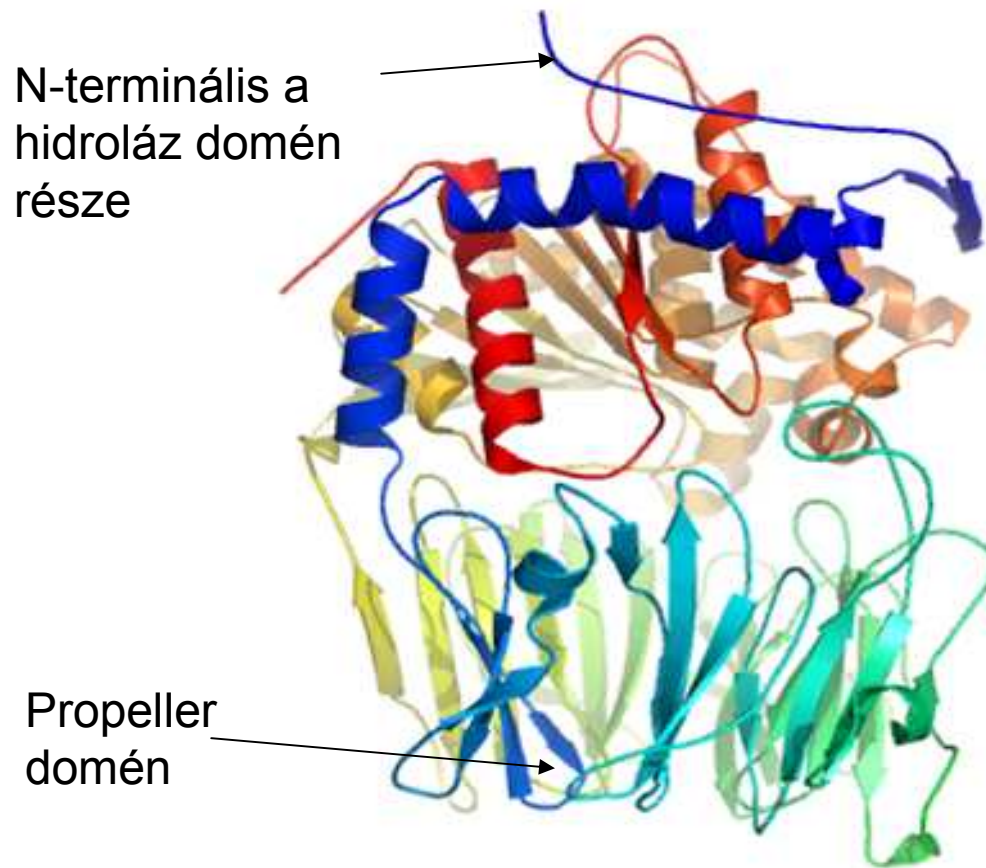
A P1 aminosav és R224 verseng  
a sóhídért >> R224 kifordulása  
P1 Lys kötődése kedvezőtlen

### 3. Szubsztrát méretszelekció oligopeptidázokban



#### A prolil oligopeptidáz család

- prolil oligopeptidáz, dipeptidil peptidáz IV, oligopeptidáz B, acilaminoacil peptidáz

