

Úloha proteolýzy v lidském těle

Kučerová, Z.

Ústav patologické fyziologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

SOUHRN

Předmětem tohoto článku je shrnutí znalostí z poslední doby o úloze proteolytických enzymů v lidském těle. Proteolytické enzymy kontrolují buněčný cyklus, štěpí peptidovou vazbu, hrají klíčovou úlohu v mnoha patofyziologických procesech, a jsou cílem terapeutické strategie. Souhrnný článek popisuje a) úlohu těchto enzymů za fyziologických stavů, b) dysregulaci proteáz, která je spojena s různými typy onemocnění a c) možnosti použití proteáz jako biomarkerů určitých onemocnění, především rakovinných. Proteázy hrají zásadní úlohu ve většině biologických procesů jako je vývoj, diferenciací a buněčná migrace. Důležitou úlohou proteáz je konverze inaktivních proproteinů, nebo peptidů, do formy s výraznou biologickou aktivitou. Hlavní funkcí proteáz je štěpení proteinů a peptidů, a proto musí být jejich činnost pečlivě kontrolována; základní principy regulace jsou limitovaná proteolýza a inhibice specifickými inhibitory. Základní znalosti o regulačním mechanismu proteáz jsou nezbytné v analýze patofyziologie zánětlivých i genetických onemocnění, invazivních a metastatických mechanismů maligní neoplasie, a dalších. Jednotlivé enzymy mohou určovat terapeutickou strategii.

Klíčová slova: Proteázy, Funkce, Dysregulace, Onemocnění, Biomarkery.

SUMMARY

Kučerová Z.: The role of proteolysis in organism

The aim of this paper is summarize information about the role of proteolytic enzymes in the human body up to date. Proteolytic enzymes control of the cell cycle, cleave peptide bonds, play key roles in many pathophysiological processes, and are targets for therapeutic strategies. This review shows the role these enzymes at 1st physiological state, 2nd dysregulation of proteolysis associated with different diseases and 3rd proteases as potential biomarkers that can be used for diagnostic purposes. Proteases play critical roles in a plethora of biological processes such as development, differentiation and cell migration. The essential role of proteases is large number conversion reactions from an inactive precursor into a biologically active principle. Since the function of a proteases is to cleave proteins and peptides, their action could be controlled. Human plasma proteinase inhibitors and limited proteolysis are important for regulation. Basic knowledge of mechanism of regulation by proteases are essential to analysis of number of pathologies, such as cardiovascular diseases, inflammation, cancer, and neurodegenerative diseases, thereby suggesting proteases as suitable and valuable drug targets.

Keywords: Protease, Function of Proteases, Dysregulation, Disease, Biomarker.

Úvod

Proteolytické štěpení je přítomno ve všech buněčných aktivitách od regulace genů po regulaci buněčného cyklu [1]. Proteinázy štěpí peptidovou vazbu uvnitř bílkoviny. Normální funkce proteáz je spojena s konverzí makromolekulárních substrátů na malé fragmenty, které jsou dále degradovány na jednoduché aminokyseliny. Tyto metabolity jsou zdrojem energie, nebo se vrací pro další resyntézu nových bílkovin. Velmi důležitá úloha proteáz je konverze inaktivních proproteinů do formy s výraznou biologickou aktivitou. Na př. konverze zymogenů na aktivní enzymy nebo prohormonů na hormony. Fyziologické požadavky proteolytických enzymů způsobují, že jejich vlastní aktivita musí být regulována. Aktivace zymogenů limitovanou proteolýzou je jedním ze dvou základních principů regulace proteáz. Druhým je inhibice specifickými inhibitory. Zatímco aktivace zymogenů indukuje aktivitu konformační změnou molekuly pomocí rozštěpení specifické peptidové vazby, inhibitory proteáz ovlivňují aktivitu vazbou na aktivní místo enzymu. Proteázy se nalézají uvnitř každé buňky. Hrají zásadní roli ve většině biologických procesů jako je vývoj, diferenciací a buněčná migrace, imunita, hojení ran, buněčná smrt. Špatná funkce těchto enzymů může způsobit celou řadu lidských onemocnění [2].

