

Proteázok a szervezetben barátok vagy ellenségek?

Gál Péter

Természettudományi Kutatóközpont,
Enzimológiai Intézet



Pál Gábor

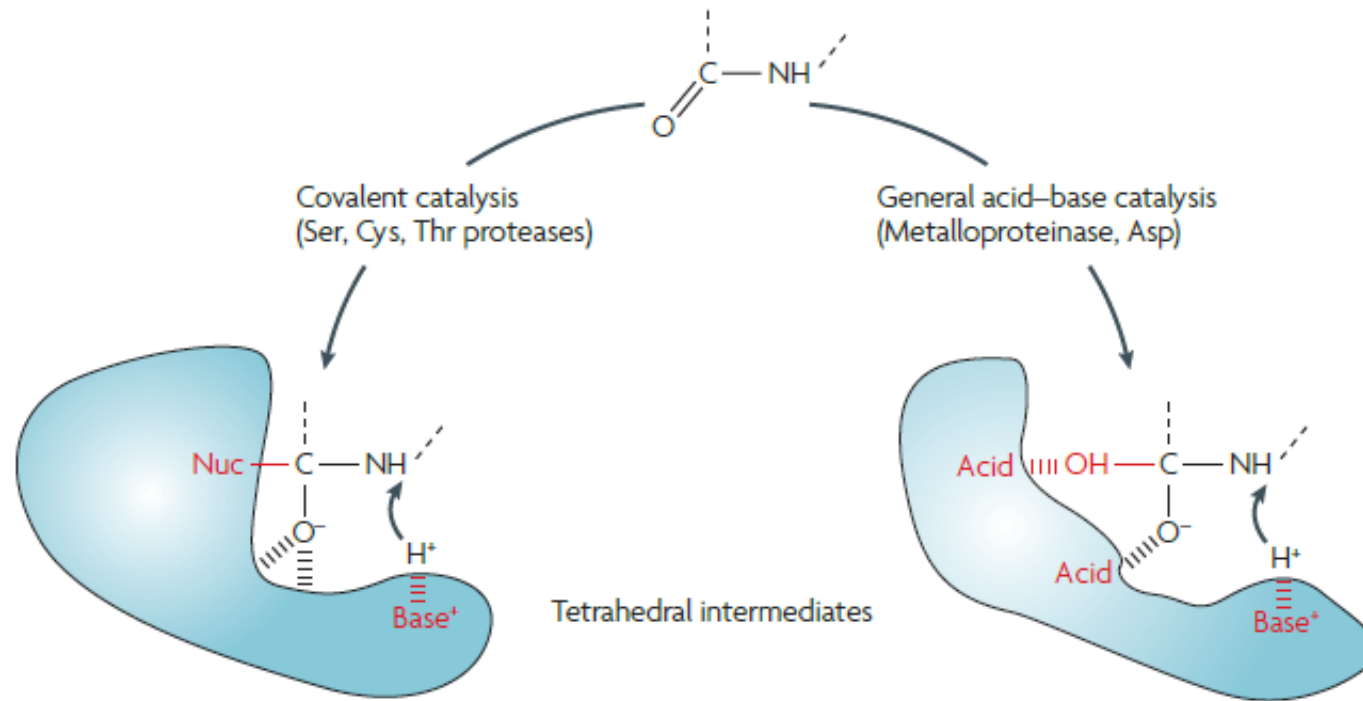
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biokémiai Tanszék

&

EvolVeritas

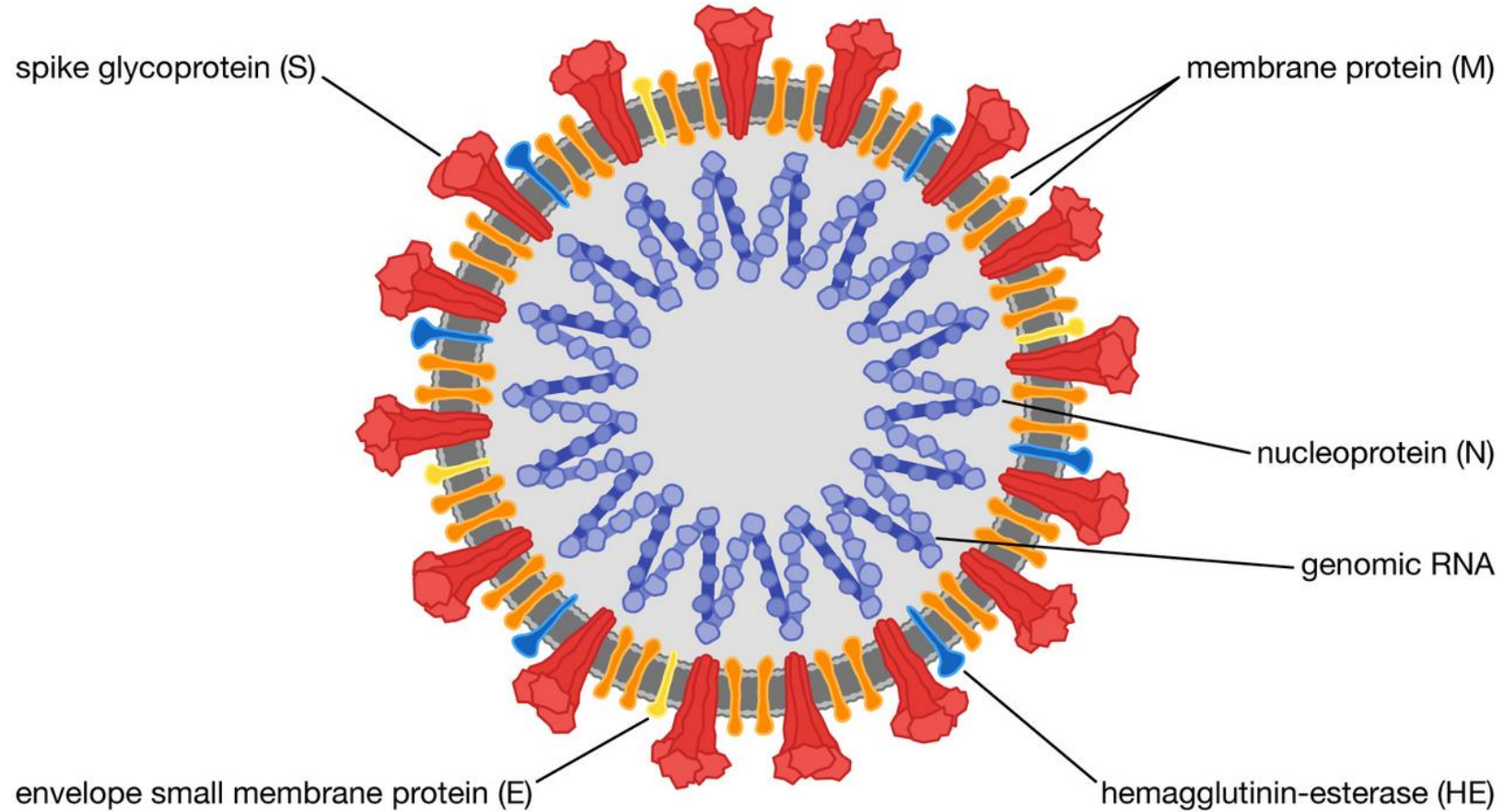


Proteázok az emberi szervezetben

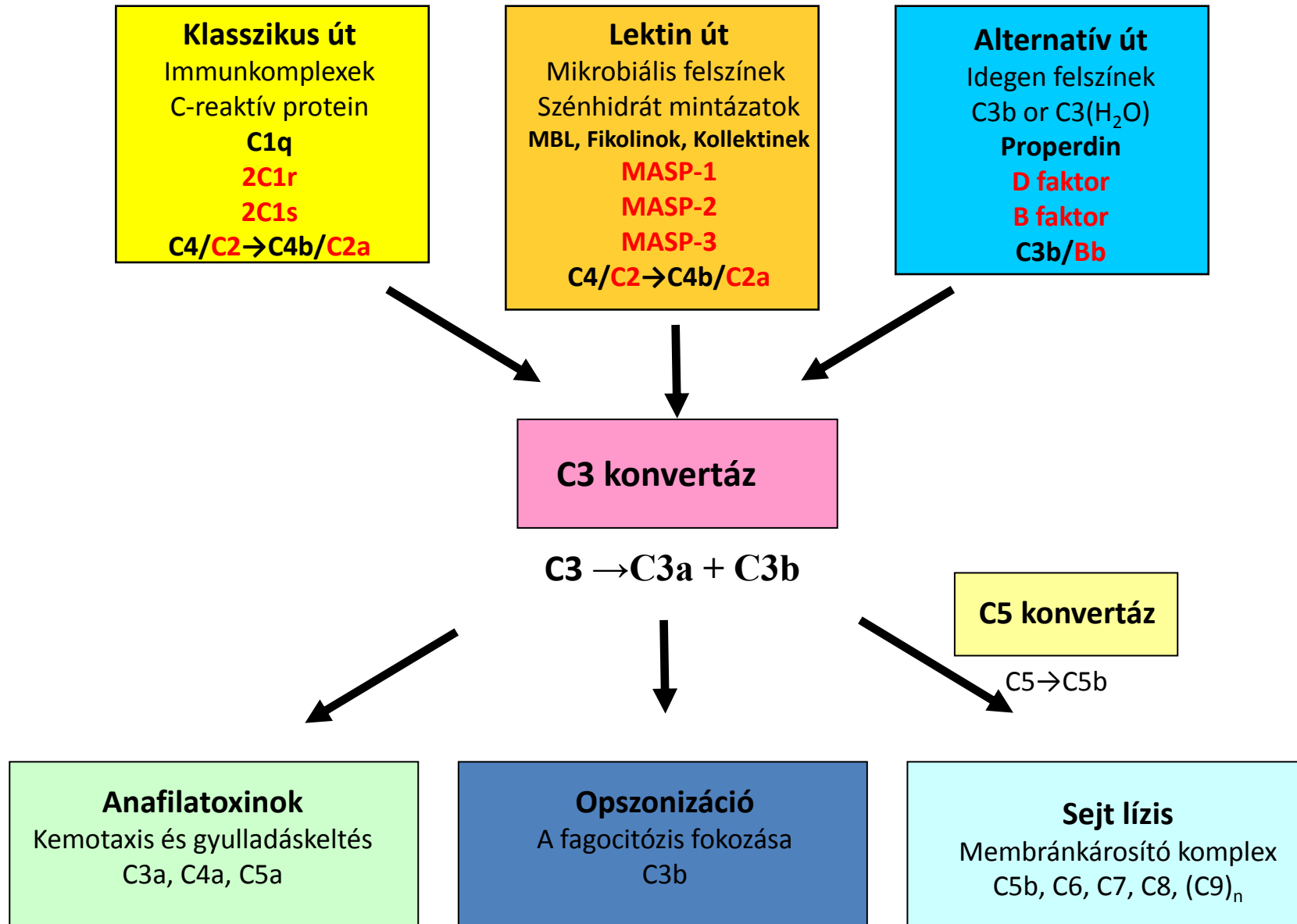


A humán genom több mint 600 proteáz enzimet kódol. A proteázok három legnépesebb osztálya: Metallo (~200), szerin (~180), cisztein (~160). Az egyedfejlődéstől az immunvédekezésig számtalan fiziológiás folyamatban játszanak nélkülözhetetlen szerepet. Szabályozatlan működésük betegségek kialakulásának oka vagy következménye. Fertőzések esetén a patogén-gazda kölcsönhatásban is döntő szerepük van.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

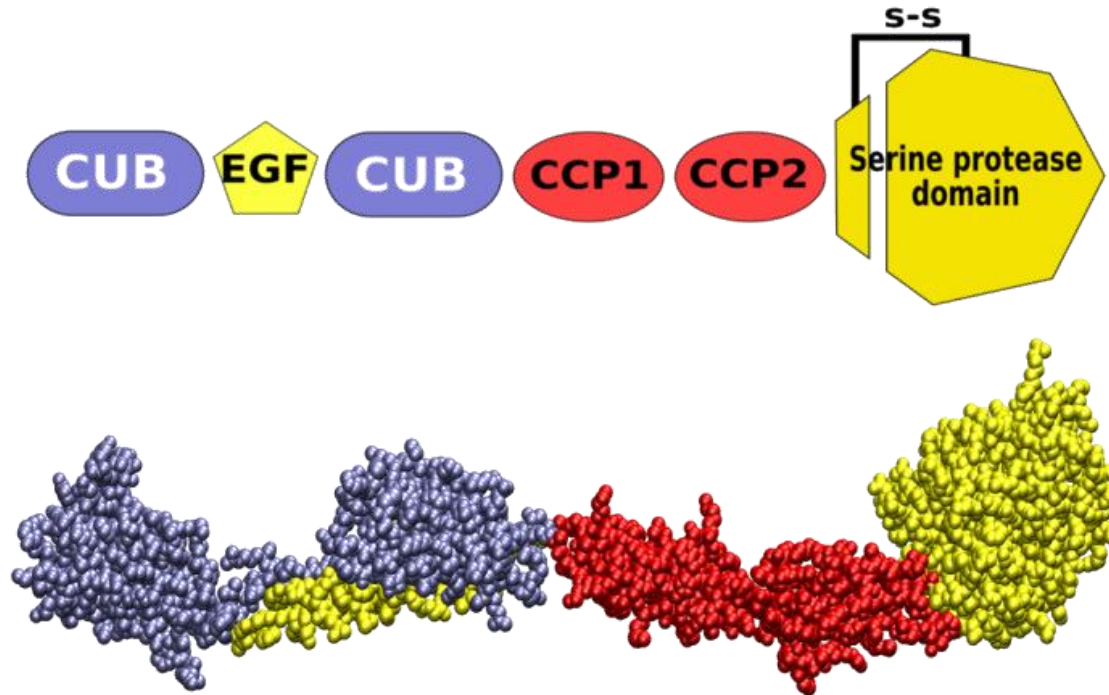


A komplementrendszer



MBL-hez kapcsolódó szerin proteázok:

MASP-1, MASP-2



Hat doménből álló mozaik fehérjék.

