

Degradace proteinů a její poruchy

Autoři

Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D., prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

(bousova@faf.cuni.cz)

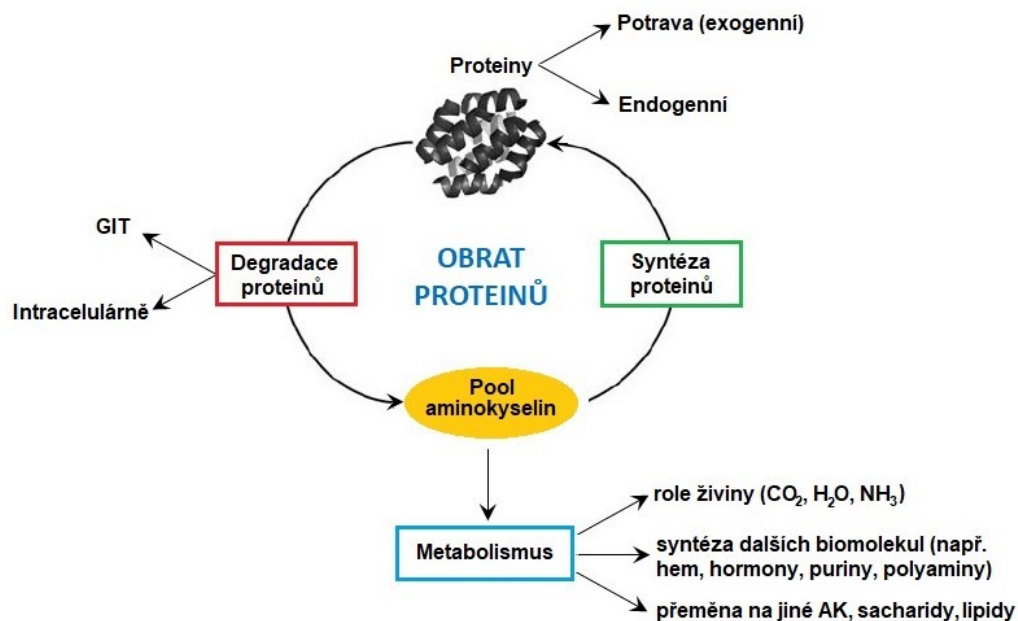
Katedra biochemických věd

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Proteiny, základní molekuly živého organismu, zastávají celou řadu fyziologických funkcí. Působí jako receptory, enzymy, přenašeče, složky kontraktilních a motilitních systémů, protilátky, faktory krevního srážení či hormony. Biologická funkce proteinu je předurčena jeho přirozenou (nativní) strukturou, která je zakódována v jeho primární struktuře (pořadí aminokyselin). Degradace proteinů je zajištěna činností intracelulárních (lyzozom, cytosol) i extracelulárních (GIT) hydrolytických enzymů označovaných jako peptidasy. Výsledkem rozkladu proteinů je směs volných aminokyselin, které jsou transportovány do buněk těla prostřednictvím specifických transportních systémů a dále využity. S degradací proteinů a transportem aminokyselin souvisí celá řada poruch – např. poruchy žaludeční sekrece, poruchy pankreatické sekrece, malabsorpce aminokyselin (např. Hartnupova nemoc), poruchy lyzozomální degradace či poruchy cytosolické cesty degradace. Cílem této lekce je popsat základní procesy trávení proteinů jak v GIT, tak uvnitř buněk těla, vstřebávání aminokyselin a poruchy s nimi spojené.

Přehled metabolismu proteinů

Ve všech tkáních kontinuálně probíhá degradace a syntéza nových proteinů (**obrat proteinů**, Obr. 1). Proteiny potravy tvoří v této bilanci kolem 100 g, zatímco endogenní proteiny až 200 g za den. V organismu zdravého dospělého člověka je tedy denně odbouráno a nasyntetizováno kolem 300 g proteinů, což představuje zhruba 1-2 % jejich celkového množství. V rychlosti obratu jednotlivých proteinů a tkání jsou vlivem odlišné hormonální a nervové regulace a přítomnosti různých enzymů a transportérů v jednotlivých tkáních značné rozdíly. Velký obrat proteinů je typický pro tkáně, ve kterých dochází k velkým strukturním změnám, například v kosterních svalech v průběhu hladovění, nebo v děloze během těhotenství. Z celkového množství aminokyselin uvolněných při degradaci proteinů je kolem 75 % znovu využito k syntéze proteinů. Aminokyseliny nemají, na rozdíl od lipidů a sacharidů, speciální zásobní formu. Proto jsou ty, které nejsou použity k syntéze nových proteinů, velmi rychle degradovány. Jejich uhlíkové skelety jsou většinou přeměněny na amfibolické intermediáty a většina dusíku je vyloučena močí ve formě netoxické močoviny.



Obr. 1. Obrat proteinů a základní směry metabolismu aminokyselin (upraveno z Baskin a Taegtmeier 2011).

K hodnocení metabolismu proteinů se v praxi využívá tzv. **dusíková bilance**, u které se porovnává množství přijatého a vyloučeného dusíku. U zdravých dospělých jedinců je množství dusíku přijatého potravou stejné jako množství, které se za den vyloučí (močí, stolicí, potem, ostříhanými vlasy a nehty, deskvamací rohové vrstvy epidermis) a dusíková bilance je vyrovnaná. Stav, kdy je přijato více dusíku, než je ho vyloučeno, se označuje jako pozitivní dusíková bilance a objevuje se zejména během těhotenství, růstu a rekonvalescence. Negativní dusíková bilance, tedy stav, kdy vylučování převažuje nad příjmem dusíku, vzniká v důsledku hladovění až marasmu, závažných chirurgických zákroků, rozvinutého nádorového onemocnění, nebo kwashiorkoru (závažná malnutrice vyvolaná deficitem proteinů). Dusíková bilance závisí na též příjmu esenciálních aminokyselin. Pokud chybí byť jediná esenciální aminokyselina, dusíková bilance se stává negativní a nepomůže ani nadměrná saturace dalšími aminokyselinami. Ty jsou pak jako živiny využity k získání energie a dusík je ve formě močoviny vyloučen z těla.

Proteolytické enzymy

Trávení peptidů a proteinů v trávicím traktu i jejich degradace v tkáních jsou katalyzovány peptidasami, což jsou enzymy hydrolyticky štěpící peptidovou vazbu. V GIT jsou peptidasy obsaženy v žaludeční a pankreatické šťávě a na povrchu enterocytů. Můžeme je klasifikovat podle místa hydrolyzy substrátu (endo- x exopeptidas) a podle funkčně významných součástí enzymu (serinové, cysteinové, aspartátové a metalloproteinasy). **Endopeptidas** štěpí protein kdekoli uvnitř jeho řetězce, zatímco **exopeptidas** odštěpují poslední aminokyselinový zbytek na N-konci (**aminopeptidas**) nebo na C-konci (**karboxypeptidas**) řetězce proteinu (Obr. 2).