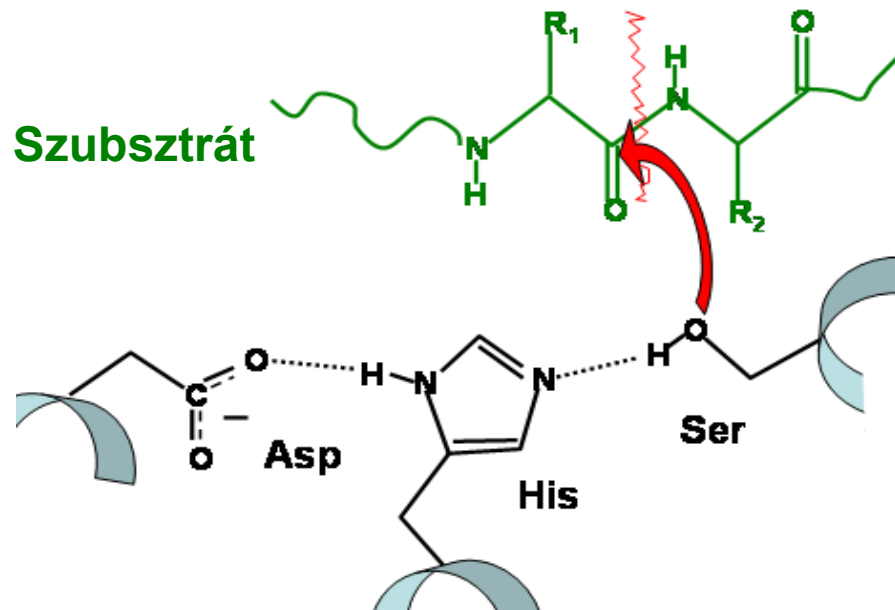


Metszeti kép

# 3. Az oligopeptidázok kettős funkciója

## Katalízis:

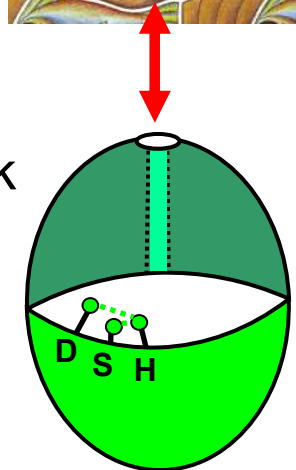
- szerin proteázok



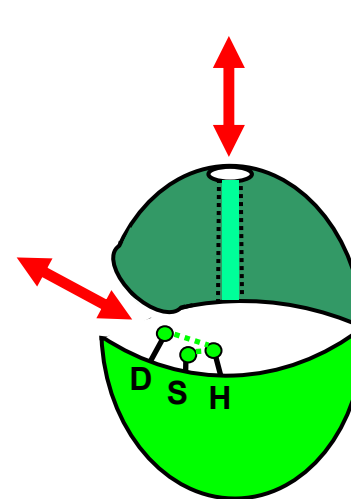
## Méretszelektivitás:

- Maximum kb. 30 aminosavas oligopeptidek hidrolízise

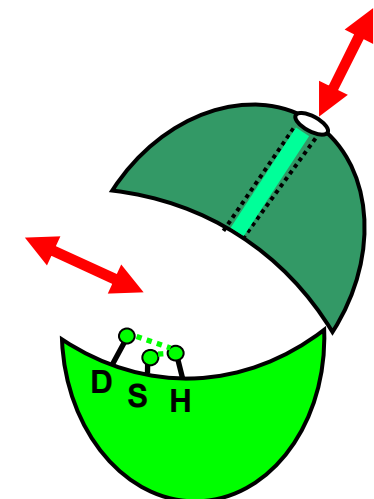
Fülöp V et al. Cell  
94:161 (1998)



## Aktív-hely megközelíthetőség?



Rasmussen et al. Nat.  
Struct.Biol. 10:19 (2003)



Shan et al. PNAS 102:  
3599 (2005)