A katalitikus szerin proteáz domént megelőzi öt nemkatalitikus domén.

A lektin út aktiválódásában játszanak szerepet.

A lektin út aktiválódása súlyos érkárosodást és trombózist okoz a COVID-19 betegek tüdejében

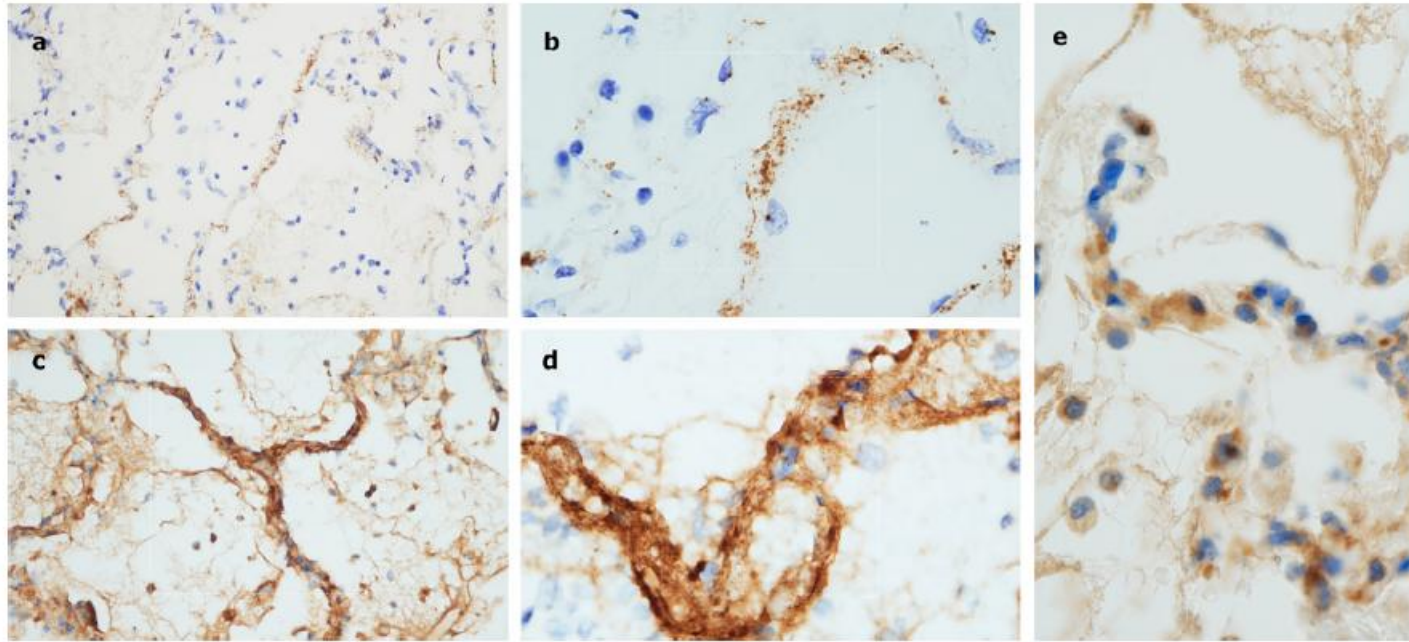


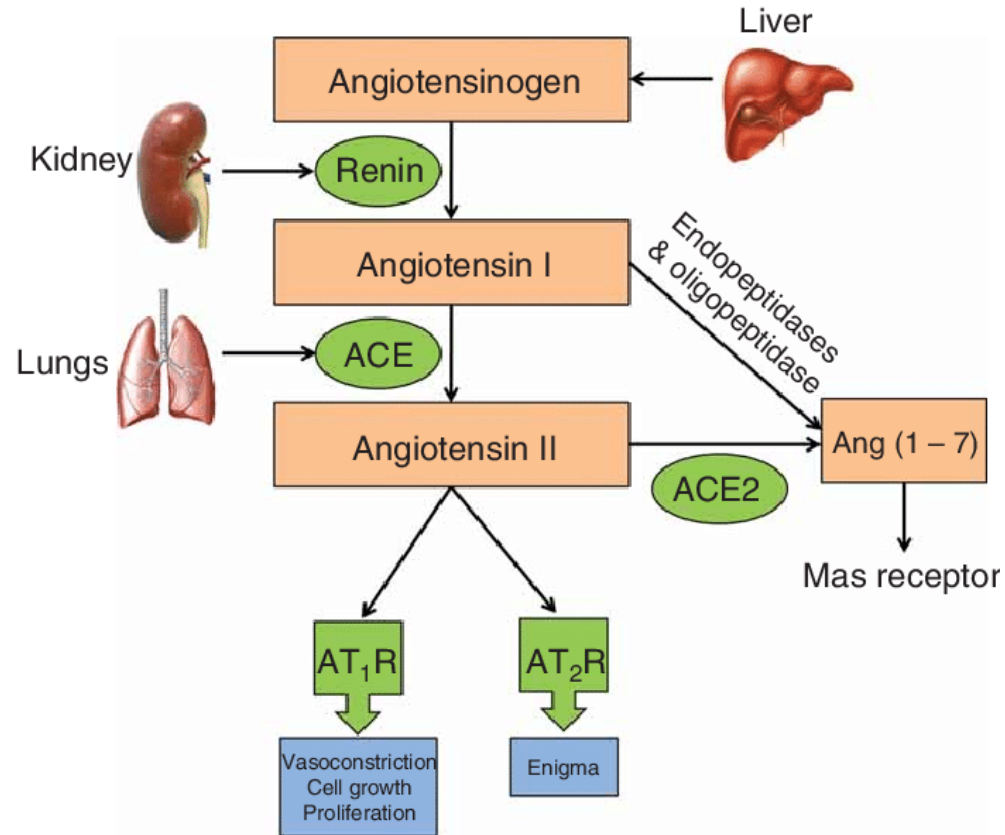
Fig 4. Immunohistochemistry analysis of pulmonary autopsy samples from Case 2. **A,** There was striking deposition of C5b-9 within the microvasculature of the interalveolar septa. (Diaminobenzidine, 200 $\times$). **B,** Higher power magnification again shows localization of C5b-9 within the septa, including C5b-9 deposits in areas of normal appearing lung, suggestive of systemic complement activation. (Diaminobenzidine, 1000 $\times$). **C,** C4d deposition was largely localized to the interalveolar septa in areas of microvascular injury. (Diaminobenzidine 400 $\times$). **D,** A higher power image demonstrates the extensive degree of CD4d deposition within the septa. (Diaminobenzidine, 1000 $\times$). **E,** MASP2 staining showed granular and punctate deposits localized to the interalveolar septa.

A komplementrendszer gátlása terápiás lehetőség koronavírus fertőzés esetén

Translational Significance

A pattern of tissue damage consistent with complement-mediated microvascular injury was noted in the lung and/or skin of 5 individuals with severe COVID-19. Our demonstration of the striking deposition of C5b-9, C4d, and MASP2 in the microvasculature of 2 organ systems is consistent with profound and generalized activation of both alternative and lectin-based pathways. It provides a foundation for further exploration of the pathophysiologic importance of complement in COVID-19, and could suggest targets for specific intervention.

A renin-angiotenzin rendszer

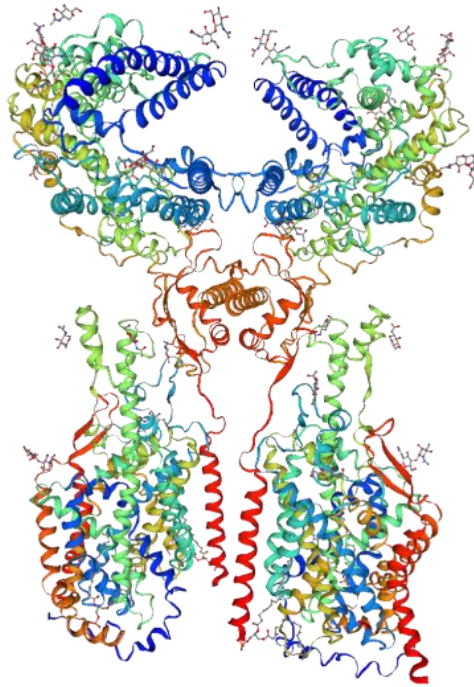


Vérnyomásszabályzás, víz (folyadék) egyensúly fenntartása.

Renin: aszpartát proteáz

Angiotenzin-konvertáló enzimek (ACE és ACE2): metallo proteázok

ACE2: sejtfelszíni receptor a koronavírusok (SARS-CoV és SARS-CoV2) számára

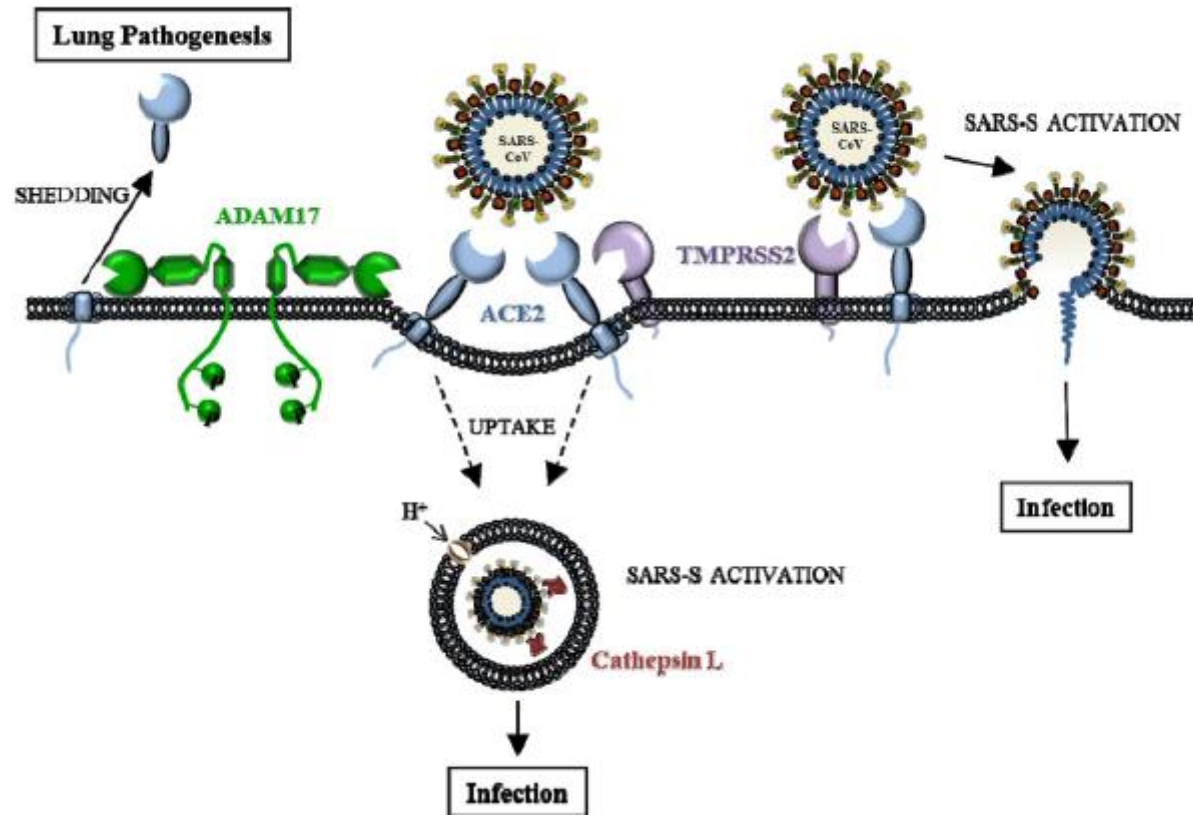


A vírusfertőzés első lépése:

A koronavírus „spike” S-proteinje kötődik a sejtfelszíni ACE2 proteázhoz, amit az S-protein kismértékű konformációváltozása követ.