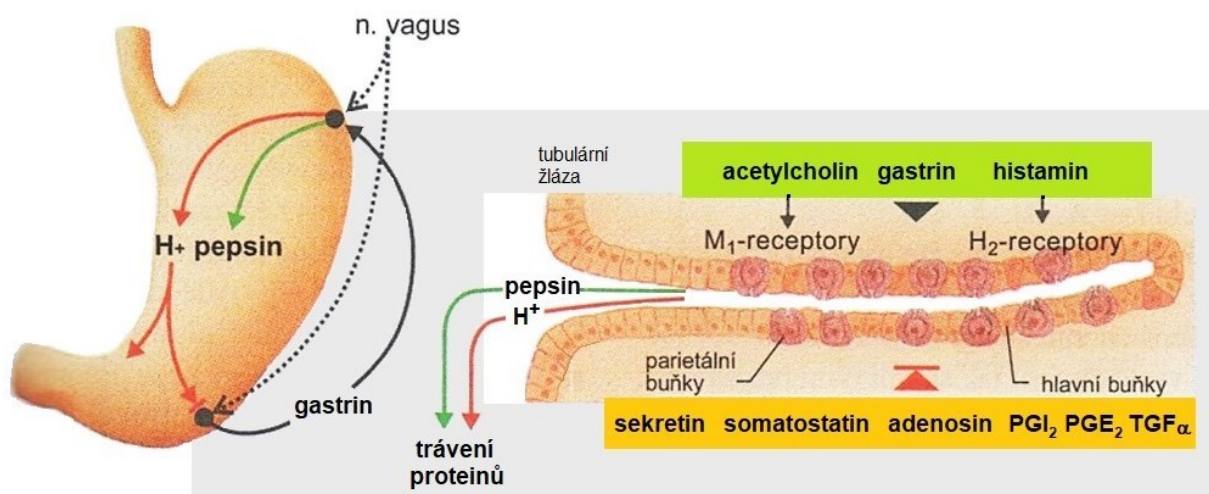
Obr. 2. Rozdíl ve štěpení proteinu katalyzovaném endopeptidasou a exopeptidasou.

Na průběh štěpení proteinu má zásadní vliv několik funkčních skupin, které se nacházejí v aktivním centru peptidas. **Serinové peptidasy**, které v aktivním místě obsahují serin, jsou nejlépe prostudovanou třídou proteolytických enzymů. Při štěpení proteinů využívají hydroxylovou skupinu serinového zbytku k nukleofilní atace peptidové vazby. K této skupině je řazeno i několik threoninových peptidas. Serinové peptidasy jsou aktivní ve slabě alkalickém prostředí a nevyžadují žádné kofaktory. Některé enzymy jsou stabilizovány Ca^{2+} , které se mohou účastnit aktivačních reakcí. Mezi zástupce této skupiny peptidas patří proteolytické enzymy GIT trypsin, chymotrypsin či elastasa. Tyto enzymy jsou syntetizovány ve formě inaktivních prekurzorů, zymogenů, a jsou aktivovány částečným proteolytickým sestřihem mimo syntetizující buňky. **Cysteinové peptidasy** mají v aktivním místě funkčně významnou thiolovou skupinu. Jedná se o převážně intracelulární enzymy a patří mezi ně kathepsiny, kalpainy, kaspasy či rostlinný papain. **Aspartátové peptidasy** mají v aktivním místě karboxylovou skupinu aspartátu, jsou katalyticky aktivní pouze v kyselém prostředí a patří mezi ně extracelulární i intracelulární enzymy. Mezi významné zástupce patří pepsin (extracelulární) či lyzozomální peptidasa kathepsin D. Pepsin je syntetizován ve formě neaktivního zymogenu a po aktivaci štěpí proteiny potravy v kyselém prostředí žaludku a v tenkém střevě je nevratně inaktivován $\text{pH} > 7$. Poslední skupinou peptidas jsou **metalloproteasy**, které obsahují v aktivním centru iont kovu (Zn^{2+} , Mn^{2+}). Tyto enzymy jsou aktivní v neutrálním prostředí a jejich aktivitu lze inhibovat chelatačními činidly. Mezi zástupce patří karboxypeptidasy pankreatické šťávy a matrix-metalloproteinasy (např. kolagenasy, gelatinasy, stromelysiny) degradující mezibuněčnou hmotu.

Peptidasy mají různou **substrátovou specifitu** (Obr. 3). Některé *endopeptidasy*, např. rostlinný papain, jsou málo specifické a štěpí řetězce na libovolném místě. Pepsin má širokou substrátovou specifitu a preferuje aromatické nebo objemné aminokyselinové zbytky, jako jsou fenylalanin (Phe), tyrosin (Tyr), tryptofan (Trp) a leucin (Leu). Trypsin je sice serinová peptidasa, ale specifitu jeho štěpení způsobuje aspartátový zbytek na dně aktivního centra, který vytváří solný můstek s bazickými aminokyselinami lysinem (Lys) a argininem (Arg), serinový a histidinový zbytek se pak podílejí na štěpení. Trypsin tedy zanechává na C-konci jednoho z produktů bazickou aminokyselinu (Lys nebo Arg). Aktivní centrum chymotrypsinu je tvořené velkou hydrofobní kapsou, takže tento enzym štěpí substrát v místě, kde se nacházejí hydrofobní aminokyseliny nebo aminokyseliny s velkými arylovými řetězci (např. Trp, Phe, Tyr, Leu, případně methionin, Met). Aktivní centrum elastasy vytváří mělkou kapsou, do které zapadnou pouze nejmenší aminokyseliny glycin (Gly) a alanin (Ala). *Exopeptidasa*

absorpci kobalaminu (vitaminu B₁₂). Hlavní buňky tvoří slabě zásaditý sekret obsahující pepsinogen.

Kyseliny chlorovodíková, která vzniká působením enzymu karboanhydrasy (karbonátdehydratasy)¹. Tento enzym katalyzuje interkonverzi rozpuštěného oxidu uhličitého a hydrogenuhličitanového iontu. aktivuje v žaludeční šťávě pepsinogen na pepsin, denaturuje proteiny potravy a tím usnadňuje jejich proteolýzu, působí antibakteriálně a umožňuje solubilizaci nerozpustných Ca²⁺ a Fe²⁺ solí. Její sekrece je regulována nervově, endokrinně, parakrinně a autokrinně. Nejvýznamnější stimulační účinek má **gastrin**, který aktivuje protonovou pumpu H⁺/K⁺-ATPasu. Tento hormon pochází z G-buněk antra žaludku Stimulační účinek má též **acetylcholin**, neurotransmitter postgangliových vláken *nervus vagus*, který působením na M₁-receptory a neurony stimuluje výdej gastrinu prostřednictvím GRP („*gastrin-releasing peptide*“). Parakrinní stimulační vliv má **histamin** produkovaný ECL-buňkami („*enterochromaffin-like*“) a mastocyty žaludeční stěny. Inhibičně působí **sekretin** (endokrinně) z tenkého střeva, **somatostatin** (parakrinně) produkovaný D-buňkami žaludeční sliznice a **prostaglandiny** (zejm. PGI₂ a PGE₂), **transformující růstový faktor-α** a **adenosin** (všechny para- a autokrinně). Významným regulačním mechanismem je zpětnovazebné tlumení sekrece gastrinu vysokou koncentrací H⁺ iontů v dutině žaludku (Obr. 4).



Obr. 4. Tvorba žaludeční šťávy a její regulace (upraveno Silbernagl a Lang 2012)

Druhou složkou žaludeční šťávy je pepsinogen syntetizovaný hlavními buňkami přímo úměrně rychlosti sekrece HCl. Působením HCl dojde k aktivaci části molekul pepsinogenu na **pepsin**, aktivace dalších molekul probíhá autokatalycky. Pepsin je málo specifická endopeptidasa s pH optimem v silně kyselé oblasti, pro jejíž katalytickou aktivitu je rozhodující aspartátový zbytek v aktivním místě. Výsledkem působení pepsinu na proteiny potravy je směs

¹ **Karboanhydrasa** katalyzuje reverzibilní přeměnu oxidu uhličitého a vody na kyselinu uhličitou, která z velké části disociuje na hydrogenuhličitanový ion a vodíkový proton ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$), jehož export z buňky výměnou za jiný kation (např. Na⁺) vede k okyselení příslušného prostředí. Karboanhydrasa je obsažena v buňkách žaludeční sliznice, kde se podílí na tvorbě HCl. Dále se účastní acidifikace moči v ledvinných tubulech, přenosu CO₂ v erytrocytech a produkce nitrooční tekutiny v oku.