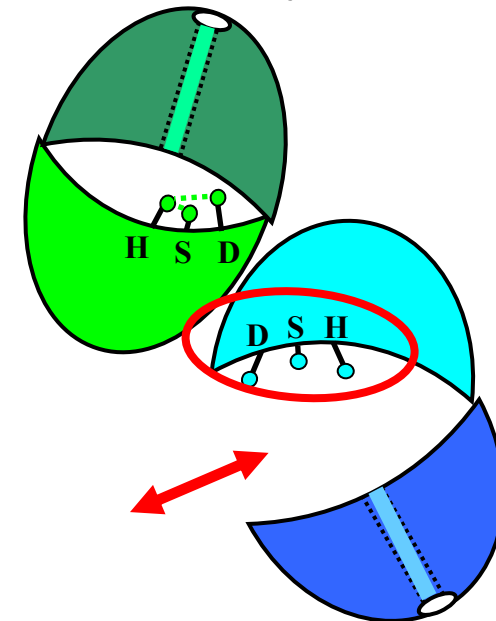
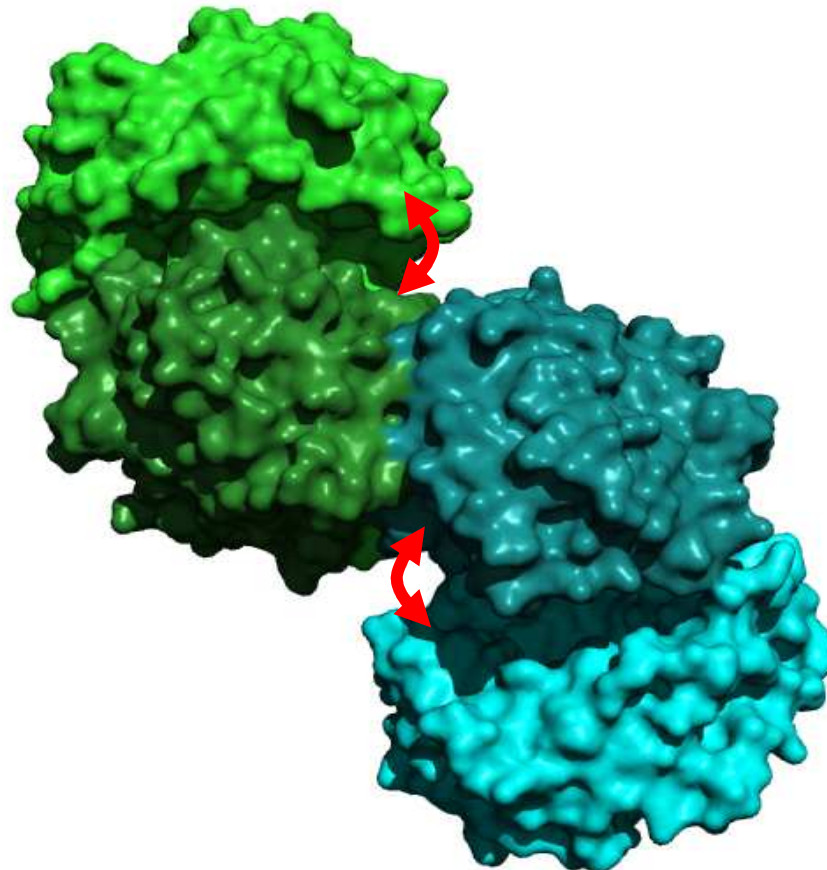
### 3. Méretszelekció: doménelmozdulás