V širokém spektru fyziologických procesů mají proteázy regulační úlohu. Regulační požadavky limitované proteolýzy mají tedy funkční důležitost. Limitovaná proteolýza je mechanismus zodpovědný za přeměnu neaktivních prekurzorů na látky s biologickou aktivitou. Mnoho fyziologických reakcí, spojených s odštěpením větších či menších peptidů z velkých bílkovinných prekurzorů závisí právě na specifickém štěpení peptidové vazby (odštěpení signálních peptidů během přenosu vznikajících peptidových řetězců přes endoplasmatické retikulum, nebo přes membrány bakterií, dále při segmentaci translačních produktů polycystronické mRNA nebo při biosyntéze picornavirů, tvořících bílkovinné prekursory peptidových hormonů, nebo při aktivaci nejrozličnějších enzymů). Proteázy kontrolují široké spektrum fyziologických procesů, nezbytných pro život. Aktivita většiny enzymů je určována na post-translační úrovni mnoha faktory. Důležitou úlohu hrají proteolytické enzymy při štěpení a rekonstituci extracelulární matrix (ECM) u širokého spektra fyziologických i patofyziologických procesů. Jsou klíčovými signálními molekulami jak v normálních fyziologických procesech, tak u různých onemocnění. Proteázová aktivita je velmi přísně kontrolována. Inhibitory proteáz obsažené v krevní plasmě se podílejí na regulaci biologické aktivity (na př. při koagulaci, fibrinolýze, aktivitě komplementu a dalších).

Různé typy zánětlivých onemocnění, rakovinných onemocnění, včetně metastáz a dalších chorob, jsou spojeny s dysregulací proteolýzy [3]. Základní znalosti o regulačním mechanismu proteáz jsou nezbytné při analýze patofyziologie zánětlivých onemocnění, invazivních a metastatických mechanismů maligní neoplasie, genetických onemocnění.

Klasifikace proteáz

Rozdíly mezi jednotlivými proteázami jsou založeny na substrátové specifitě. Ačkoliv současná databáze zahrnuje několik dalších podskupin např. glutamové, asparaginové, threoninové a směsné, hlavními skupinami zůstávají serinové, cysteinové, aspartátové proteínázy a metaloproteínázy [4].

Endopeptidázy

Proteínázy, které štěpí vnitřní vazbu mezi aminokyseliny zbytky dělíme na:

1. serinové proteínázy (EC 3.4.21). Aktivní místo obsahuje serin nebo histidin, pH optimum pH 7-9; patří mezi ně trypsin, chymotrypsin, trombin, plazmin
2. cysteinové (thiolové) proteínázy (EC 3.4.22). V aktivním místě cystein, pH optimum 4-7; patří sem katepsiny, kaspazy, kalpain, papain, bromelain
3. aspartátové proteínázy (EC 3.4.23). V aktivním místě dvě kyseliny asparagové, pH optimum pod pH 5, pepsin, gastricsin, rennin, katepsiny D a E
4. metaloproteínázy (EC 3.4.24). V aktivním místě je přítomen kovový ion nutný pro katalýzu, pH optimum 7-9, MMP, kolagenáza, gelatináza.

Exopeptidázy

Odštěpí jednu nebo dvě aminokyseliny z N-konce nebo C-konce peptidového řetězce a dělíme je dále na:

1. aminopeptidázy (EC 3.4.11) odštěpí jednu aminokyselinu z N-konce polypeptidového řetězce
2. dipeptidylpeptidázy (EC 3.4.14) odštěpí dipeptid z N-konce polypeptidového řetězce
3. carboxypeptidázy (EC 3.4.16,17) odštěpí jednu aminokyselinu z C-konce polypeptidového řetězce
4. peptidylpeptidázy (EC 3.4.15) odštěpí dipeptid z C-konce polypeptidového řetězce dipeptidázy (EC 3.4.13). štěpí dipeptidy na jednotlivé aminokyseliny.

Proteázy v lidském organismu

Proteázy regulují široké spektrum fyziologických dějů, hrají důležitou úlohu nejen v zažívacím traktu, ale rovněž při koagulaci, při apoptóze a zánětech. Regulační požadavky limitované proteolýzy mají funkční důležitost.

Pro biologickou funkci krevní koagulace, fibrinolýzy a při aktivaci komplementu jsou nezbytné serinové proteínázy. Většina koagulačních faktorů jsou právě serinové proteínázy. Krevní koagulace je systém, ve kterém je

série zymogenů serinových proteáz postupně aktivována. Poslední v kaskádě je trombin, který je klíčový pro celou řadu důležitých dějů: pro transformaci rozpustného fibrinogenu na fibrin, při aktivaci faktoru XIII, který stabilizuje krevní sraženinu (koagulum), v agregaci destiček. Další důležitou serinovou proteázou je klíčový enzym fibrinolytické kaskády plazmin (jeho zymogen je plazminogen). Kromě fibrinolýzy má plazmin ještě celou řadu dalších důležitých funkcí; ovlivňuje produkci cytokinů, ROS, zánětlivá a autoimunitní onemocnění [5]. Plazminogen aktivátory štěpí plazminogen na plazmin, aktivátory plazminogenu jsou dva, a) tkáňový (tPA), který generuje plazmin pro trombolýzu a v absenci fibrinu je enzym neúčinný, a b) urokinázový (uPA), který generuje plazmin degradující ECM [6]. Další serinová proteínáza lidský kalikrein, účinkující rovněž v kaskádě, se nachází na příklad v kůži nebo ve spermatu [7]. Serinové proteázy chymotrypsin a trypsin působí v zažívacím traktu.