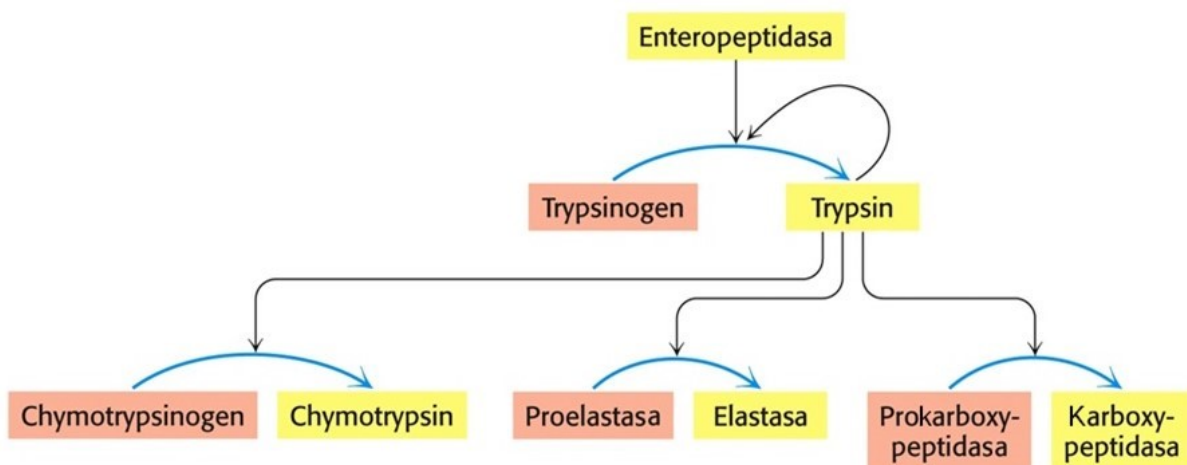
kratších peptidů (tzv. pepton). Po promísení tráveniny (chymu) s pankreatickou šťávou, která má alkalické pH, je účinek pepsinu nevratně ukončen.

V žaludku kojenců a dalších mláďat savců se nachází proteolytický enzym **chymosin** (též rennin), který za účasti Ca^{2+} sráží kasein mléka na parakasein a tím brání rychlému průtoku mléka do tenkého střeva. Parakasein je následně štěpen pepsinem. U dospělých jedinců chymosin zcela chybí.

Tenké střevo

Vstup chymu do duodena aktivuje sekreci **pankreatické šťávy**, která obsahuje řadu trávicích enzymů, jejichž pH optimum se nachází v neutrální až slabě alkalické oblasti. Alkalické pH pankreatické šťávy (pH 7,4-8,3), které je způsobeno vysokou koncentrací HCO_3^- , je důležité rovněž pro neutralizaci žaludeční HCl a inaktivaci pepsinu. Pankreatická šťáva je nejučinnějším trávicím médiem, protože je díky obsahu hydrolytických enzymů schopná trávit všechny druhy živin. Tvorba pankreatické šťávy a sekrece HCO_3^- je stimulována působením hormonu **sekretinu**, který je produkován buňkami duodena, jejunu a částečně i buňkami žaludeční sliznice. Sekrece trávicích enzymů pankreatu a kontrakce žlučníku jsou stimulovány **cholecystokininem** (též pankreozymín).

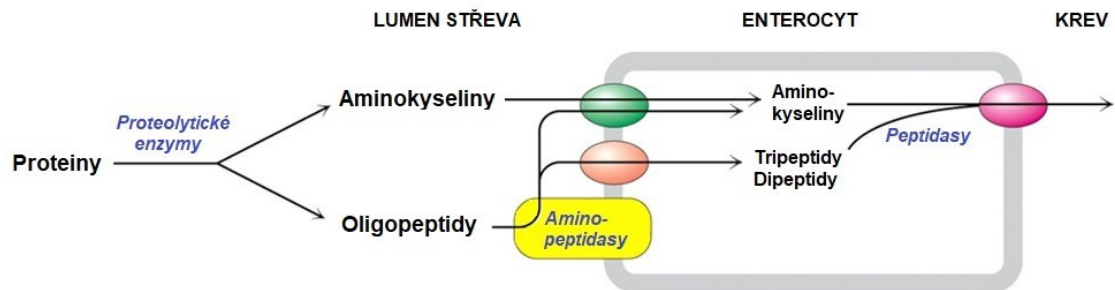
Proteolytické enzymy obsažené v pankreatické šťávě jsou acinárními buňkami pankreatu produkovány ve formě zymogenů. Ty jsou aktivovány proteolytickým odstraněním části své molekuly. Mezi nejvýznamnější peptidasy pankreatické šťávy patří trypsin, chymotrypsin, elastasa a karboxypeptidasy. Sliznice tenkého střeva produkuje enzym **enterokinasu** (též enteropeptidasu), která aktivuje část molekul trypsinogenu na **trypsin**. Trypsin pak autokatalyticky aktivuje další molekuly trypsinogenu, ale též chymotrypsinogen, proelastasu a prokarboxypeptidasu (Obr. 5).



Obr. 5. Aktivace pankreatických zymogenů (upraveno z Berg et al. 2006)

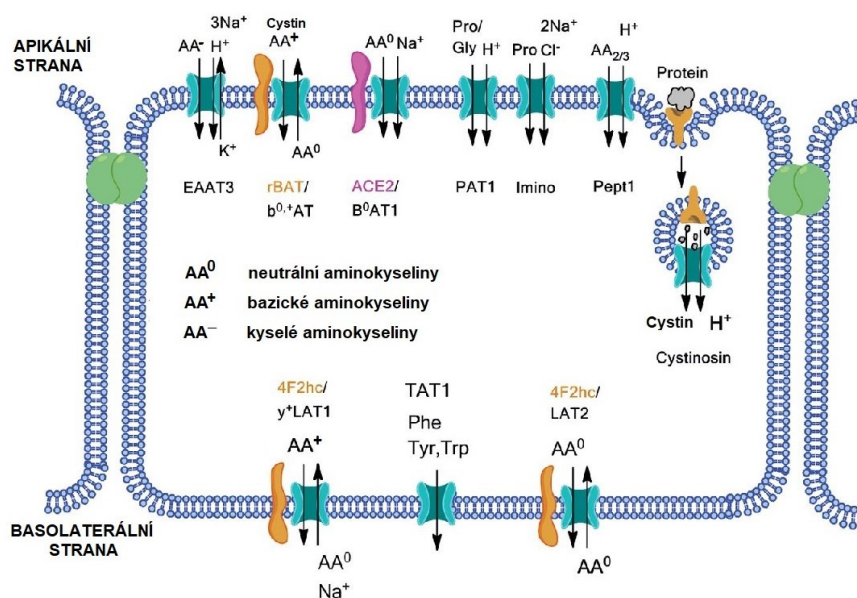
Trypsin, **chymotrypsin** a **elastasa** jsou serinové endopeptidasy, zatímco **karboxypeptidasa** patří mezi exopeptidasy a odštěpuje poslední aminokyselinový zbytek z C-konce proteinu/peptidu. Výsledkem působení těchto enzymů je směs volných aminokyselin a

oligopeptidů. Aminokyseliny jsou transportovány do enterocytů, zatímco oligopeptidy jsou na povrchu buněk kartáčového lemu doštěpeny pomocí **dipeptidas** a **aminopeptidas**. Krátké di- a tripeptidy jsou transportovány do enterocytu systémem PEPT1 a štěpeny na aminokyseliny peptidasami uvnitř těchto buněk (Obr. 6).