A SARS-CoV2 nagyobb affinitással kötődik az ACE2-höz, mint a SARS-CoV.

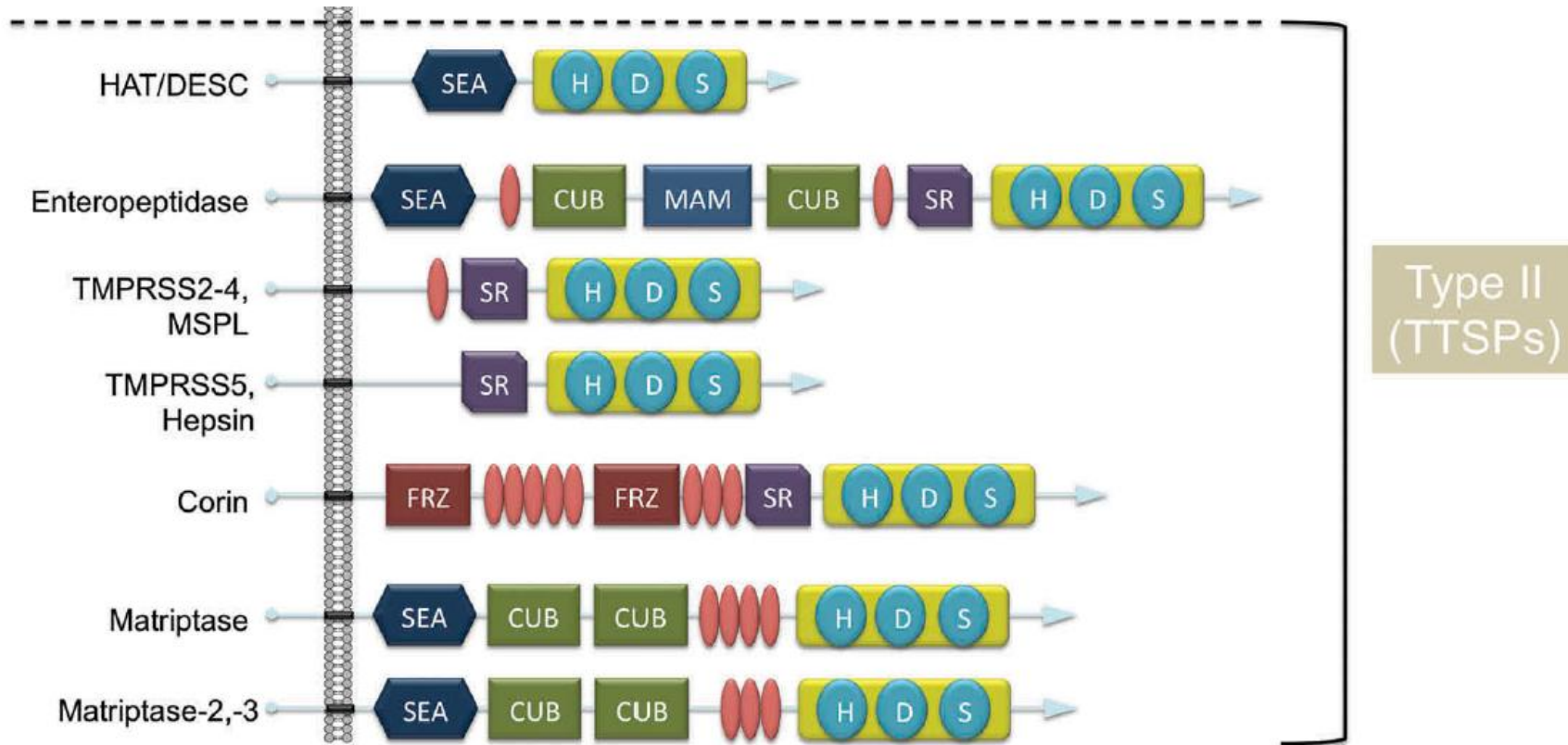
Az S-proteint a TMPRSS2 szerin proteáz hasítja



A vírushatás második lépése:

a TMPRSS2 szerin proteáz hasítja az ACE2-kötött S-proteint.
A TMPRSS2 az ACE2-t is „aktiválja”? TMPRSS2-ACE2 komplex?

A 2-es típusú transzmembrán szerin proteázok számos élettani folyamatban vesznek részt

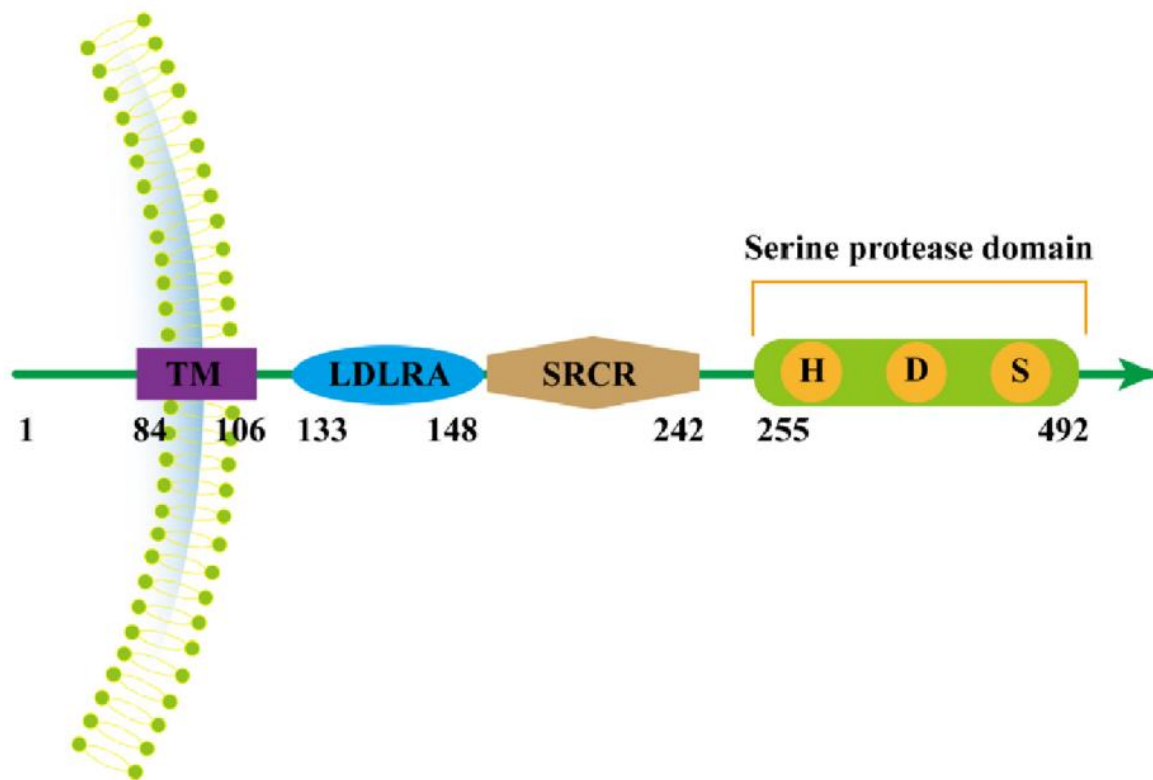


Tripszin-szerű szerin proteázok

Emésztő enzimek aktiválása: enterokináz;

Vérnyomásszabályzás: corin; ECM emésztés / tumor metasztázis: hepszin, matriptáz

TMPRSS2: normál élettani funkciója nem ismert



TMPRSS2 knock-out egér: normálisan fejlődik, szaporodik

A gén transzkripcióját androgén hormonok szabályozzák.

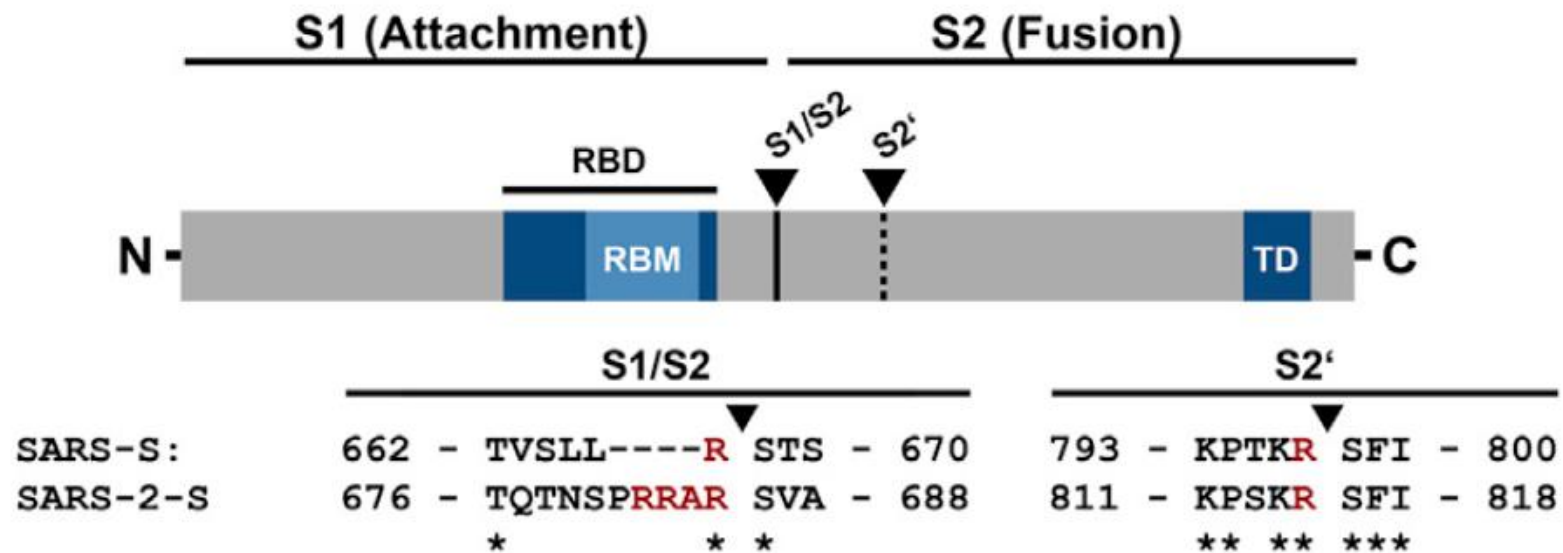
Prosztatarák esetén a TMPRSS2 szintje emelkedett.

Szerepe lehet a tumor metasztázisában.

Hasítja a PAR2 (proteáz-aktivált) receptort.