Cysteinové proteínázy - katepsiny byly nalezeny v lyzozómech, jsou to důležité regulátory a signální molekuly [8]. Kalpain, cysteinová proteáza, která se v lyzozómech nenachází, ovlivňuje strukturu a funkci svalu [9]. Ústřední biochemickou podobou apoptózy je proteolytické štěpení limitovaného množství celulárních bílkovin. Hlavními enzymy tohoto procesu jsou cysteinové proteázy zvané kaspázy [10].

Metaloproteínázy (MMPs) jsou metal (Zn) dependentní endoproteínázy degradující extracelulární matrix. Jsou sekretovány a vázány na membráně. Ve fyziologických procesech hrají významnou roli, regulují řadu biologických dějů na příklad vývoj embrya, zánětlivé procesy, imunitní odpovědi. Přítomnost MMPs je popsána v angiogenezi a remodelaci tkání [11]. Také metaloproteínázy působí v kaskádě. Regulace aktivity MMPs se vyskytuje na několika úrovních včetně kontroly transkripce genu, aktivace proenzymů, inhibice aktivovaných MMPs endogenními faktory. MMPs působí při proliferaci, diferenciaci, apoptóze; regulují aktivitu nejen jiných MMPs, ale i dalších proteínáz.

Renin je aspartátová proteínáza, která působí na angiotenzinogen v krevní plasmě. Systém renin-angiotenzin se uplatňuje v regulaci krevního tlaku. Aspartátová proteáza katepsin D, která je přítomna ve většině buněk a tkání lidského organismu, se účastní katabolismu bílkovin, hormonů a antigenů. Aspartátová proteáza BACE ovlivňuje Alzheimerovu chorobu [12]. Aspartátové proteínázy pepsin a gastricsin hrají důležitou úlohu v zažívacím traktu. Lidská žaludeční sliznice obsahuje vysokou koncentraci a širokou škálu těchto enzymů a jejich zymogenů. Katepsin E se nalézá v lidských žaludečních buňkách [13], ale je produkován jinými buňkami než pepsin a gastricsin.

Dysregulace

Důležité jsou znalosti o regulačním mechanismu proteáz. Maligní, genetická, a infekční onemocnění mohou být způsobena právě špatnou regulací proteáz. Vlastní podstata rakovinných onemocnění je dysregula-

ce proteáz. Proteázy regulují celou řadu fyziologických procesů, které jsou pro život nezbytné. U mnoha patologických stavů byla zjištěna jako kritická imbalance jejich aktivity. Nejruznější typy rakoviny a metastáz jsou spojeny se špatnou regulací proteolýzy [3].

Dysregulace fibrinolýzy se projevuje tvorbou trombů nebo naopak krvácením. Tendence ke krvácení je způsobena zvýšenou trombolýzou, zvýšením hladiny tPA, případně deficiencí inhibitorů (PAI, antiplazmin) a naopak tvorba trombů je způsobena defektní syntézou nebo ztrátou tPA, funkční abnormalitou v aktivaci plazminogenu případně vzrůstem hladiny inhibitorů tPA nebo plazminu. Zvýšená hladina trombinu byla nalezena u některých zánětů [14]. Dysregulace katepsinů byla zjištěna u Alzheimerovy choroby, při zánětech, revmatoidní artritidě a osteoartritidě, roztroušené skleróze, svalové dystrofii, pankreatitidě, jaterních, srdečních a plicních onemocněních, diabetu a rakovině [15].

Špatná regulace apoptózy způsobuje renální selhání, cévní onemocnění, rakovinu, neoplastické, autoimunitní a neurodegenerativní choroby [16]. Porozumění regulaci kaspáz umožňuje manipulovat apoptózu.

Renin participuje v normální kardiovaskulární homeostáze, v kompenzaci srdečního selhání, cirhóze a v patogenezi renovaskulární hypertenze u lidí [17].