A katalitikus és szelektivitási funkció szétválik



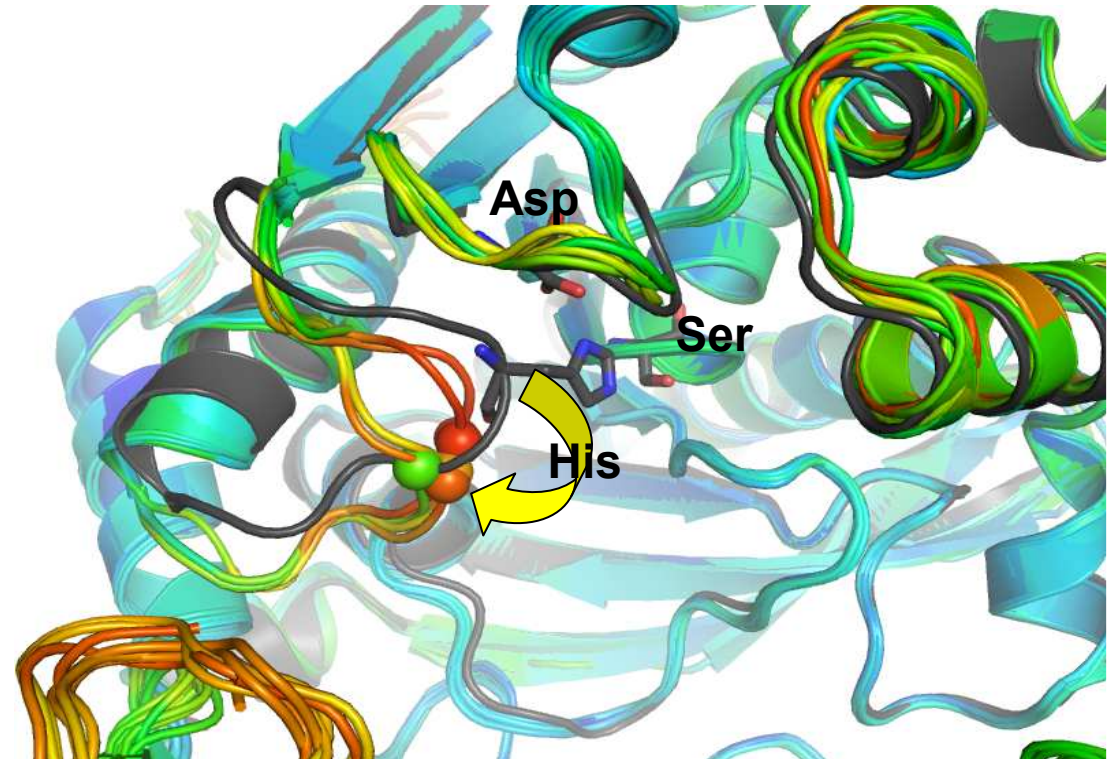
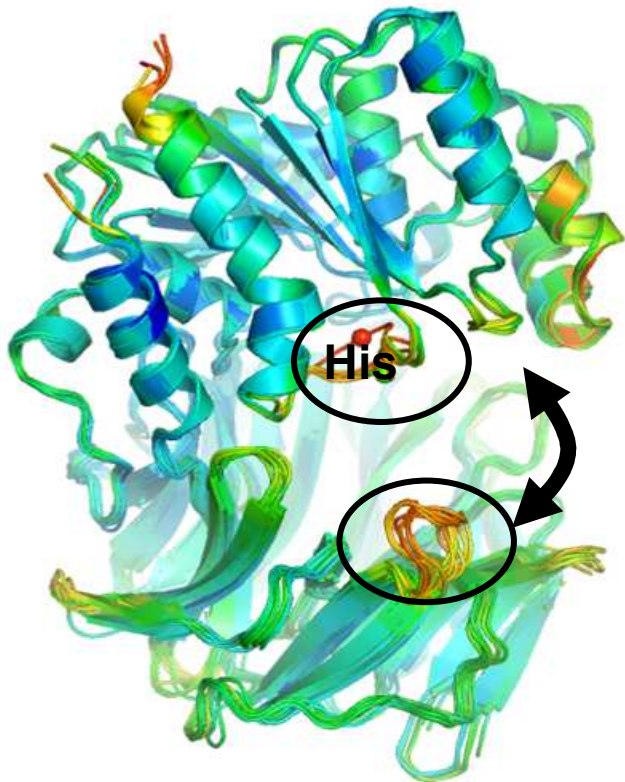
#### *Aeropyrum pernix* acilaminoacil peptidáz

Dimer enzim, a monomerek egymástól függetlenül lehetnek oldalt nyitottak vagy csukottak

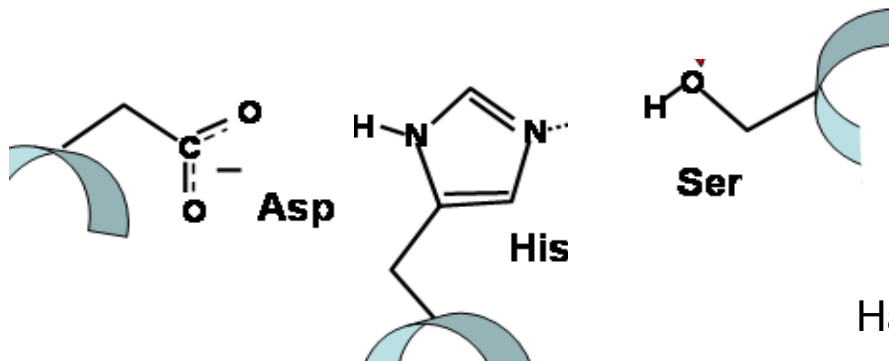


A nyitott forma inaktív

### 3. Méretszelekció: doménelmozdulás A katalitikus és szelektivitási funkció szétválik



A His-hurok kinyíláskor destabilizálódik.