A TMPRSS2 két helyen hasítja a koronavírus S-proteinjét

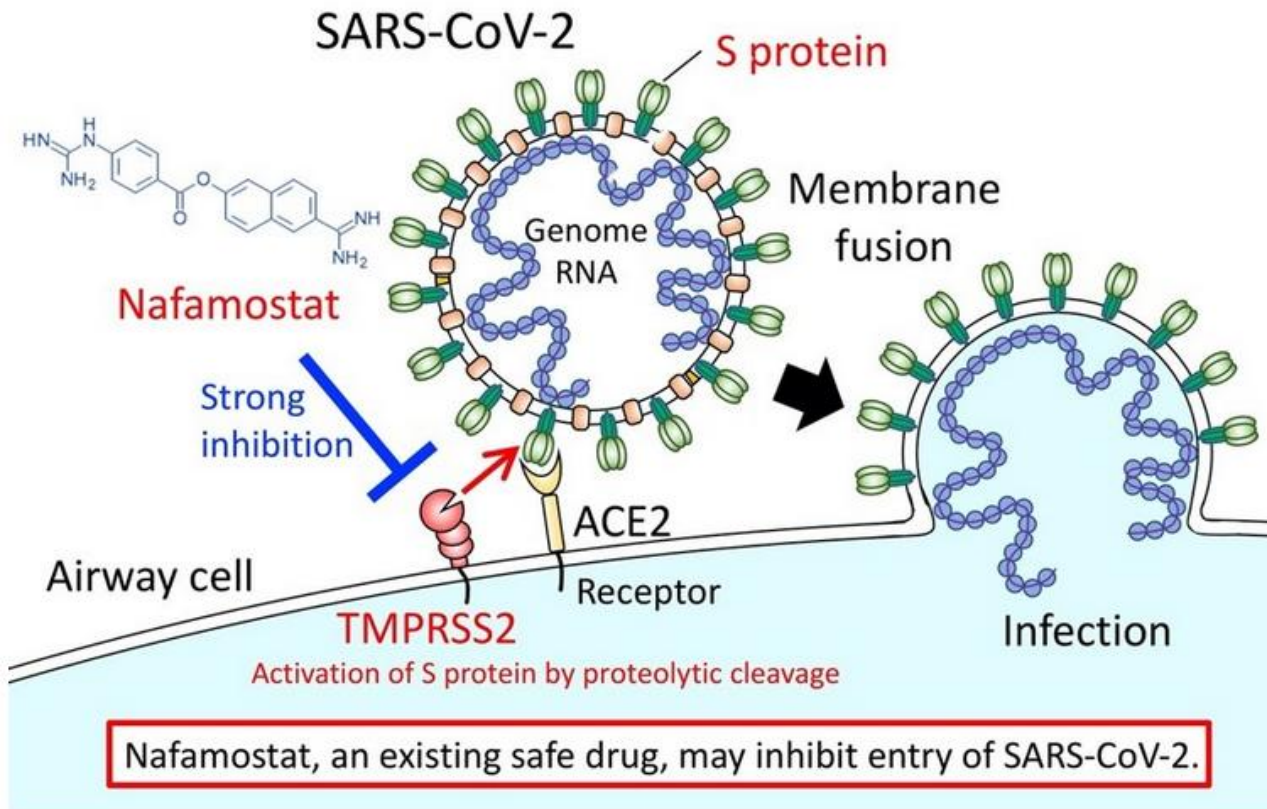
A



Először az S1/S2 kötés hasad, utána az S2'.

Mindkét hasadás szükséges a vírus célsejtbe való belépéséhez.

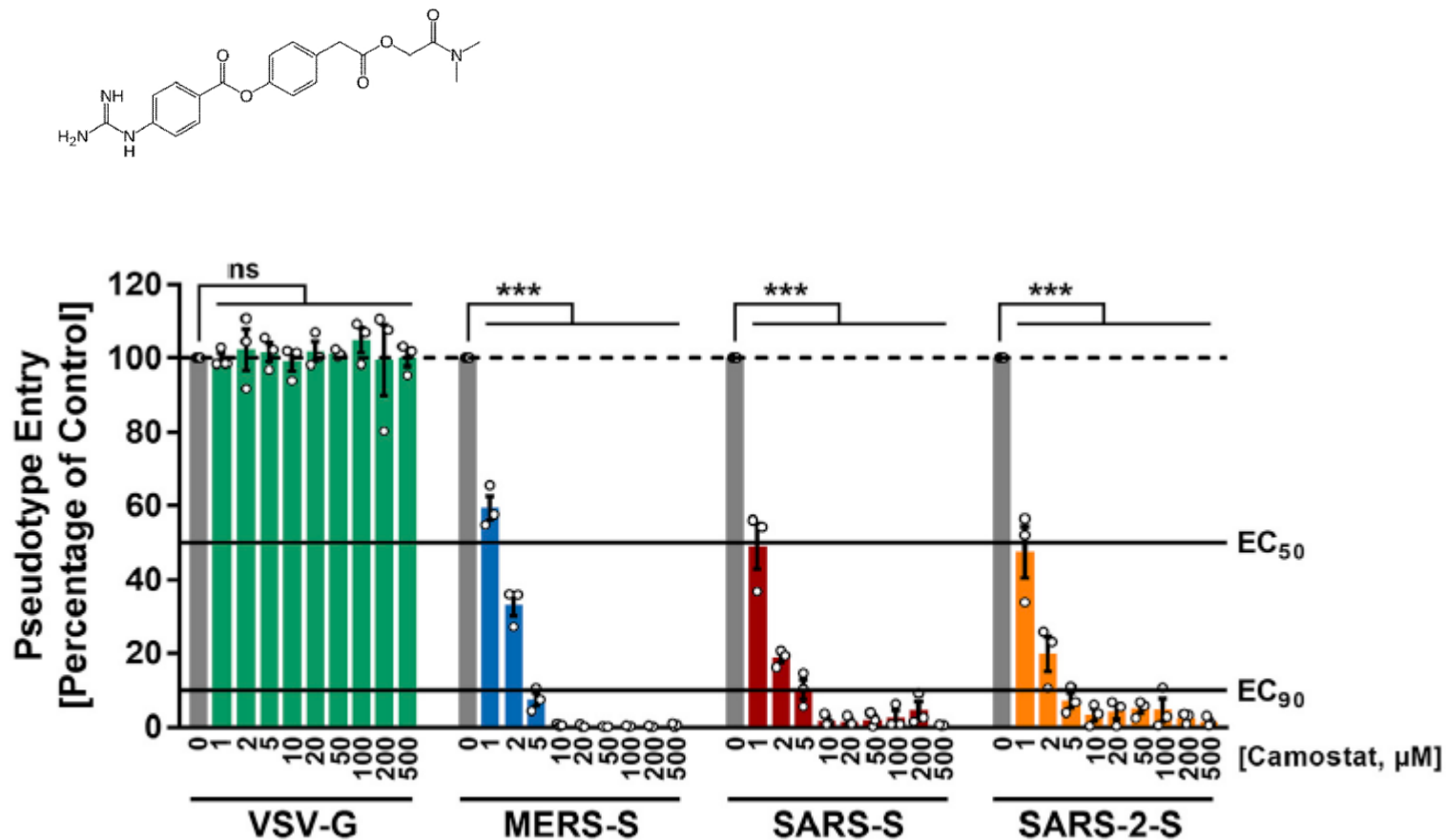
A TMPRSS2 proteáz gátlása megakadályozza a vírus sejtbe való bejutását



Nafamostat, an existing safe drug, may inhibit entry of SARS-CoV-2. Image: 2020 The University of Tokyo.

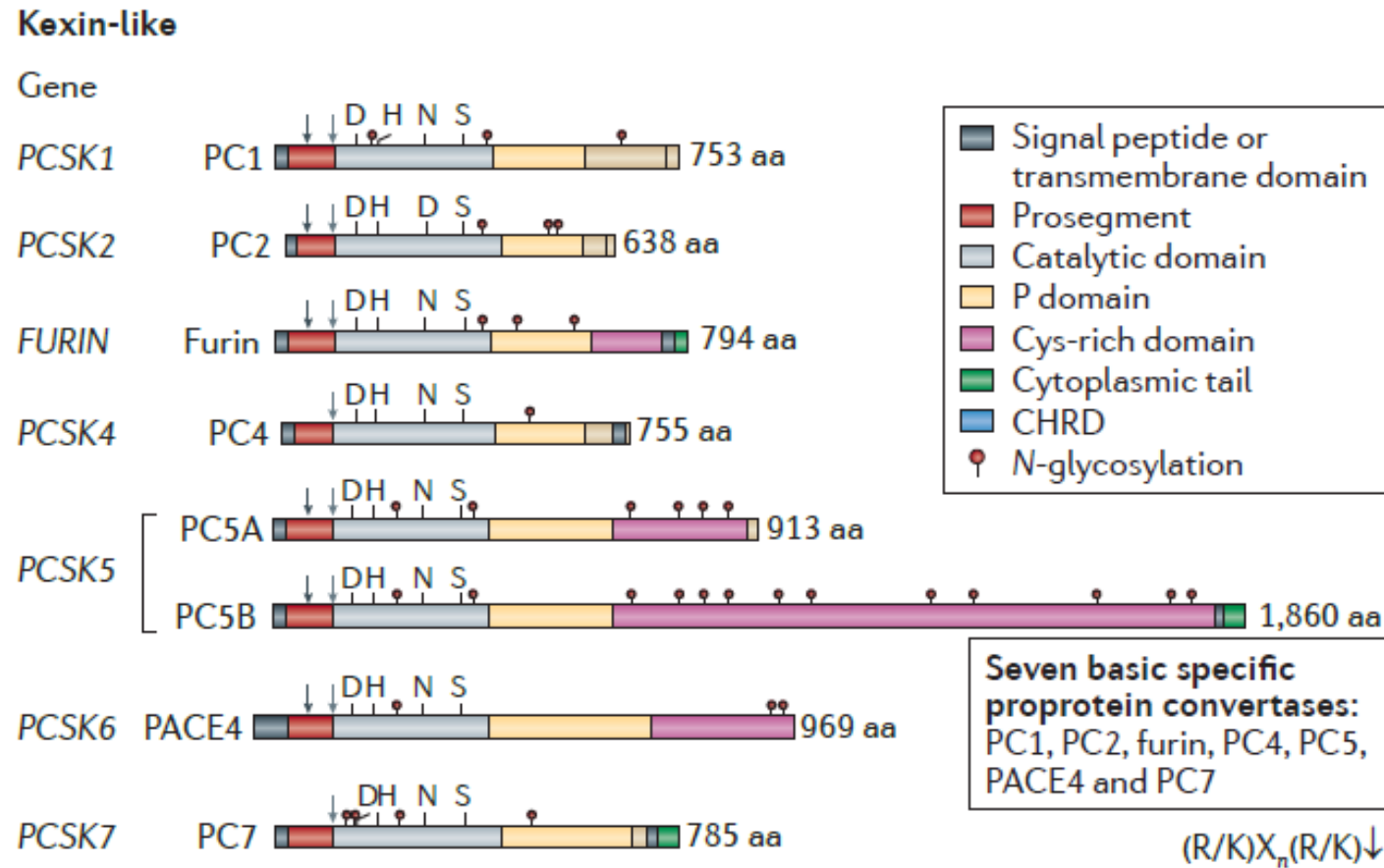
Nafamostat mesilate (Futhan, FUT-175) széles spektrumú proteáz inhibitor.
A komplementrendszer is jól gátolja.
Japánban tesztelik, mint antivirális szert.

A camostat mesylate gátolja a koronavírusok tüdő sejtekbe való bejutását



A camostat, hasonlóan a nafamostathoz, széles spektrumú szerin proteáz inhibitor. Mikromólos koncentrációban teljesen gátolja a koronavírusok Calu-3 sejtekbe való behatolását.