Obr. 5. Trávení proteinů v tenkém střevě a vstřebávání vznikajících produktů (upraveno z Berg et al. 2006)

Aminokyseliny vzniklé trávením proteinů v GIT jsou transportovány do enterocytů pomocí řady transportních systémů, z nichž každý přenáší skupinu příbuzných aminokyselin (neutrálních, kyselých, bazických a iminokyselin). Tento transport je aktivní (spotřeba ATP) a jsou známy **Na⁺-dependentní** a **H⁺-dependentní transportéry** (Obr. 7). Jejich umístění na povrch enterocytu se liší. Na apikální straně membrány jsou převážně zastoupeny Na⁺-dependentní transportéry, které zprostředkovávají rychlý a úplný odsun aminokyselin z lumen střeva. Transportéry na bazolaterální straně membrány přenášejí aminokyseliny z enterocytu do řečiště portální žíly. Obdobným mechanismem dochází ke zpětné resorpci aminokyselin v tubulech ledvin.



Obr. 6. Transportní systémy pro aminokyseliny ve střevě (upraveno z Bröer a Palacín 2011)

Kombinací imunochemických a elektron-optických metod bylo prokázáno, že proteiny mohou v nezměněné formě procházet ze střeva do krevního oběhu. Byly popsány dva způsoby

tohoto průchodu. První se odehrává jako transcelulární přenos, kdy se proteiny vážou na membránu mikrokloků, endocytosou jsou přijaty do cytoplasmy enterocytů a exocytosou vypuštěny do krve. Další možností transcelulárního přenosu je transport proteinů pomocí lymfatického systému střev. Střevní epitel obsahuje M-buňky, které transportují enzymy do lymfatické tkáně (Peyerovy plaky), tam se proteiny vážou na lymfocyty, které je lymfatickým systémem dopraví až do krevního řečiště. Druhým, a významnějším, způsobem přenosu proteinů je paracelulární průnik v tzv. „zóně línání“, která vzniká při dočasném defektu po odloupenutí starých enterocytů. Skutečností, že proteiny mohou procházet v nezměněné formě střevní stěnou do krve, se využívá v enzymoterapii.

Poruchy trávení proteinů a vstřebávání aminokyselin v GIT

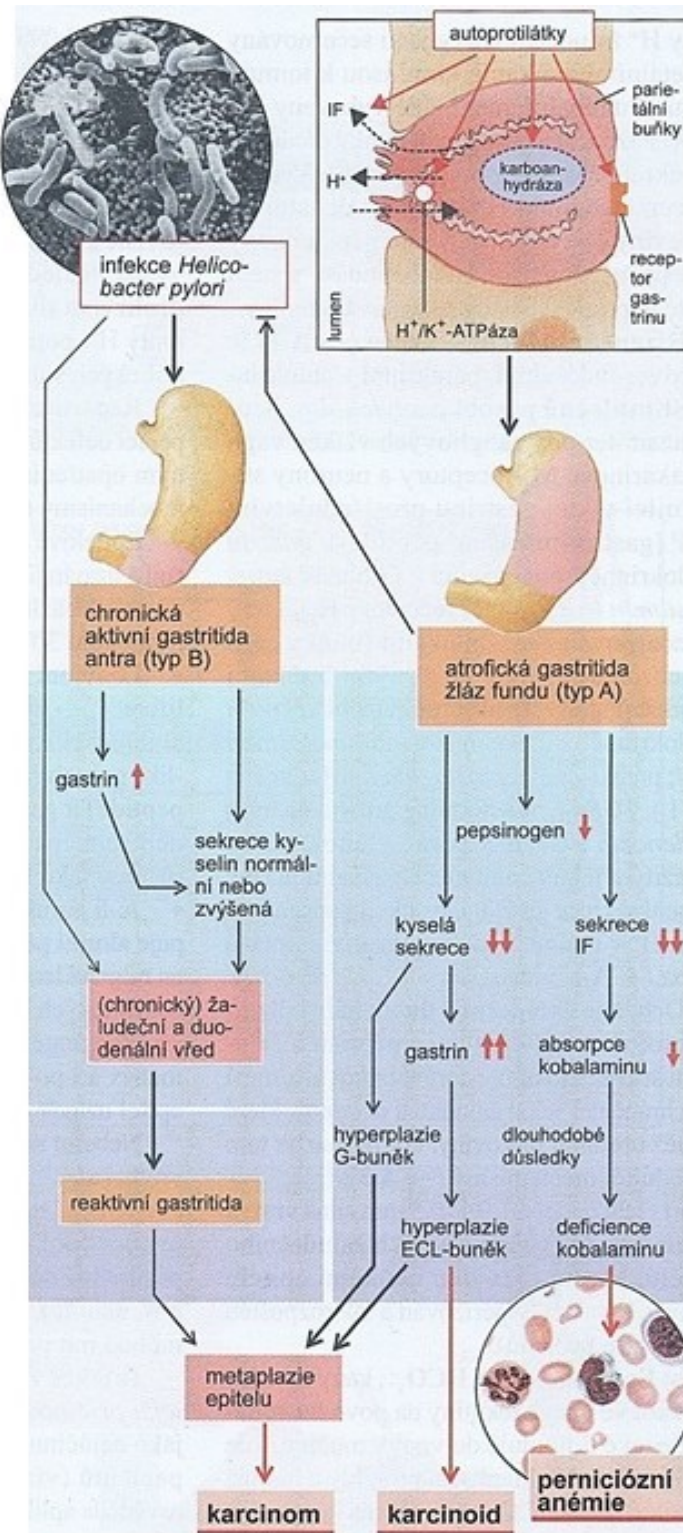
Poruchy trávicí funkce a enzymatického štěpení potravy v GIT se označují jako **maldigesce**, zatímco porucha resorpce rozložených součástí živin z tenkého střeva se nazývá **malabsorpce**. Maldigesce spojená s malabsorpcí (maldigesce obvykle vede k malabsorpci) se označuje společným názvem **malasimilace**. Poruchy trávení a vstřebávání rozdělujeme na poruchy vrozené (izolované enzymové defekty) a poruchy získané (poruchy žaludeční nebo pankreatické sekrece) a mohou zasahovat tři zdroje energie v potravě, tedy sacharidy, lipidy i proteiny, ale i stopové prvky a vitaminy.

Poruchy žaludeční sekrece

Atrofie žaludeční sliznice (**atrofická gastritida, chronická gastritida typu A**) je provázána přítomností autoprotilátek proti součástem a produktům parietálních buněk (např. karboanhydrasa, H^+/K^+ -ATPasa, vnitřní faktor, receptory pro gastrin a mikrosomální lipoproteiny), díky nimž klesá schopnost parietálních buněk tvořit HCl a vnitřní faktor. Při poklesu sekrece HCl (hypochlorhydrie a posléze achlorhydrie) se zvyšuje pH v žaludku a dochází k silnému reaktivnímu vyplavování gastrinu a k potlačení sekrece somatostatinu. Trávení proteinů nebývá zpočátku narušené, protože nedostatečné trávení v žaludku je kompenzováno trávením v tenkém střevě. Postupně je však trávicí funkce střeva přetížena a objevují se poruchy. Při pokračující gastritidě hypertrofují G-buňky produkující gastrin, který má trofický účinek na ECL-buňky produkující histamin, u kterých dochází nejprve k hyperplazii a následně k transformaci v nádorové karcinoidní buňky. Hlavním nebezpečím atrofické gastritidy jsou rozsáhlé metaplazie sliznice, což jsou prekancerózy, z nichž se může vyvinout karcinom žaludku. Vazba kobalaminu na vnitřní faktor či endocytosa komplexu vnitřní faktor-kobalamin mohou být blokovány autoprotilátkami a po delší době se rozvíjí perniciózní anemie (Obr. 7).