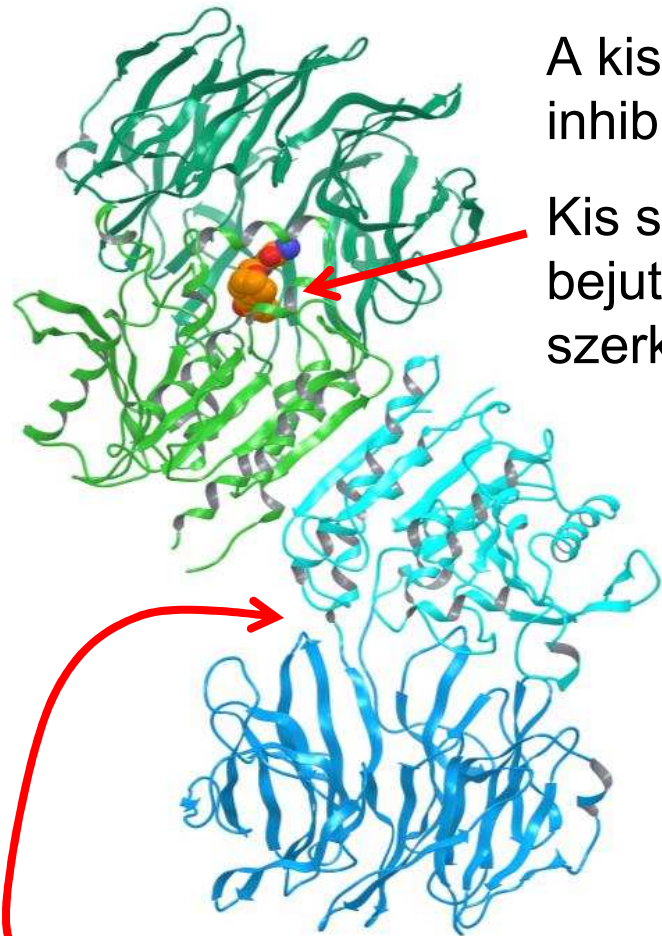


mozgékony  
merev  
csukott szerkezet



### 3. Méretszelekció: doménelmozdulás

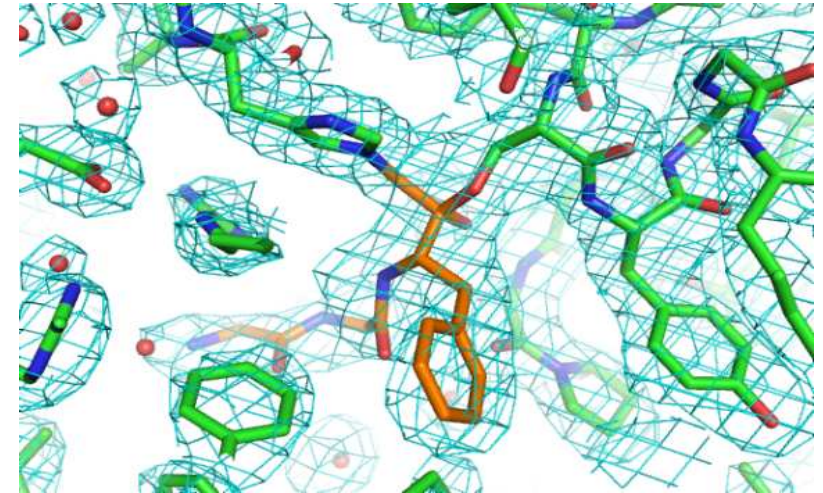
#### A dezaktiváció vizsgálata kovalens inhibitorral