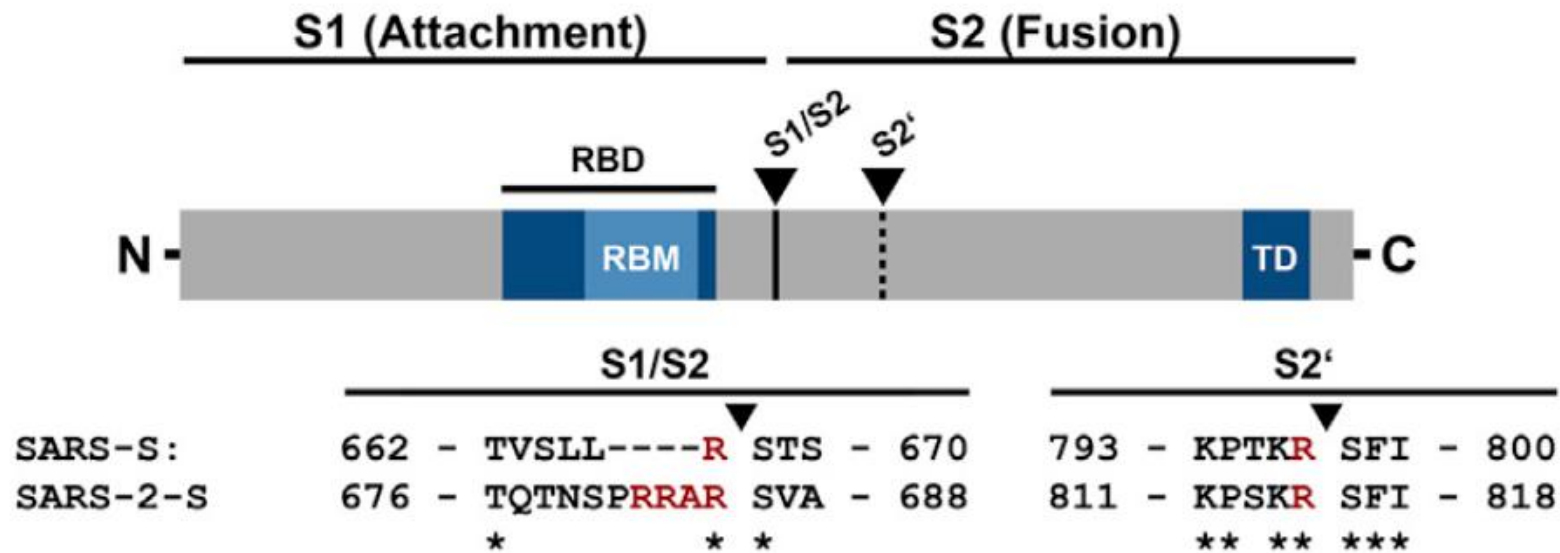
A proprotein konvertázok fontos szerepet játszanak az extracelluláris fehérjék processzáálásában



A subtilizinek családjába tartozó szerin proteázok: nélkülözhetetlenek a hormonok, növekedési faktorok, receptorok, adhézións molekulák, stb. limitált proteolízissal való aktiválásához. Jellemzően multibázikus szekvencia $[(R/K)X_{0,2,4,6}(R/K)\downarrow]$ után hasítanak.

A proprotein konvertázok szerepet játszanak a vírusfertőzésben?

A



A SARS-CoV-2-ben megjelenik egy polibázikus hasítóhely, ami a SARS-CoV-ban nincs jelen.
Mesterséges vírus?

A **RRAR** szuboptimális „furin” hasítóhely. Az optimális szekvencia **RARR** lenne.
Az S2' helyen lévő **KPSKR** szintén hasítható proprotein konvertázzal.

A fehérjék egymással kölcsönhatásba lépve működnek (interaktóm)

a kölcsönhatások megfelelő szabályozása élet-halál kérdése: terápiás beavatkozás lehetősége!

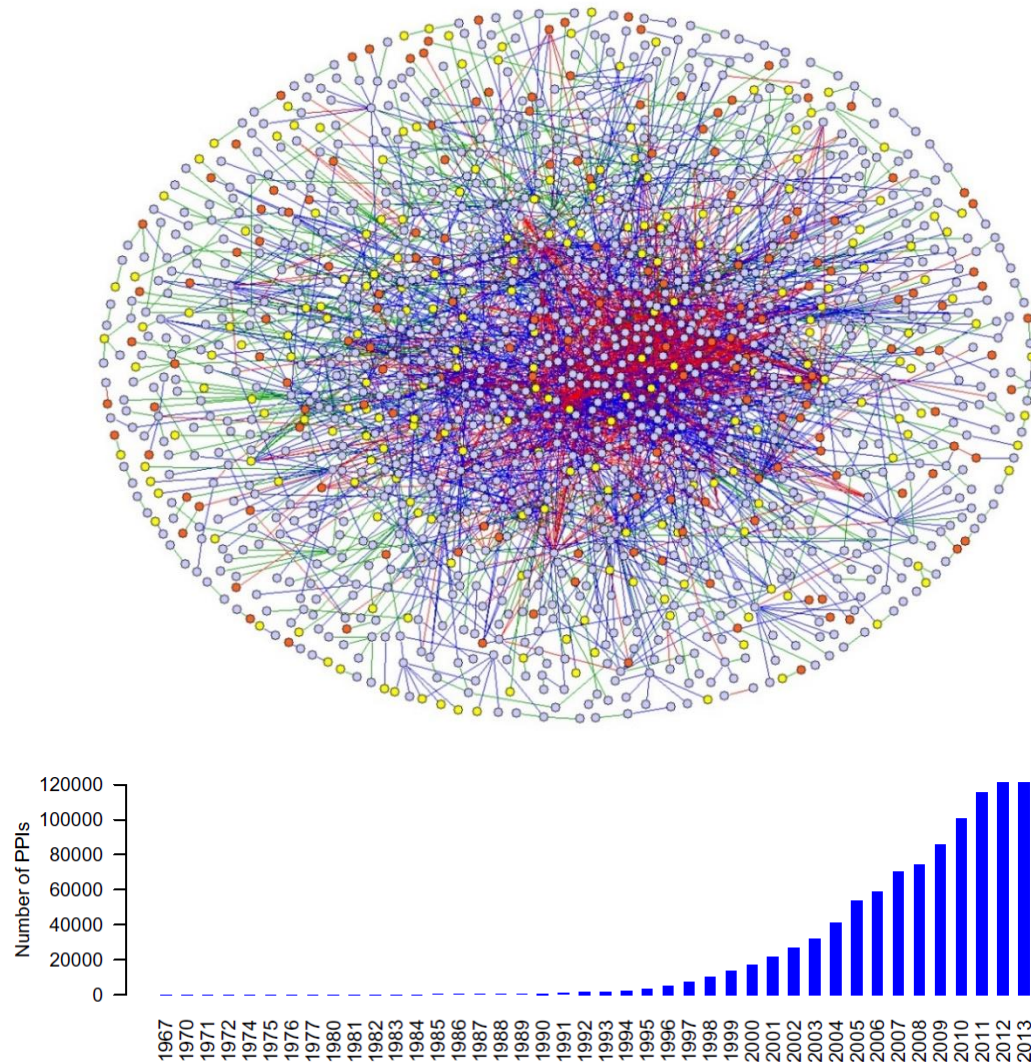
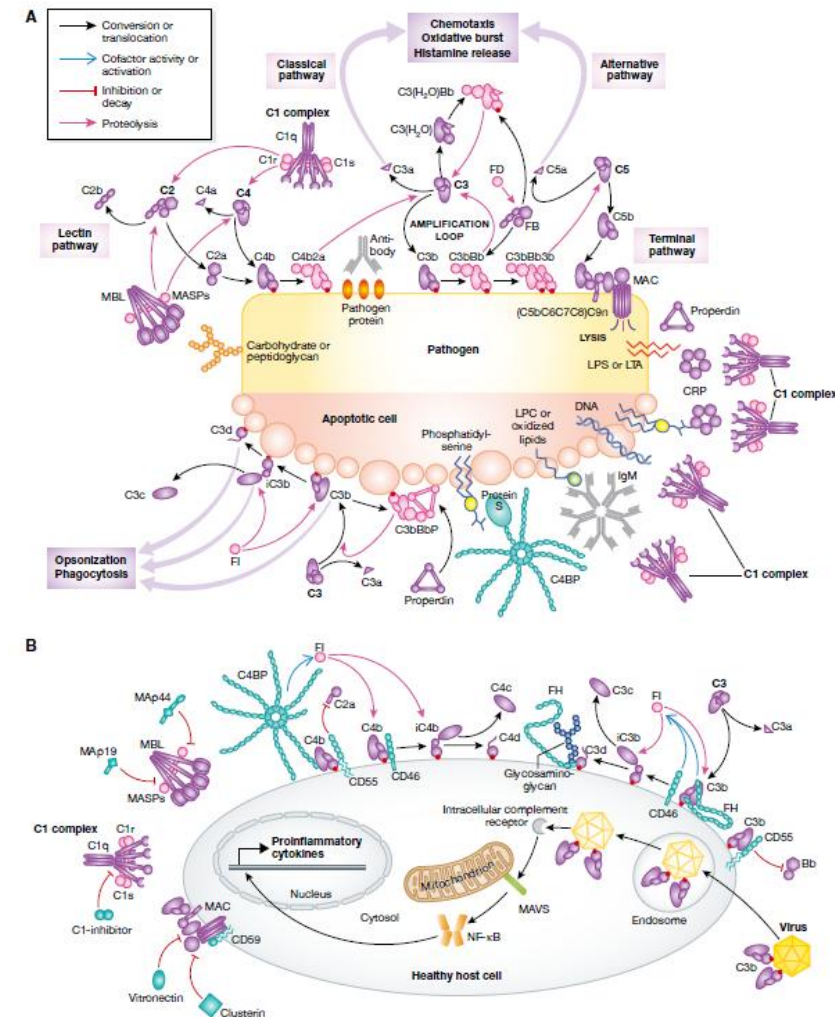
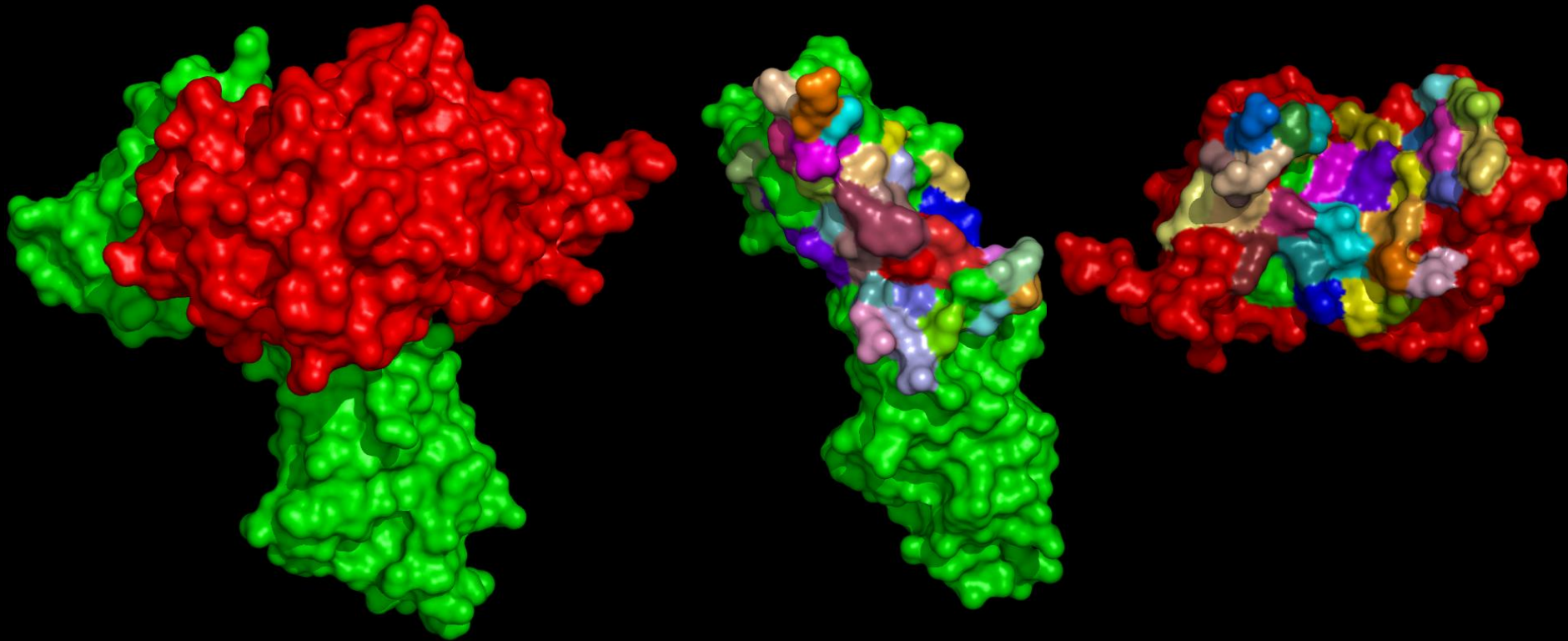