U **chronické gastritidy typu B** (Obr. 7) je antrum žaludku často osídleno bakterií *Helicobacter pylori*, ale na etiologii tohoto onemocnění se může podílet i abúzus alkoholu, nesteroidní antiflogistika či reflux žluči. Nejprve dochází vlivem zánětu k poškození antrálních

a D-buněk a tedy k útlumu sekrece somatostatinu, který je provázen hypersekrecí gastrinu a postprandiální hypersekrecí HCl. Tato situace je vhodná pro vznik chronického žaludečního a duodenálního vředu se zvýšenou tvorbou metaplazií epitelu. Po dlouhém působení se rozvine atrofická pangastritida s výraznou atrofií sliznice s nízkou sekrecí gastrinu a hypoaciditou žaludeční šťávy a vysokým rizikem vzniku adenokarcinomu.



Obr. 7. Chronická gastritidu typu A a typu B (upraveno ze Silbernagl a Lang 2012)

Poruchy pankreatické sekrece

Chronická pankreatitis, karcinom pankreatu, cystická fibrosa, nebo resekce pankreatu vyvolávají **malasimilaci všech živin** poruchou tvorby trávicích enzymů (např. trypsin, chymotrypsin, lipasa, kolipasa, α -amylasa) a HCO_3^- , který je nutný k neutralizaci kyselé tráveniny. Následkem nedostatečného trávení proteinů dochází k atrofii svalstva a ztrátě hmotnosti doprovázené hypoproteinemií, která je příčinou edémů. Při vyšetření stolice se najdou nestrávená svalová vlákna.

Následkem sníženého trávení v tenkém střevě jsou nestrávené proteiny ve zvýšené míře nabídnuty jako substráty střevní mikroflóry, jejímž působením se uvolňuje amoniak a sirovodík. Tryptofan je v tlustém střevě degradován na indolové deriváty indoly a skatoly, které jsou příčinou zvýšeného zápachu stolice. Z aromatických aminokyselin se hnitím uvolňují toxické fenoly, které jsou absorbovány do krve a v játrech konjugovány. Lysin, histidin a ornitin jsou dekarboxylovány za vzniku primárních aminů kadaverinu, histaminu a putrescinu.

Malabsorpce aminokyselin

Z biochemického hlediska jsou nejzajímavější vrozené defekty transportu aminokyselin (Tab. 1) přes membránu enterocyty. Jednotlivé přenašeče transportují skupinu příbuzných aminokyselin, takže při vrozeném defektu jednoho přenašeče je narušena resorpce celé příslušné skupiny aminokyselin (izolovaný defekt). U některých chorob může být porušen transport jak ve střevě, tak v ledvinách (generalizovaný defekt), takže jejich nedostatečný příjem potravou je ještě zhoršován ztrátami močí (aminoacidurie).

Tabulka 1. Vrozené malabsorpce aminokyselin

Transportní systém pro:	Transportované AK	Vrozený defekt
Neutrální AK	Ala, Gly, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Asp, His, Cys, Met, citrullin	Hartnupova nemoc
Dibazické AK	Lys, Arg, Orn, cystin	Cystinurie nebo dibazická acidurie
Dikarboxylové AK	Glu, Asp	Dikarboxylová acidurie
Glycin a iminokyseliny	Gly, Pro, OH-Pro	Josephův syndrom nebo glycinurie

Příkladem malabsorpce aminokyselin může být **Hartnupova nemoc** vyvolaná defektem transportu neutrálních aminokyselin v tenkém střevě i v ledvinách. Onemocnění má autosomálně recesivní dědičnost a je provázeno aminoacidurií, deficitem niacinu a přítomností indolových derivátů v moči. U většiny nemocných má asymptomatický průběh. U některých nemocných byly popsány epizody s vyrážkou podobnou pelagře, potížemi s koordinací pohybů (mozečková ataxie) a psychiatrickými symptomy (deprese, psychóza). Tyto epizody jsou obvykle přechodné a bývají vyvolány stresem, horečkou, nebo dalším onemocněním.

Intracelulární degradace proteinů

Tělesné proteiny se neustále obměňují. Zatímco některé proteiny jsou velmi stabilní s dlouhým poločasem rozpadu, jiné mají poločas rozpadu jen v řádu minut. Velmi rychle jsou degradovány **regulatorní proteiny** (např. transkripční faktory). Rozklad těchto proteinů umožní aktivaci, nebo naopak zastavení určité signální dráhy. Rovněž **proteiny s abnormálním složením** (např. mutantní hemoglobiny, výsledek chyb v translaci či skládání, poškozené oxidací či jinou cestou) musí být rychle eliminovány, protože hrozí jejich nahromadění v buňce a tvorba agregátů, které mohou buňku poškodit či zahubit. Posledním důvodem degradace intracelulárních proteinů je **metabolická potřeba**, kdy jsou uvolněné aminokyseliny využity jako zdroj energie. Degradace tkáňových proteinů musí být citlivě regulována.

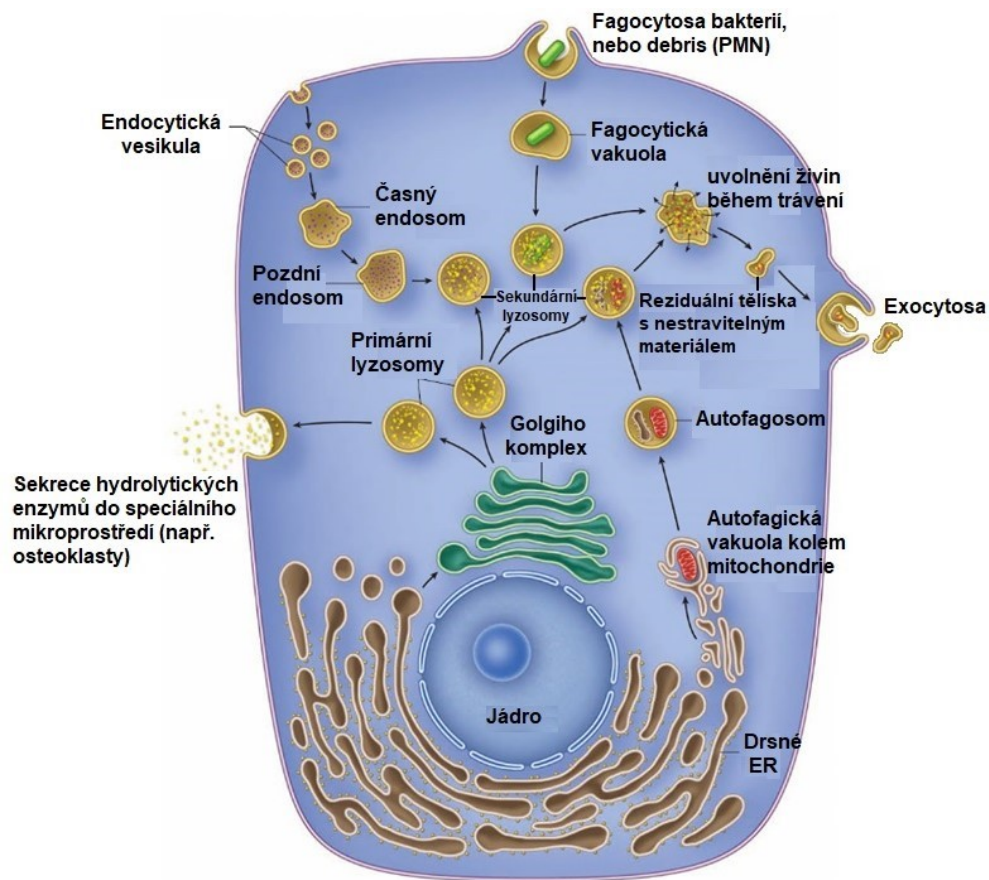
Intracelulární degradace proteinů probíhá buď v lyzosomech, nebo v cytosolu. Extracelulární, membránové a proteiny s dlouhým biologickým poločasem jsou degradovány v **lyzosomech** drahou nezávislou na ATP, zatímco rozklad regulatorních a poškozených proteinů probíhá v **cytosolu** drahou, která je závislá na přísunu ATP a na přítomnosti specifického proteinu – ubikvitinu (UBQ). Kromě těchto dvou nejvýznamnějších drah mohou být intracelulární proteiny štěpeny i pomocí **kalpainů**, což jsou cytolové ATP-dependentní cysteinové peptidasy závislé na Ca^{2+} , které se podílejí na regulaci intracelulárních procesů spojených se změnami v koncentraci Ca^{2+} (např. regulace buněčného cyklu, proteinkinasy C, transkripčních faktorů, přenosu signálu a apoptosy). Posledním typem intracelulární proteolýzy je apoptosa zprostředkovaná cysteinovými peptidasami **kaspasami** (viz. kapitola Patobiochemie nádorů).