A kis méretű inhibitor megkötődött

Kis szubsztrátok bejutnak a zárt szerkezetbe

Az aktív helyet a szubsztrátkötés nem, csak a propellerrel való kölcsönhatás tudja helyreállítani



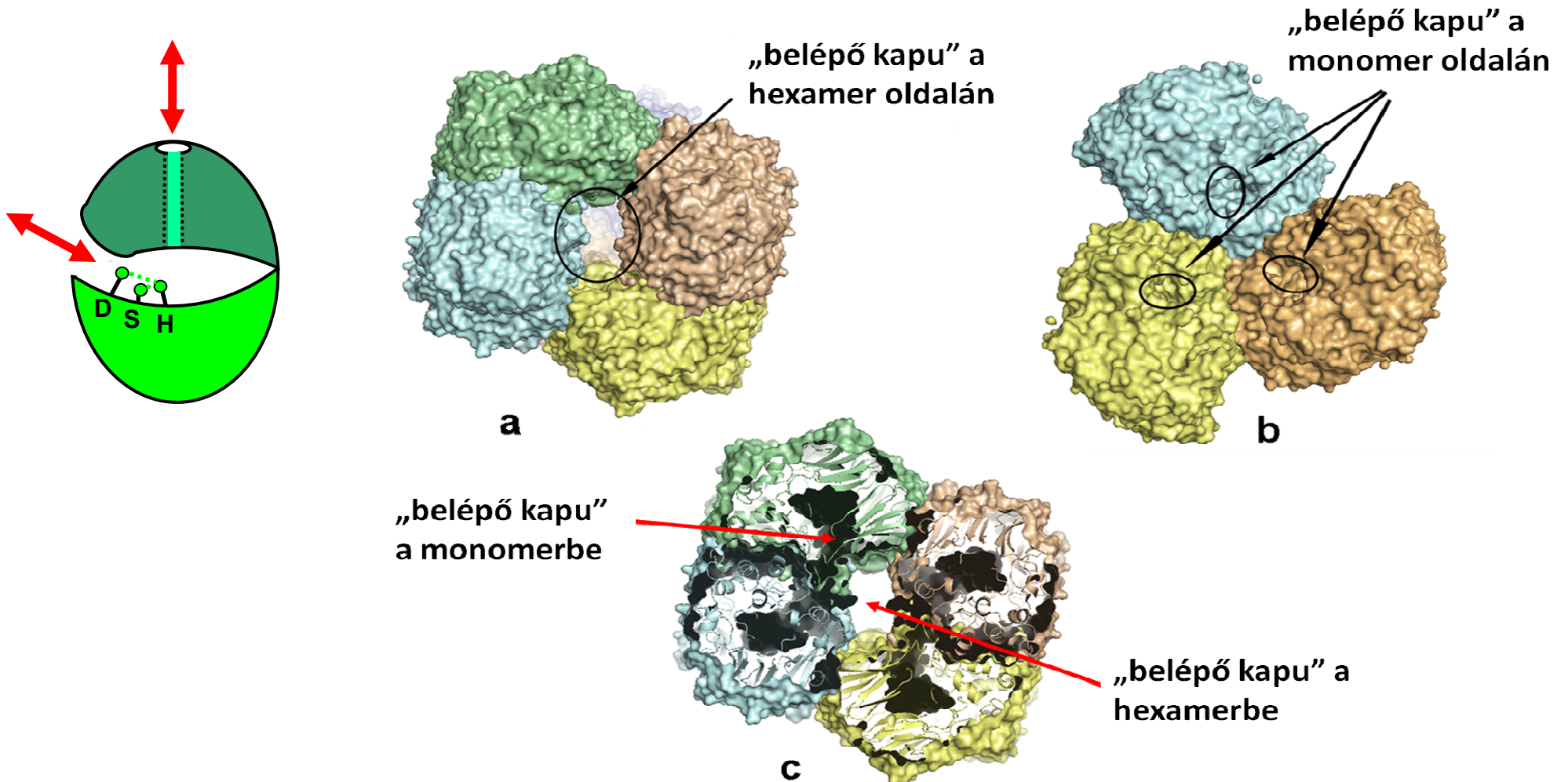
**Klórmetil-ke-ton inhibitor** kötődéséhez a Ser és a His közelsége szükséges