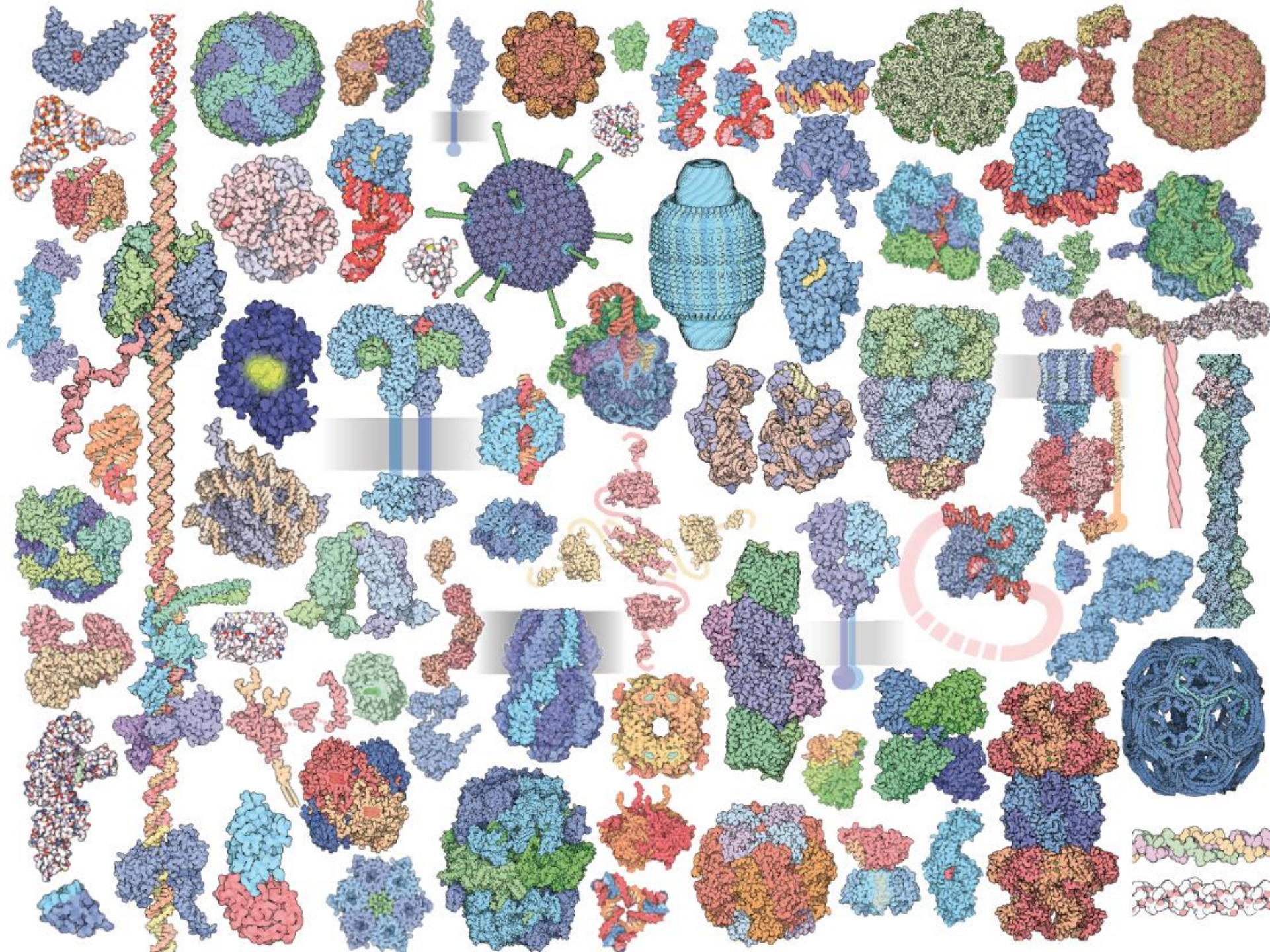
Fig. 4. Cumulative number of known PPIs by year.

Biochemical and Biophysical Research Communications 445 (2014) 757–773



Tipikus fehérje-fehérje kölcsönhatás
nagy, strukturált, egyedi felszínek
szelektív gátlás blokkoló fehérjével



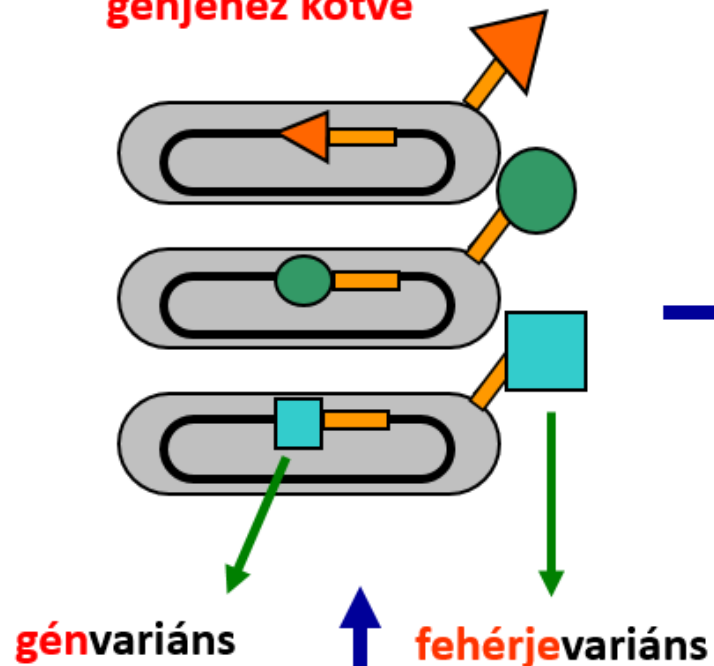


EVOLÚCIÓ

Blokkoló fehérjék kifejlesztése irányított evolúcióval

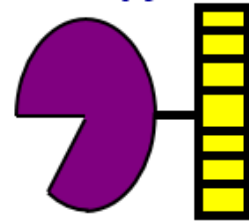
irányított variációképzés

10-milliárd tervezetten
előállított fehérjevariáns,
mindegyik a saját
génjéhez kötve



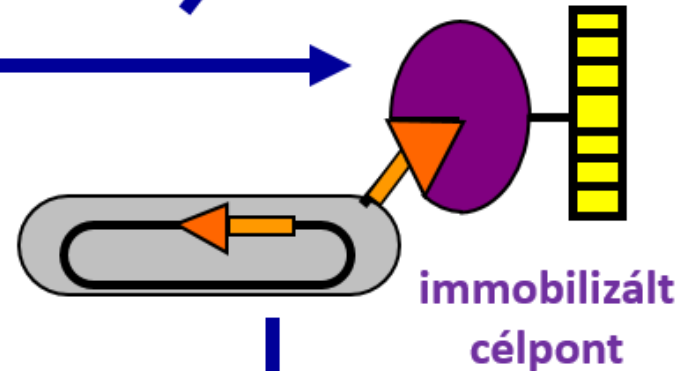
In vitro szelekció immobilizált
célpont fehérje kötési képesség

alapján

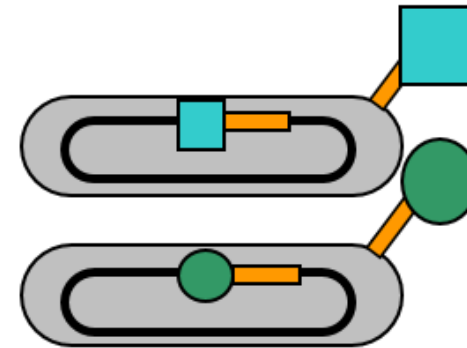


immobilizált célpont

Kötődés



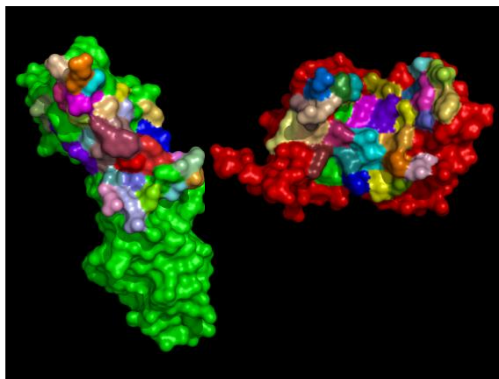
Mosás



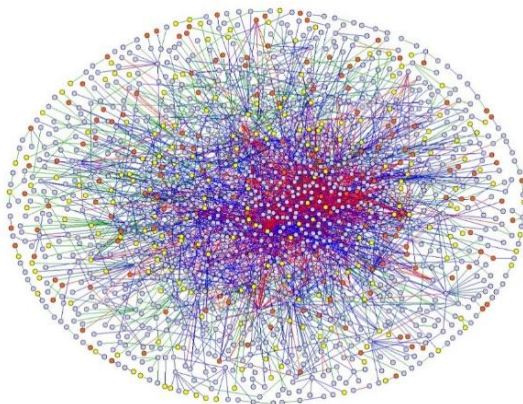
funkcionális klónok elválasztása, és elszaporítása

Az irányított fehérjeevolúció fő céljai

Fehérje-kölcsönhatások működési alapjainak feltárása *elsősorban alapkutatás*

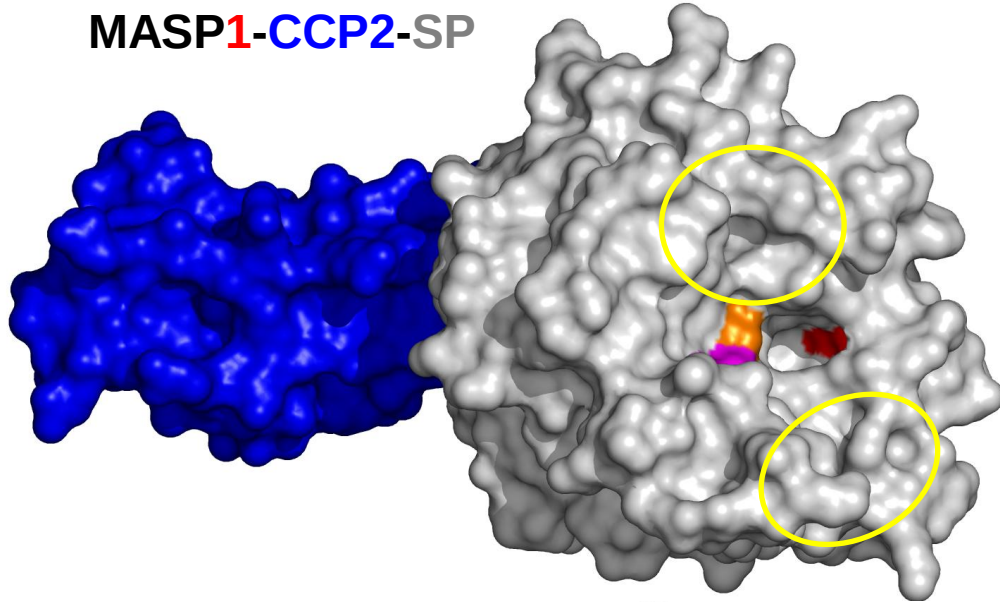


Természetben nem létező, új kölcsönható partnerek evolválása, ezáltal
fehérje-kölcsönhatások szelektív megszüntetése
alapkutatás és terápia „egy füst alatt”

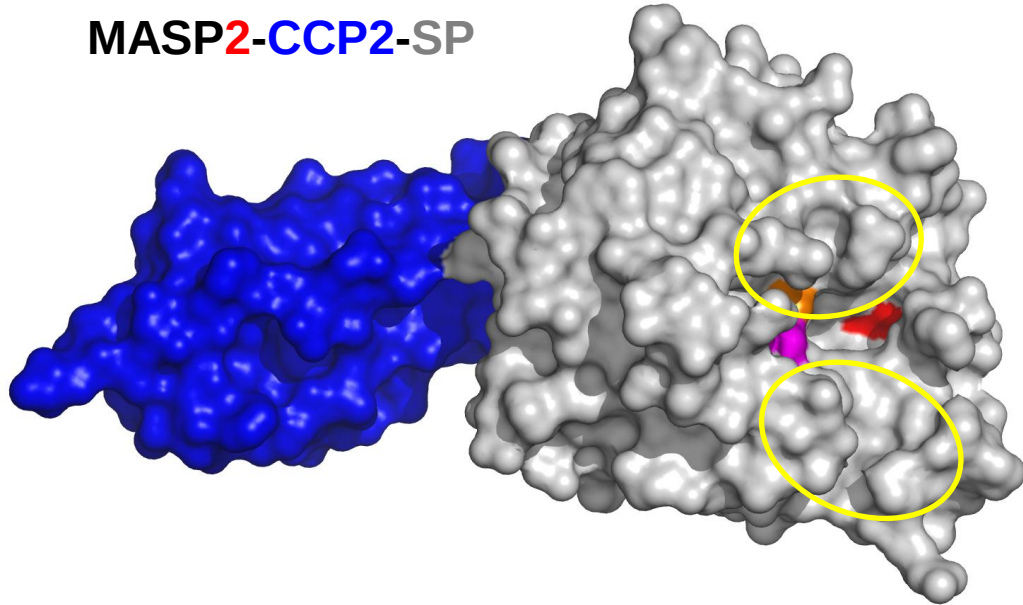


A MASP enzimek és a tripszin szubsztrátkötő „kulcslyuka”