Lyzosomální cesta degradace a její poruchy

Lyzosomy jsou cytoplasmatické organely (průměr 20-500 nm) s kyselým pH (pH 3,8-5,0), které mohou nespecificky **degradovat intracelulární** (autofagie) **i extracelulární proteiny** (Obr. 8). Primární lyzosomy vznikají odštěpením z cisteren Golgiho aparátu a části endoplasmatického retikula a obsahují celou řadu hydrolytických enzymů aktivních v **kyselém pH**. To je v lyzosomech udržováno pomocí protonové pumpy H^+ -ATPasy. V lyzosomech je přítomno zhruba 50 hydrolytických enzymů, mezi nimiž převažují kathepsiny, ale nachází se zde i řada specifických enzymů, jako jsou kolagenasa, gelatinasa či dipeptidasa.

Hlavní úlohu v degradaci proteinů hrají **kathepsiny**, které se dělí na několik typů, které patří mezi cysteinové (typ B, C, L, F, H, K, O, S, V, X a W), aspartátové (typ D a E) a serinové (typ A a G) peptidasy. Tyto enzymy se liší buněčnou a tkáňovou distribucí, lokalizací a expresí, biochemickými vlastnostmi (např. pH optimem a specifitou účinku), strukturou a regulací aktivity. Jsou syntetizovány ve formě neaktivních zymogenů, které se aktivují proteolytickým sestřihem v mírně kyselém prostředí endolyzosomu. Kromě nespecifického štěpení proteinů v lyzosomech se některé kathepsiny účastní i specifických buněčných procesů mimo lyzosomy

(např. participují na aktivaci kaspas při apoptose, na obnově kostní hmoty, aktivaci proteas a prohormonů, udržení homeostasy epidermis a aktivitě imunitního systému). Aktivita kathepsinů musí být přísně regulována, protože chyby v tomto procesu jsou spojené se vznikem řady patologií (např. nádorová a neurodegenerativní onemocnění, arthritida, osteoporóza). Mezi možnosti řízení jejich aktivity patří regulace exprese, posttranslační modifikace, aktivace zymogenů, pH, působení endogenních a exogenních inhibitorů, nebo kombinace těchto faktorů. pH optimum kathepsinů se nachází v kyselé oblasti (pH ~ 5), takže ani po vylití obsahu lyzosomů do cytoplasmy, kde je neutrální pH, nehrozí natrávení cytosolických proteinů. Hlavními endogenními inhibitory působení kathepsinů mimo lyzosomy jsou proteiny z rodiny cystatinů, serpinů a thyropinů.



Obr. 8. Vznik lyzosomů a jejich účast v intracelulárním trávicím procesu (upraveno z Mescher 2015)

Poruchy lyzosomální degradace zahrnují jak poruchy se zvýšenou lyzosomální aktivitou, tak poruchy vedoucí ke strádání nerozloženého materiálu vlivem snížené lyzosomální degradace.

Zvýšená lyzosomální degradace může být vyvolána zvýšenou aktivitou lyzosomů (hladovění, diabetes mellitus, úbytek svalové hmoty při denervaci nebo zranění, regrese dělohy po porodu), zvýšeným uvolňováním lyzosomálních enzymů (revmatická arthritida, indukce metastáz u karcinomu mléčné žlázy, kde estrogeny stimulují expresi genu kódujícího kathepsin

D), nebo v důsledku mutace fyziologického inhibitoru kathepsinů (Unverrichtova-Lundborgova nemoc, progresivní myoklonická epilepsie, které je způsobená mutací inhibitoru cysteinových kathepsinů - cystatinu B).

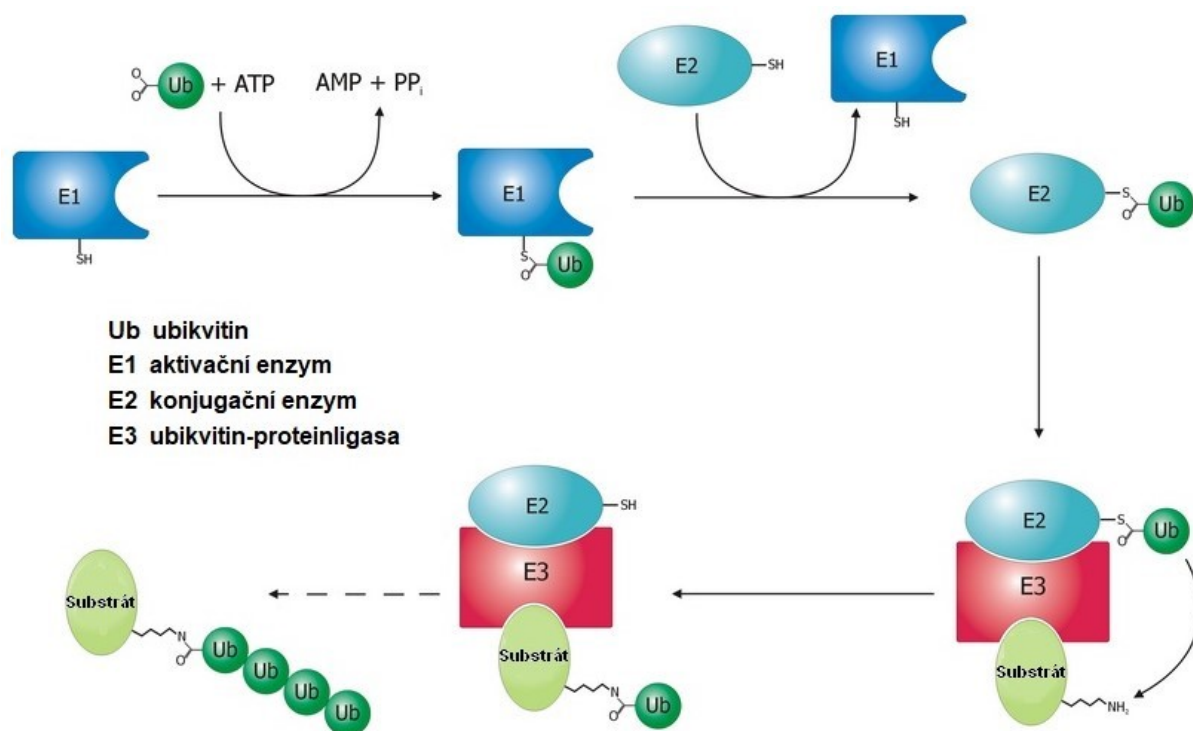
V důsledku nedostatečné aktivity některého lyzosomálního enzymu, aktivátoru nebo transportního proteinu se v lyzosomech hromadí nerozložený odpadní materiál, díky tomu se tvoří velké intracelulární vakuoly a rozvíjí se některé z **lyzomálních střeďavých onemocnění**. Jedná se o skupinu více než 60 progresivních multisystémových onemocnění s autosomálně (vzácně též gonosomálně) recesivní dědičností. Tato onemocnění mají širokou škálu klinických projevů. Závažnost onemocnění závisí na typu hromaděného materiálu a na zbytkové aktivitě enzymu/transportéru. Lyzomální střeďavé poruchy můžeme rozdělit do 5 kategorií na defekty v: degradaci glykanů (glykoproteinů, glykolipidů, glykosaminoglykanů a glykogenu), lipidů, proteinů, lyzomálních transportérech a pohybu lyzosomů („*trafficking*“). Mezi lyzomální střeďavé poruchy tak řadíme celou řadu mukopolysacharidos a lipidosis (např. Gaucherova, Farberova či Niemann-Pickova nemoc), o nichž bylo pojednáno v příslušných kapitolách. **Neuronální ceroid-lipofuscinosy** jsou skupinou neurodegenerativních lyzomálních střeďavých onemocnění, která je charakterizována progresivní ztrátou mentálních, motorických a zrakových schopností, křečemi a brzkou smrtí. V lyzosomech se hromadí pigmentové inkluze ceroidu a lipofuscinu. Tato onemocnění jsou způsobena **mutací** v genu kódujícím některý z **proteinů**, který se podílí na **lyzomální degradaci proteinů**. Kauzální terapie zatím není známa a prognóza je špatná. Mezi **lyzomální poruchy degradace proteinů** patří **pyknodysostosis** (též Toulouse-Lautrec syndrom) způsobená **deficitem kathepsinu K**, který se projevuje malým vzrůstem s postižením končetin (z řečtiny *dys-* = porucha a *osteon* = kost) a generalizovanou osteosklerosou (z řečtiny *pyknos* = hustý). Postižení mají krátké a tlusté prsty, potížemi s výměnou zubů a husté, ale křehké kosti. Tímto onemocněním trpěl i slavný francouzský malíř Henri de Toulouse-Lautrec, po němž je tento syndrom rovněž nazýván. **Papillonův-Lefèvrův syndrom**, vzácný syndrom s palmoplantární hyperkeratosou a těžkou periodontitidou, je způsoben **mutací genu pro kathepsin C**. Vlivem deficitu kathepsinu C nejsou aktivovány granzymy, serinové peptidasy pocházející z NK-buněk a cytotoxických T-lymfocytů, které spouštějí apoptosu v cílových buňkách.