### 3. Méretszelekció: önszerveződés



#### Pyrococcus horikoshii acilaminoacil peptidáz

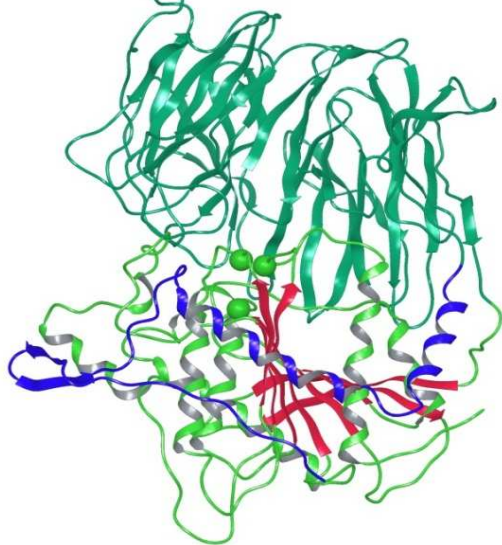
Hexamer enzim, merev szerkezet állandó csatorna- és üregrendszerrel



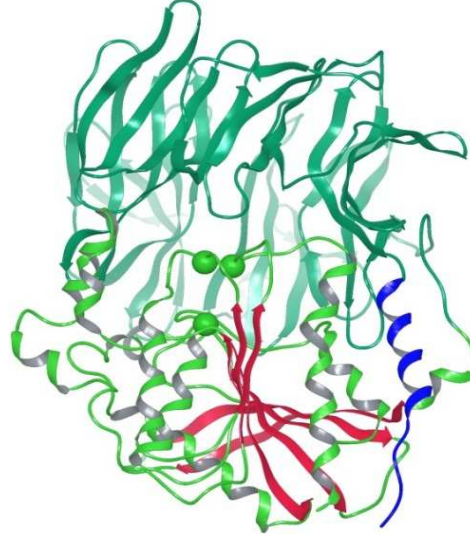
### 3. Doménelmozdulás vagy önszerveződés? Mi a multimerizáció oka?



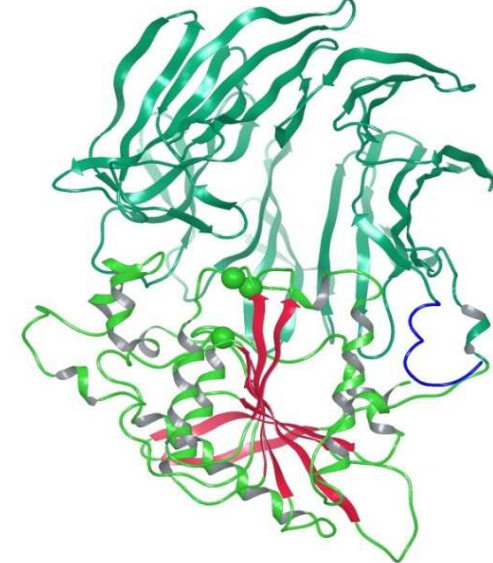
Prolil-oligopeptidáz  
**MONOMER**



*A.p.* acilaminoacil peptidáz  
**DIMER**



*P.h.* acilaminoacil peptidáz  
**HEXAMER**



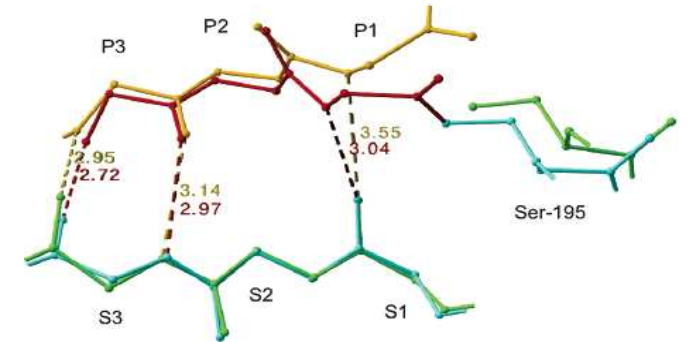
- **Félig nyitott szerkezet stabilizálása?**  
Molekuladinamikai szimuláció: nem
- **Aggregáció elleni védelem? WALTZ** (Nat. Methods 7:237 (2010))  
A központi  $\beta$ -redő széle amiloidképzésre hajlamos.  
Védelme:
  - Monomerek: N-terminális
  - Multimerek: a szomszédos molekula