MMPs (matrix metaloproteinázy) působí při proliferaci, diferenciaci, apoptóze; regulují aktivitu nejen MMP, ale i dalších proteáz a jejich dysregulace vede k výskytu zánětů, rakoviny, infekčních, autoimunitních a kardiovaskulárních chorob [11]. Štěpení extracelulární matrix je základem pro invazi rakoviny a pro metastázy. Degradace ECM probíhá v kaskádě proteolýzy: aspartátová proteináza (katepsin D) aktivuje cysteinovou (katepsin B), který může aktivovat uPA a ten pak plazminogen [11,18].

Biomarkery

Spolehlivými ukazateli biochemických, histologických, morfologických a fyziologických změn v celém organismu jsou biomarkery. Specifické biomarkery dokáží předpovědět výsledek onemocnění v době, kdy ještě nejsou patrné klinické příznaky [19]. Jako biomarkery často slouží proteázy. Prognostické hodnoty cysteinových a serinových proteáz byly popsány pro karcinom žaludku, pankreatu nebo hepatocelulární karcinom [4]. Plazminogen aktivátor a jeho inhibitor jsou používány jako biomarkery rakoviny prsu [20], hladina kalpainu se mění u celé řady rakovinných onemocnění [21] a kalikreiny slouží jako biomarkery rakoviny prostaty, vaječníků, prsu, plic [22]. Inhibitor cysteinových proteáz cystatin C je používán jako biomarker glomerulární filtrace [23].

Metaloproteinázy slouží jako biomarkery celé řady rakovinných onemocnění od rakoviny prsu, po karcinomy mozku, plic, kůže, urogenitální a další [11]. Stromelysin (MMP-3) byl popsán jako důležitý faktor ve vývoji astma, aneurisma, Alzheimerovy choroby a karcinomu [24]. Neurofilní lipokalin vázaný na gelatinázu slouží jako biomarker kardiovaskulárních onemocnění [25].

Lidské pepsinogeny jsou sérologické markery pro screening atrofické gastritidy a rakoviny žaludku [26, 27]. Detekce specifických plazmatických biomarkerů, speciálně poměru pepsinogenů A/C může napomoci včasné diagnóze rakoviny žaludku [28]. Pepsinogen C je používán jako biomarker rakoviny prostaty [29]. Katepsin D byl zjištěn např. u neoplasie a neurodegenerativních změn [30]. Katepsin E je popisován jako diagnostický marker rakoviny pankreatu, žaludku, plic [13].

Pro uplatnění biomarkerů v klinické praxi je důležitá standardizace měření. Pro každý test je nutná studie diagnostické efektivity, která určí diagnostickou senzitivitu, specifickou a prediktivní hodnoty testů.

Závěr

Proteázy hrají zásadní úlohu ve většině biologických procesů jako je vývoj, diferenciaci, buněčná migrace. Proteázy kontrolují širokou oblast nejruznějších fyziologických procesů kritických pro život, včetně buněčného cyklu, buněčné smrti, imunitní odpovědi, hojení ran, recyklace organel a štěpení bílkovin potravy. Jejich činnost je přísně kontrolována a jejich dysbalance byla nalezena jako kritická pro celou řadu patologických stavů jako jsou kardiovaskulární choroby, zánět, rakovina, neurodegenerativní onemocnění. Ze všech těchto důvodů mohou být proteázy vhodným cílem pro přípravu léků. U některých chorob slouží proteázy jako biomarkery.

Literatura

1. **duVerle, D., A., Mamitsuka, H.** A review of statistical methods for prediction of proteolytic cleavage. *Brief Bioinform.*, 2012, 13, p.337-49.
2. **Zhang, F., Paterson, A. J., Huang, P., Wang, K., Kudlow, J. E.** Metabolic Control of Proteasome. *Physiology*, 2007, 22, p. 373-379.
3. **Craik, C. S., Page, M. J., Madison, E. L.** Proteases as therapeutics. *Biochem. J.*, 2011, 435, p.1-16.
4. **Herszényi, L., Barabás, L., Hritz, I., István, G., Tullassay, Z.** Impact of proteolytic enzymes in colorectal cancer development and progression. *World J Gastroenterol.*, 2014, 20, p.13246-57.
5. **Syrovets, T., Lunov, L., Simmet, T.** Plasmin as a pro-inflammatory cell activator. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, 92, p. 509-519.
6. **Law, R. H. P., Abu-Ssaydeh, D., Whisstock, J., C.** New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin systém. *Current Opinion in Structural Biology*, 2013, 23, p. 836-841.
7. **Pampalakis, G., Sotiropoulou, G.** Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007, 1776, p.22-31.
8. **Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., Turk, D.** Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1824, p. 68-88.
9. **Potz, B. A., Abid, M. R., Sellke, F. W.** Role of Calpain in Pathogenesis of Human Disease Processes. *J Nat Sci.*, 2016; 2(9), e218.