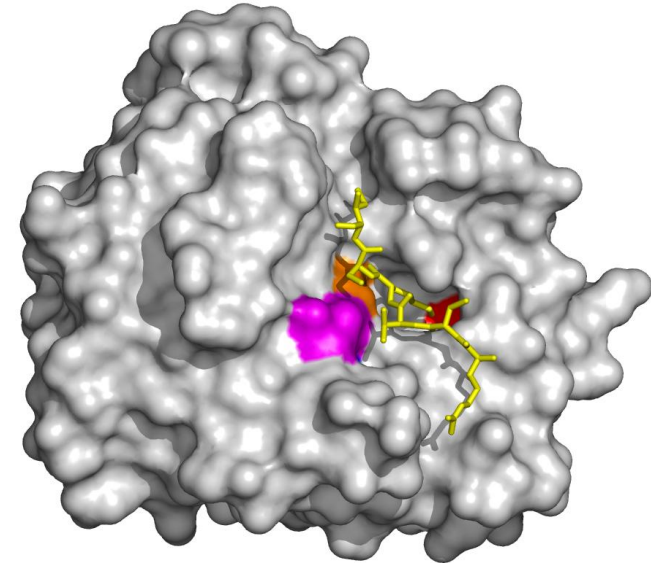
MAASP1-CCP2-SP



MAASP2-CCP2-SP

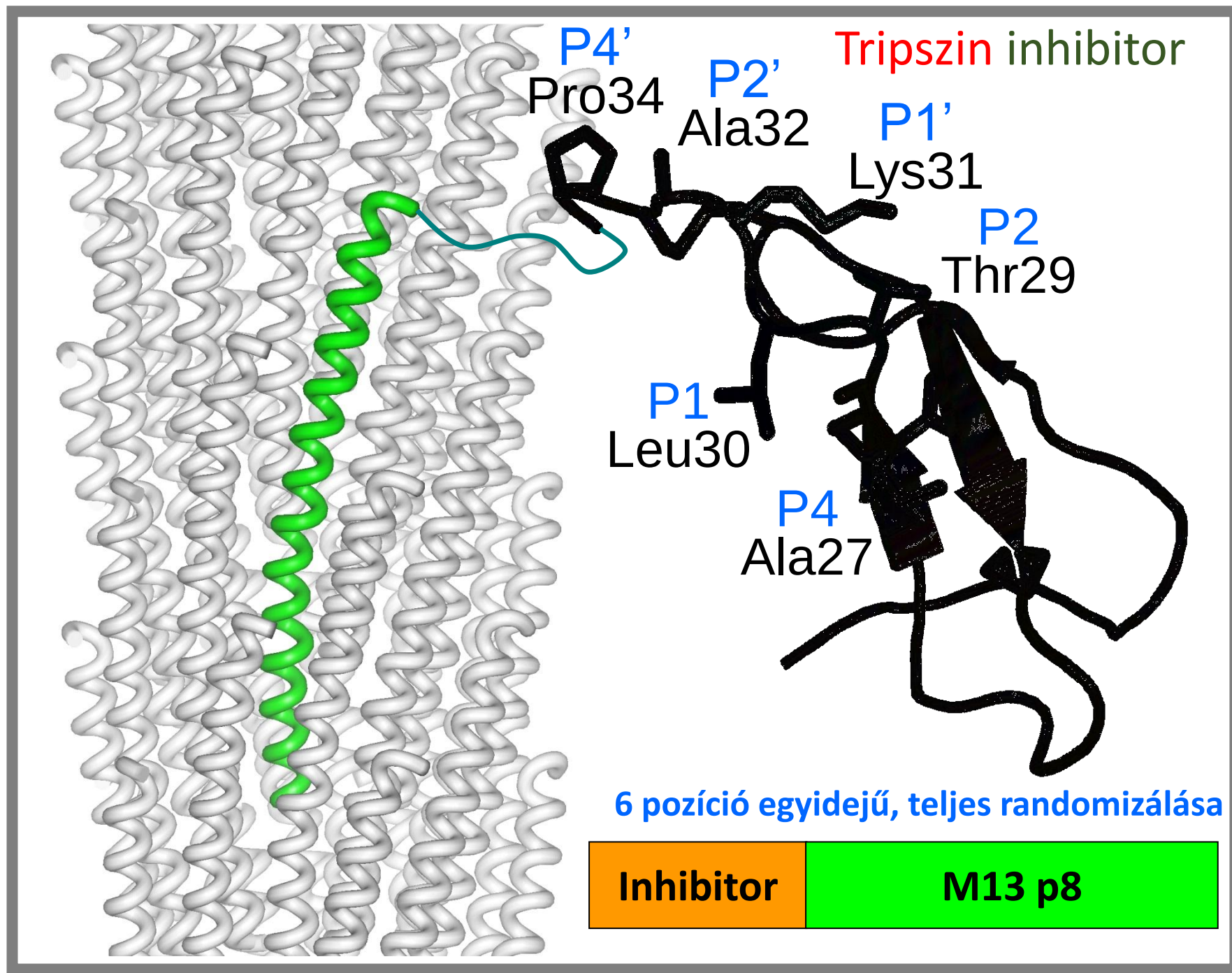


Tripszin

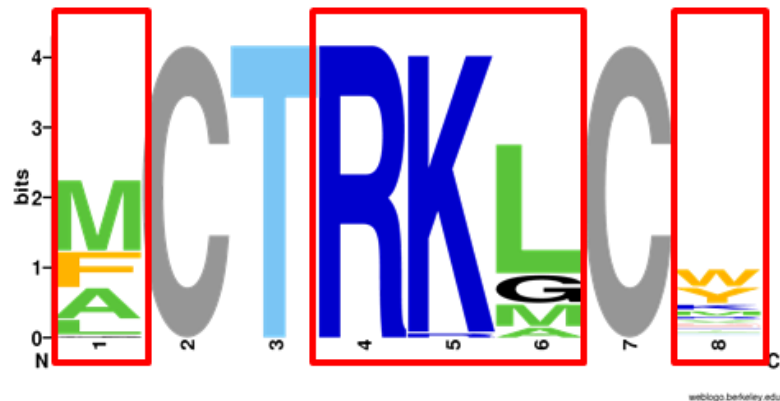


a MASP enzimek „kulcslyuka”
egyedi módon más, mint a tripsziné

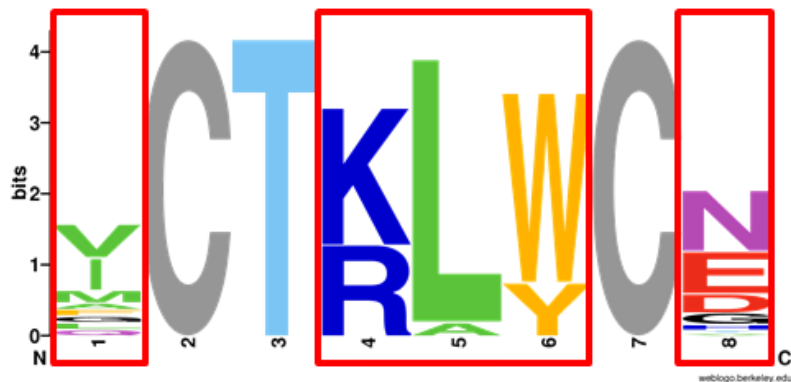




MASP-1 gátlók logója



MASP-2 gátlók logója



- Enzim-specifikus preferenciák 5 pozícióban
- Konszenzus formák előállítása önálló fehérjeként: **SGMI-1**; **SGMI-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^{a,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-1133, Budapest, Hungary; and ^cSecond Department of Internal Medicine, Health Science Center, University of Debrecen, H-4002, Debrecen, Hungary

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

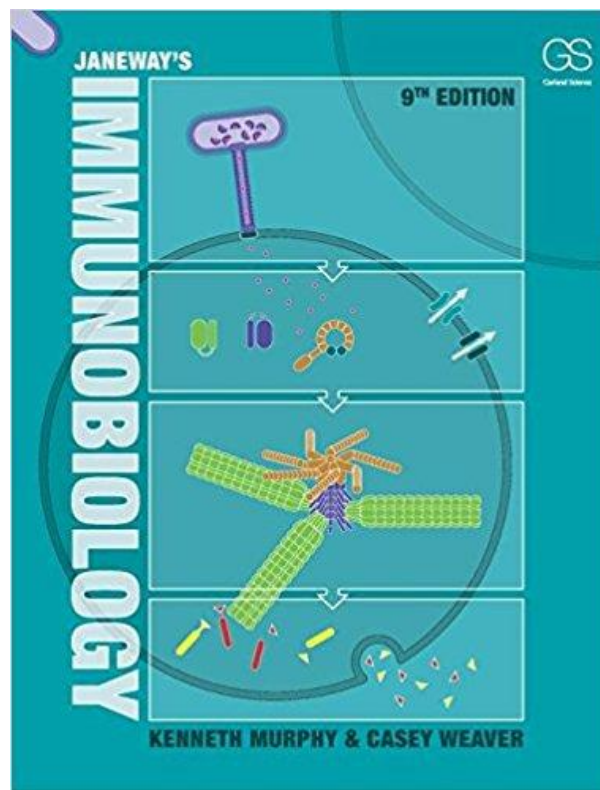
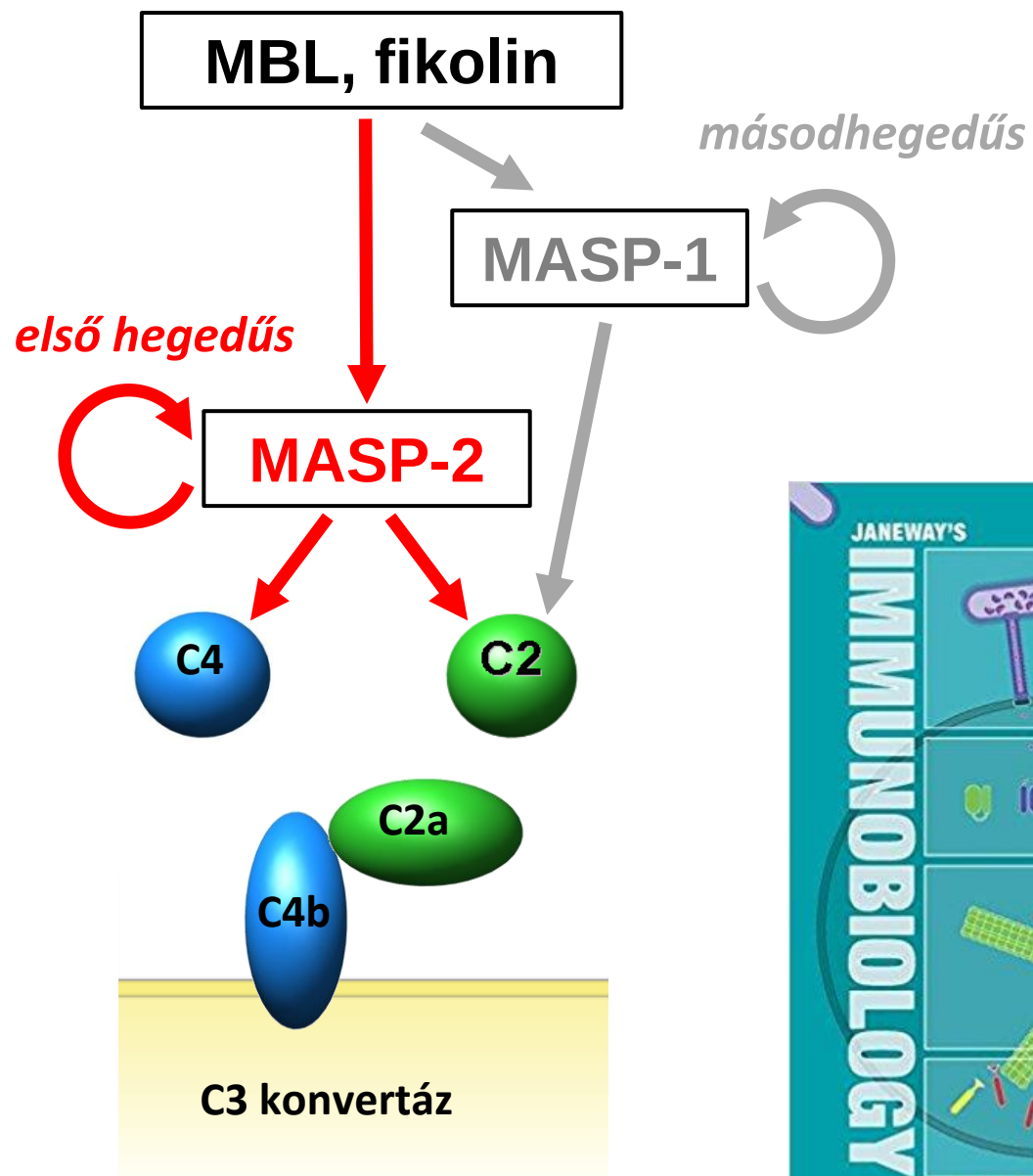
Dávid Héja^{1,2}, Veronika Harmat^{1*}, Krisztián Fodor^{1*}, Matthias Wilmanns^{1*}, József Dobó², Katalin A. Kékesi^{1,19}, Péter Závodszy², Péter Gál^{1,3,4,5}, and Gábor Pál^{1,3,4,5}