Cytosolická cesta degradace a její poruchy

Kvantitativně významnější drahou intracelulárního katabolismu proteinů je tzv. **ubikvitin-dependentní proteolýza**, která se uskutečňuje v **proteasomech**. Uplatňuje se např. při regulaci genové exprese proteolýzou specifických chromosomálních proteinů, při regulaci mitotického cyklu, při degradaci abnormálních proteinů a při rozkladu kontraktilních proteinů kosterního svalstva u proteokatabolických stavů. Jedná se o selektivní degradaci probíhající v cytoplasmě za účasti ATP. Nezastupitelnou úlohu v tomto procesu hraje krátký protein **ubikvitin** (76 aminokyselin) s vysoce konzervovanou primární strukturou (rozdíl mezi ubikvitinem člověka a kvasinky jsou jen 3 aminokyseliny), který je přítomný ve všech

eukaryontních buňkách. Ubikvitin se váže na ϵ -aminoskupiny lysinových zbytků proteinů, které jsou určeny k degradaci. Jeho připojení je katalyzováno specifickými ligasami. K tomu, aby byl protein rozštěpen, musí být k jeho struktuře připojeny minimálně čtyři molekuly ubikvitinu. Takto označený protein je rozpoznán a selektivně degradován v proteasomu, což je makromolekulární komplex složený z podjednotek s různou proteasovou aktivitou.

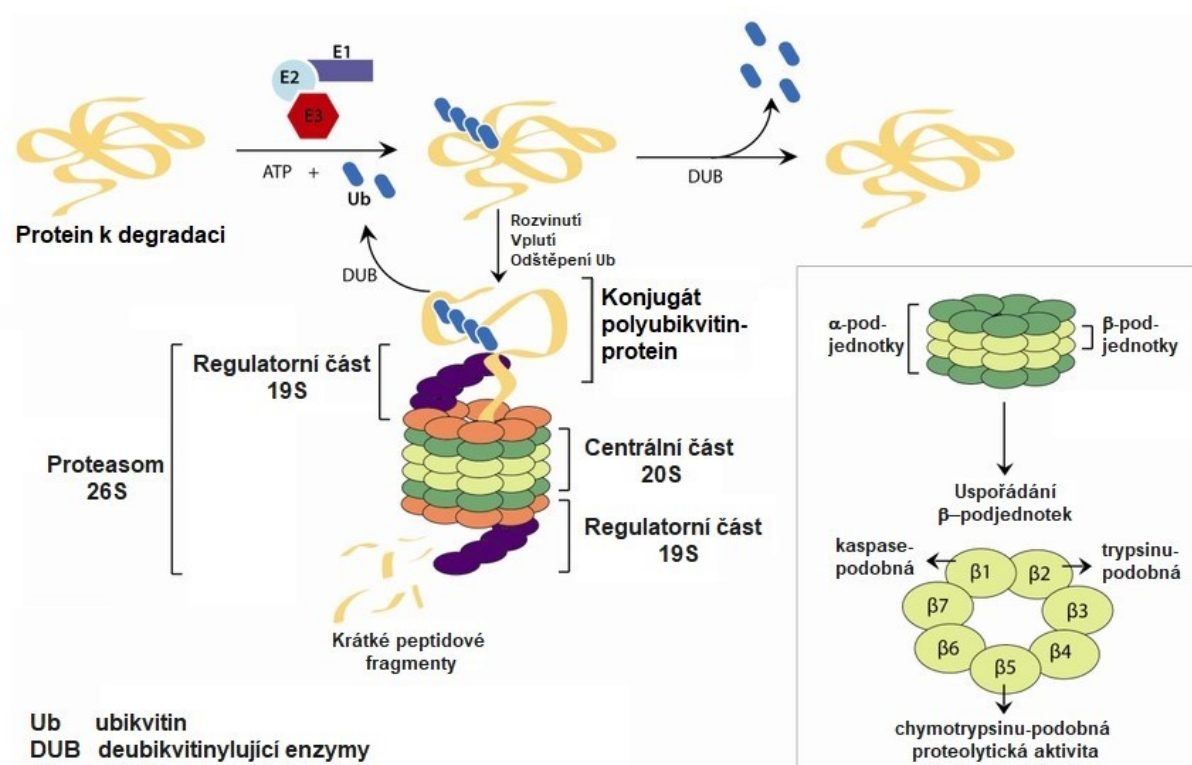
Při ubikvitinylaci proteinů (Obr. 9) dochází v prvním kroku k aktivaci molekuly ubikvitinu za pomoci ATP (přechodně vzniká ubikvitin-AMP) a jeho připojení na thiolovou skupinu **aktivačního enzymu E1**. Aktivovaný ubikvitin je následně přenesen na katalytický cystein **konjugačního enzymu E2**. Komplex E2-ubikvitin je rozeznán enzymem E3 **ubikvitin-proteinligasou**, která vybírá substrát (tedy protein k degradaci) a připojuje na něj ubikvitin. Vznik polyubikvitových řetězců je umožněn opakováním tohoto postupu. Je znám jeden enzym E1, několik desítek enzymů E2 a několik stovek enzymů E3, které mohou ubikvitinylovat tisíce různých substrátů. Za širokou substrátovou specifitu ubikvitinylačního systému je tedy zodpovědný enzym E3. Jednotlivé enzymy E3 mohou spolupracovat jen s některými E2, zatímco proteinové substráty mohou být označeny různými kombinacemi enzymů E2 a E3. Ubikvitinylace je modulována systémem **deubikvitinylujících enzymů**. Výsledkem je velká specifita a cílené odbourávání jednotlivých proteinů či jejich tříd.