10. **Fernández, D. J., Lamkanfi, M.** Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. Review *Biol. Chem.* 2015, 396, p.193–203.
11. **Klein, T., Bischoff R.** Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. *J Proteome Res.* 2011, 10(1), p.17-33.
12. **Kandalepas, P. C., Vassar, R.** The Normal and Pathologic Roles Secretase, BACE1. *Curr. Alzheimer Res.*, 2014, 11, p. 441–449.
13. **Zaidi, N., Kalbacher, H. Cathepsin E.** A mini review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 367, p. 517–522.
14. **Ma, L., Dorling, A.** The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol* 2012, 34, p.63–72.
15. **Aggarwal, N., Sloane, B. F.** Cathepsin B. multiple roles in cancer. *Proteomics Clin Appl.* 2014, 8, p.427-37.
16. **Galluzzi, L., Lo´pez-Soto, A., Sharad Kumar, S., Kroemer, G.** Caspases Connect Cell-Death Signaling Organismal Homeostasis. *Immunity* 2016, 44, p. 221-231.
17. **Ujil, E., Roksnoer, L. C. W., Hoorn, E. J., Danser A. H. J.** From ARB to ARNI in Cardiovascular Control. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2016, 8, p.86-96.
18. **Kapoor, C., Vaidya, S., Wadhwan, V., Hitesh, Kaur, G., Pathak A.** Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Can. Res. Ther.*, 2016, 12(1), p. 28-35.
19. **Strimbu, K., Tavel, J. A.** What are Biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* 2010, 5(6), p.463–466.
20. **Duffy, M. J., McGowan, P. M., Harbeck, N., Thomsen, C., Schmitt, M.** uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res.*, 2014, 16(4), p. 428-438.
21. **Leloup, L., Wells, A.** Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert Opin. Ther. Targets.*, 2011, 15, p. 309-23.
22. **Paliouras, M., Borgono, C., Diamandis, E. P.** Human tissue kallikreins: The cancer biomarker family. *Cancer Letters*, 2007, 249, p. 61–79.
23. **Zima, T., Racek, J., Tesař, V., Viklický, O., Teplan, V., Schüick, O., et al.** Doporučení k diagnostice chronického onemocnění ledvin (odhad glomerulární filtrace a vyšetřování proteinurie) České nefrologické společnosti ČLS JEP a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP. *Klin. Biochem. Metab.*, 2014, 22 (43), 3, p. 138-152.
24. **Wang, X. X., Tan, M. S., Yu, J. T., Tan, L.** Matrix metalloproteinases and their multiple roles in Alzheimer’s disease. *Biomed Res Int.* dostupný z: 10.1155/2014/908636. Epub 2014 Jun 24.
25. **Cruz, D. N., Gaiao, S., Maisel, A., Ronco, C., Devarajan, P.** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of cardiovascular disease: a systematic review. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2012, 50(9), p.1533-45.
26. **Mukoubayashi, C., Yanaoka, K., Ohata, I., Arii, K., Tamai, H., Oka, M., Ichinose, M.** Serum Pepsinogen and Gastric Cancer Screening, 2006, dostupný z: DOI:10.2169/internalmedicine.46.6181.
27. **Huang, Y., Yu, J., Kang, W., Ma, Z., Ye, X., Tian, S., Yan, C.** Significance of Serum Pepsinogens as a Biomarker for Gastric Cancer and Atrophic Gastritis Screening: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 2015, dostupný z: doi:10.1371/journal.pone.0142080
28. **Kocna, P., Vanickova, Z., Zima, T.** Laboratory screening markers in gastroenterology - state of the art. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013, 157, p. 91-97.
29. **Antunes, A. A., Reis, S. T., Leite, K. R., Real, D. M., Sousa-Canavez, J. M., Camara-Lopes, L. H., Dall’Oglio M. F., Srougi, M.** PGC and PSMA in prostate cancer diagnosis: tissue analysis from biopsy samples *Int. Braz. J. Urol.*, 2013, 39, p. 649-56
30. **Donepudi, M. S, Kondapalli, K., Amos, S. J, Venkanteshan, P.** Breast cancer statistics and markers. *J. Can. Res. Ther.*, 2014, 10, p. 506-11.

Do redakce došlo 30. 5. 2017

Adresa pro korespondenci
Ing. Zdenka Kučerová, CSc.
Ústav patologické fyziologie 1. lékařské fakulty
University Karlovy
U Nemocnice 5
Praha 2, 128 53
email: zkuce@lf1.cuni.cz