Selective Inhibition of the Lectin Pathway of Complement with Phage Display Selected Peptides against Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease (MASP)-1 and -2: Significant Contribution of MASP-1 to Lectin Pathway Activation

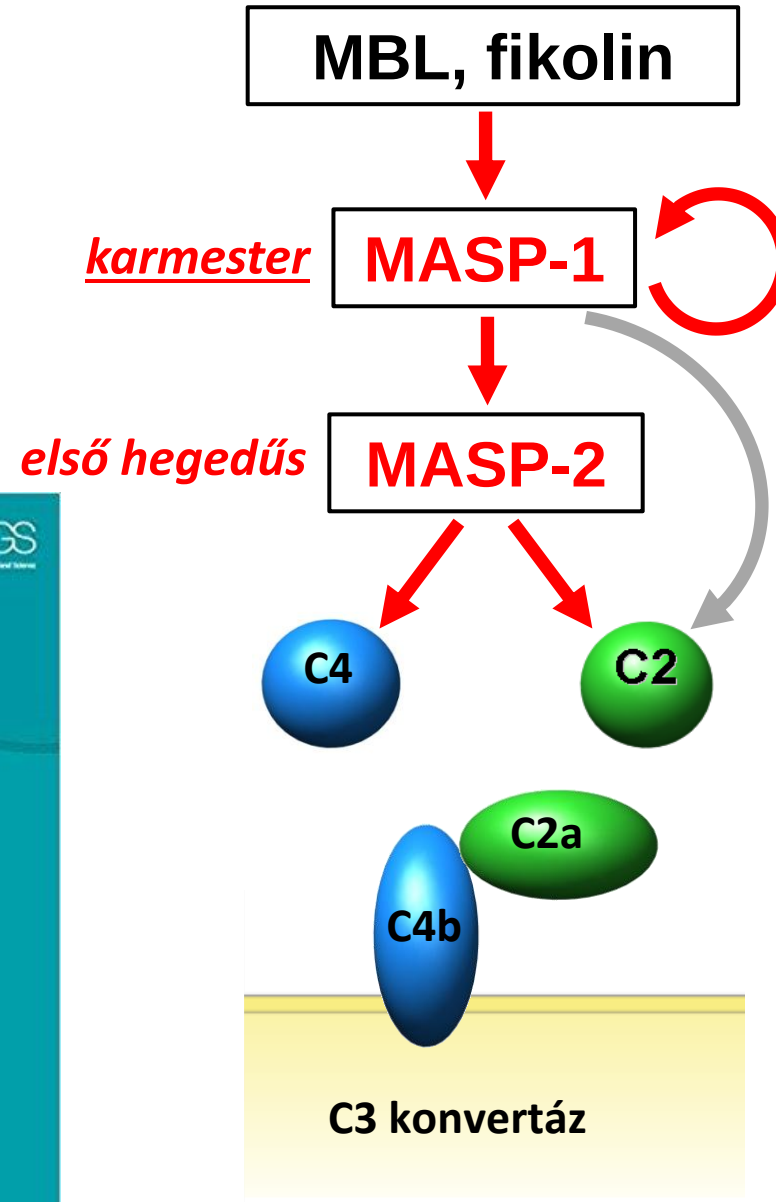
Andrea Kocsis, Katalin A. Kékesi, Róbert Szász, Barbara M. Végh, Júlia Balczer, József Dobó, Péter Závodszy, Péter Gál and Gábor Pál

J. Immunol. 2010;185:4169-4178; originally published online Sep 3, 2010;

Korábbi modell



Új modell



Új aktiválódási modell - Új gyógyszercélpont

MASP-2 inhibitorok potenciális terápiás alkalmazása:

szívinfarktus és szélütés és okozta szövetkárosodás megakadályozása



feltalálók



+



kockázati tőke

Irányított evolúcióval kifejlesztett humán fehérje-alapú MASP-2 inhibitorok
Szabadalom Európában és az USA-ban nemzeti bejegyzési szakaszban

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 July 2018 (12.07.2018)



(10) International Publication Number
WO 2018/127719 A2



US 20200131249A1

(19) United States

(12) Patent Application Publication
GAL et al.

(10) Pub. No.: US 2020/0131249 A1
(43) Pub. Date: Apr. 30, 2020

JBC ARTICLE

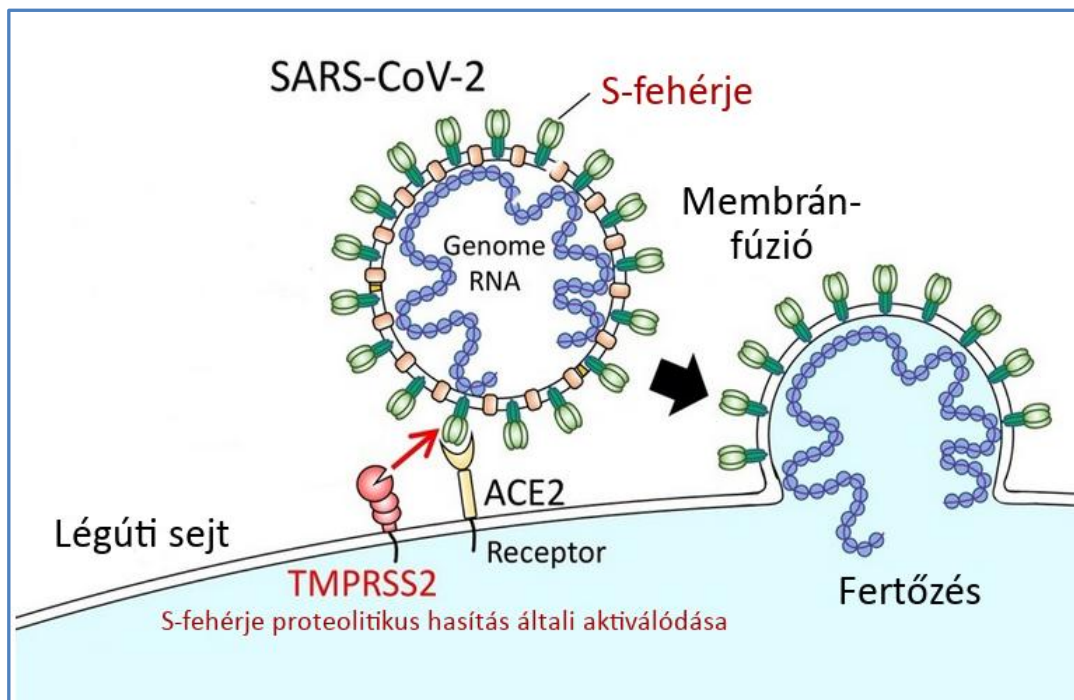
✱ Author's Choice

Novel MASP-2 inhibitors developed via directed evolution of human TFPI1 are potent lectin pathway inhibitors

Received for publication, March 6, 2019, and in revised form, March 28, 2019. Published, Papers in Press, April 5, 2019. DOI: 10.1074/jbc.RA119.008315

✱ Dávid Szakács[†], Andrea Kocsis[§], ✱ Róbert Szász[§], Péter Gál[§], and ✱ Gábor Pál^{†||}

Koronavírus ellenes gyógyszerjelöltek fejlesztése irányított evolúcióval



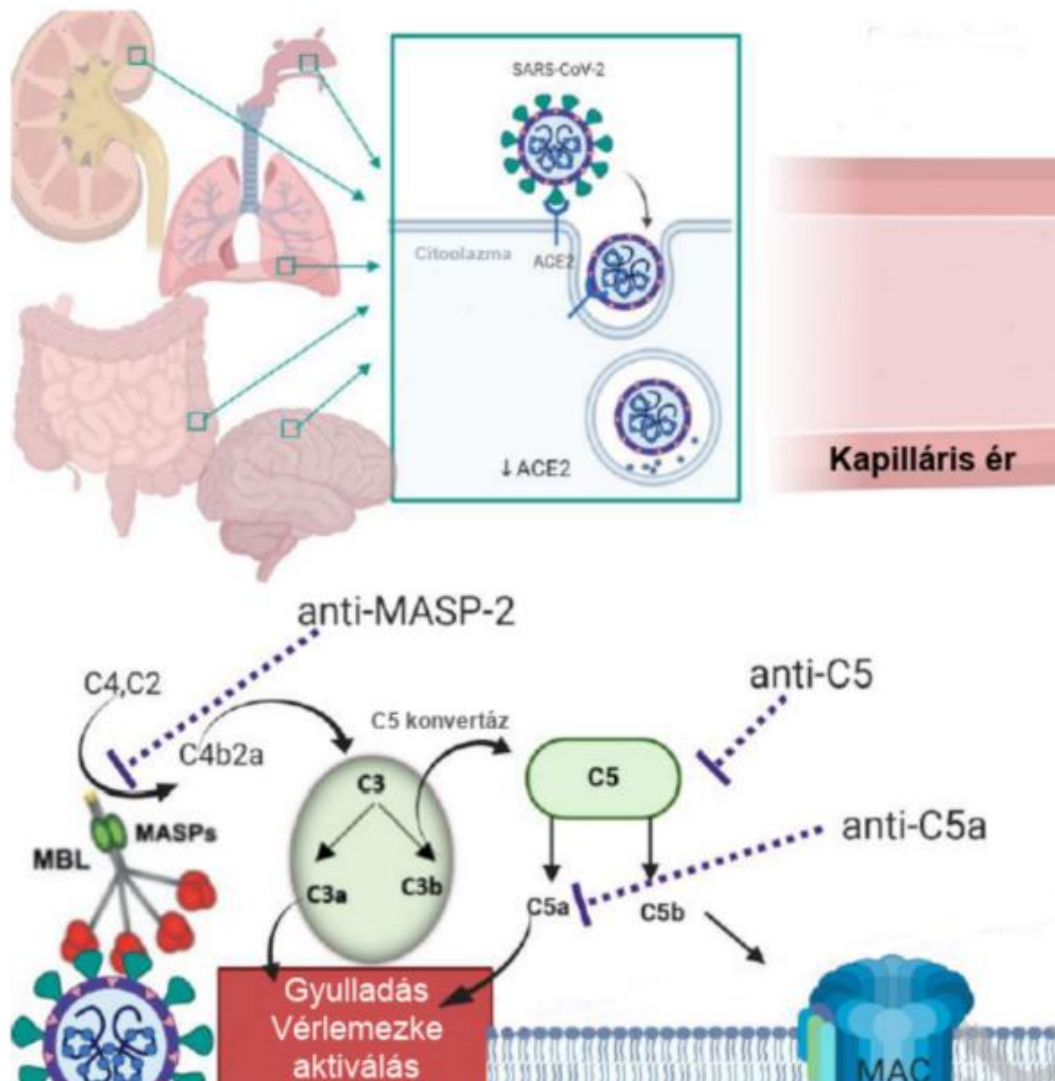
**A koronavírus fertőzés
előfeltétele, hogy a célsejt
TMPRSS2 proteáza elhasítsa a
vírus S fehérjét**

A TMPRSS2 kiemelt gyógyszercélpont!

Koronavírus ellenes gyógyszerjelöltek fejlesztése irányított evolúcióval

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL
AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ PROJEKT

EvolVeritas
Biotechnology Ltd.



A koronavírus túlaktiválja a komplementrendszer lektin útját. A következmény a hajszálerek elzáródása, szövetelhalás. Sok esetben ez okozza a halált. A MASP-2 proteáz specifikus gátlása életmentő terapia lehet

Ilyen inhibitorunk már van!

Köszönjük a figyelmet!