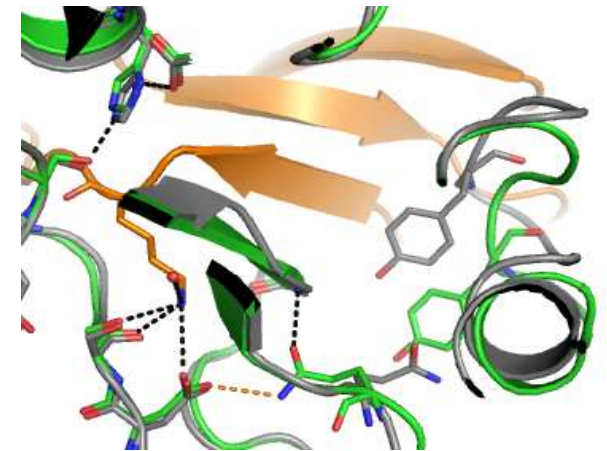
# Összefoglalás



1. Megfigyelhető a szubsztrát és a katalitikus aminosavak helyzetének finomhangolása, ami a hatékony katalízist biztosítja.

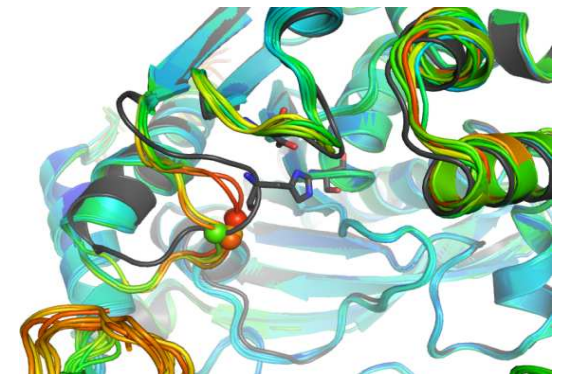


2. A specifikus molekuláris felismerés még rokon szerkezeteknél is sokszínű lehet (indukált konformáció-változások).



3. A szubsztrát méretszelekciója oligopeptidázokban dinamikus mozgások vagy önszerveződés révén valósul meg.

Az önszerveződés az amiloidképzés ellen nyújthat védelmet.



# Közreműködők



## **Tripszin katalitikus mechanizmusa**

*ELTE Biokémiai Tanszék*

Gráf László  
Fodor Krisztián  
Szilágyi László

## **MASP-inhibitor komplexek**

*ELTE Biokémiai Tanszék*

Pál Gábor  
Héja Dávid  
Patthy András  
Szenthe Borbála

*MTA Enzimológiai Intézet*

Závodszy Péter  
Gál Péter  
Dobó József  
Kékesi Katalin  
Kocsis Andrea  
Szilágyi Katalin

## **Oligopeptidázok**

*MTA Enzimológiai Intézet*

Polgár László  
Szeltner Zoltán  
Domokos Klarissza  
Szamosi Ilona

## **Szerkezetvizsgálat**

*ELTE Kémiai Intézet*

Náray-Szabó Gábor  
Harmat Veronika  
Karancsiné Menyhárd Dóra  
Kiss-Szemán Anna  
Orgován Zoltán  
Beke-Somfai Tamás

*ELTE Biokémiai Tanszék, EMBL-  
Hamburg*

Fodor Krisztián  
Matthias Wilmanns

*MTA TTK Kémiai Kutatóközpont*  
Palló Anna

*Chalmers Egyetem, Göteborg*

Richard Neutze  
Katona Gergely