Obr. 9. Mechanismus aktivace a připojení ubikvitinu k proteinu (upraveno z Berg et al. 2006)

Proteolytická degradace označených proteinů probíhá v **proteasomu** (Obr. 10), což je komplex z velkého množství podjednotek s různou katalytickou aktivitou. Proteasom (26S) je tvořen dvěma subkomplexy – centrální částí (20S, „*core particle*“) s proteolytickou aktivitou a regulační částí (19S, „*regulatory particle*“). Uvnitř **centrální části**, která má soudkovitý tvar a

je složená ze čtyř prstenců (dva identické α a dva identické β prstence), dochází k degradaci proteinů. Každý prsteneček je tvořený sedmi různými podjednotkami. Na obou koncích centrální části je umístěna **regulatoční část**, která tvoří jakési víčko/čepičku. Tato část je zodpovědná za rozeznávání polyubikvitinového řetězce, jeho odštěpení, rozvinutí degradovaného proteinu do lineární podoby a jeho vstup do centrální části proteasomu. Molekuly **ubikvitinu** jsou **recyklovány** a znovu použity. Rozvolněné a ubikvitinu zbavené substráty jsou pak v centrální části proteasomu postupně hydrolyzovány za spotřeby ATP na peptidy, které jsou po uvolnění do cytosolu hydrolyzovány dalšími enzymy. Za objev tohoto mechanismu degradace proteinů obdrželi v roce 2004 Nobelovu cenu za chemii vědci Aaron Ciechanover, Avram Hershko a Irvin Rose.



Obr. 10. Ubikvitin-proteasomová cesta degradace proteinů (upraveno z Mattern et al. 2014)

Poruchy ubikvitin-proteasomové cesty (UPS) degradace jsou spojeny mimo jiné se vznikem malignit, neurodegenerativních a renálních onemocnění. Mechanismy, které mohou způsobit změny v ubikvitin-dependentní proteolýze, zahrnují: 1) mutaci nebo delecii substrátu (např. delecii místa pro vazbu ubikvitinu) vedoucí ke zvýšené či snížené degradaci cílového proteinu; 2) mutaci v genech kódujících součásti UPS způsobující změny v jejich expresi; 3) interakci mezi transkripčními faktory, která změní expresi součásti UPS; 4) přítomnost externích faktorů (např. hormony, cytokiny, hypoxie), které regulují aktivitu UPS přímo, nebo prostřednictvím počátečních kroků vedoucích k degradaci substrátu; 5) expresi dalšího faktoru, který urychlí, nebo zpomalí průběh celé dráhy.

Následkem **zpomalení ubiquitin-proteasomové degradace proteinů** dochází k patologickému hromadění nerozložených proteinů. Příkladem může být **Liddleův syndrom**, u kterého způsobí bodová mutace v genu kódujícím β nebo γ podjednotku renálního epiteliálního kanálu pro Na^+ ionty změnu ve struktuře a aminokyselinovém složení výsledného proteinu. Mutantní protein pak neobsahuje vazebné místo pro ubiquitin-proteinligasu a patologicky se hromadí v membránách renálních buněk. Navíc vede mutace ke zvýšené reabsorpci Na^+ , která je nezávislá na aldosteronu. Liddleův syndrom se projevuje časným nástupem těžké hypertenze, hypokalemií, metabolickou alkalosou a nízkými plasmatickými hladinami reninu a aldosteronu. Neurodegenerativní onemocnění jsou charakterizována tvorbou deposit agregovaných a chybně složených proteinů v cytoplasmě, jádře, a/nebo v extracelulárním prostoru. Tyto nahromaděné proteiny mohou negativně ovlivnit fungování buňky i tkáně. Příčinou **juvenilní Parkinsonovy nemoci** je mutace v genu *PARK2*, který kóduje ubiquitin-proteinligasu (parkin). Mutovaný enzym má pak nižší aktivitu, dochází k hromadění neurotoxických proteinů v inkluzích s následnou degenerací dopaminergních neuronů v *substantia nigra*. Onemocnění se projevuje časným nástupem příznaků Parkinsonovy nemoci (např. bradykineze, tremor, rigidita, posturální nestabilita). **Nádorová onemocnění** mohou být vyvolána nedostatečným odbouráváním onkoproteinů (produktů onkogenů), které vyvolávají vznik a podporují růst nádorů. K tomu může dojít, pokud onkoproteiny uniknou degradaci v UPS kvůli mutaci v onkogenu, nebo v některé ze součástí UPS, která je zodpovědná za rozpoznání či ubiquitinylaci onkoproteinu. Patologické nahromadění onkoproteinů podporuje růst a viabilitu nádorových buněk a progresi nádorového onemocnění.

Zrychlené odbourávání proteinů v UPS se projeví nedostatkem funkčního proteinu. Zrychlená degradace tumor-supresorových proteinů může vyvolat vznik **nádorového onemocnění**. Tumor-supresorový protein p53 hraje významnou úlohu v ochraně buněk před maligní transformací. Onkoprotein E6 z lidského papillomaviru, který je původcem karcinomu děložního čípku, vytváří komplex s lidským p53 a ubiquitin-proteinligasou, a tak podporuje ubiquitinylaci a následnou degradaci proteinu p53. Vysoká exprese některých ubiquitin-proteinligas je spojená s nádorovými onemocněními, např. u metastáz nemalobuněčného karcinomu plic byla popsána vysoká exprese Skp2, která odbourává inhibitory cyklin-dependentních kinas. Použití **inhibitorů proteasomu** (např. **bortezomibu**) je jedním z terapeutických přístupů k léčbě nádorových onemocnění. Bortezomib je prvním lékem cílícím na proteasom, který byl schválen k léčbě mnohočetného myelomu u lidí.

Použitá literatura

Baskin KK, Taegtmeyer H (2011) Taking pressure off the heart: the ins and outs of atrophic remodelling. *Cardiovasc Res.* 90:243-50.

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2006) *Biochemistry*. 6th edition. W. H. Freeman, New York, 1050 pp.
- Bröer S, Palacín M (2011) The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases. *Biochem J*. 436: 193-211.
- Harvey R, Ferrier D (2011) *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*. 5th edition. Wolters Kluwer, Baltimore, 520 pp.
- Holeček M (2006) *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vydání. Grada, Praha, 286 s.
- Horton RA, Moran LA, Scrimgeour G, Perry M, Rawn D (2006) *Principles of Biochemistry*. 4th edition. Pearson Prentice Hall, 896 pp.
- Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J (2004) *Biochemie pro studující medicíny I. a II. díl*. 1. vydání. Karolinum, Praha, 562 s.
- Lorkowski G (2012) Gastrointestinal absorption and biological activities of serine and cysteine proteases of animal and plant origin: Review on absorption of serine and cysteine proteases. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 4:10-27.
- Mattern MR, Eddins MJ, Agarwal S, Sterner DE, Kodrasov MP, Suresh Kumar KG, Wu J, Nicholson B (2014) Proteasome Inhibitors Versus E3 Ligase Inhibitors for Cancer Therapy. *In: Ping Dou Q (ed.) Resistance to Proteasome Inhibitors in Cancer*. 1st edition. Springer, Cham, pp. 291-316.
- Mescher AL (2015) *Junqueira's Basic Histology*. 14th edition. McGraw-Hill Education, New York, 572 pp.
- Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA (2012) *Harperova ilustrovaná biochemie*, 5. vydání, Galén, Praha, 730 s.
- Silbernagl S, Lang F (2012) *Atlas patofyziologie*. 2. vydání. Grada, Praha, 416 s.
- Stoka V, Turk V, Turk B (2016) Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*. 32:22-37.