

# Proteinová sekrece buněk savců aneb jak si buňky povídají a jak jim naslouchat

Přežití každé společnosti závisí na komunikaci mezi jedinci. Ať už je to společenství bakterií a kvasinek (viz články M. Kuthana a Z. Palkové, *Živa* 2000, 1: 5–8 a 2002, 1: 2–5), včel v úlu, lidská společnost se všemi svými komunikačními vymoženostmi nebo mikroskopický svět buněk utvářejících jeden rostlinný, zvířecí nebo lidský organismus. Buňky se musí mezi sebou „domlouvat“, aby zajistily správný růst, správnou funkci tkání a orgánů, tvorbu energie, tvorbu nových buněk a jejich specializaci do jednotlivých tkání (diferenciaci), ale i zánik opotřebených nebo poškozených buněk. To vše s jediným cílem: zajistit přežití organismu a zachování druhu.

Komunikace mezi buňkami využívá poměrně jednoduché nástroje. Buňka, která vysílá signál, vytváří určitou chemickou molekulu. Ta je rozpoznána senzorem (receptorem) buňky, jež signál přijímá. Molekulou přenášející signál mohou být bílkoviny, peptidy, aminokyseliny a jejich deriváty, steroidy, nebo i některé plyny. Je nutné zdůraznit, že k signálům jsou vnímavé pouze ty buňky, které nesou specifický receptor pro danou signální molekulu. Ostatní buňky jsou k tomuto signálu hluché.

Po navázání signální molekuly na receptor se v cílové buňce signál z vnějšího prostředí převede na nitrobuněčné signály, které vedou ke změně chování buňky. Např. signál k dělení buňky (mitogenní

signál) rozeznává receptor na buněčném povrchu. Po aktivaci receptoru je postupně předán až do buněčného jádra, kde spouští transkripci genů a tvorbu enzymů a dalších proteinů potřebných pro replikaci DNA a buněčné dělení.

Komunikace mezi buňkami savčího organismu probíhá na malé i velké vzdálenosti (obr. 1). Malé skupiny buněk mohou být mezi sebou v přímém kontaktu. Pokud spolu těsně sousedí, mohou si přímo vyměňovat některé malé molekuly mezi svými cytoplazmami pomocí kanálků v membránách (gap junctions). Tato komunikace je nezbytná např. pro buňky srdeční svaloviny, kde se signál pro stah svalu předává právě pomocí přímých propojení cytoplazmy sousedních buněk

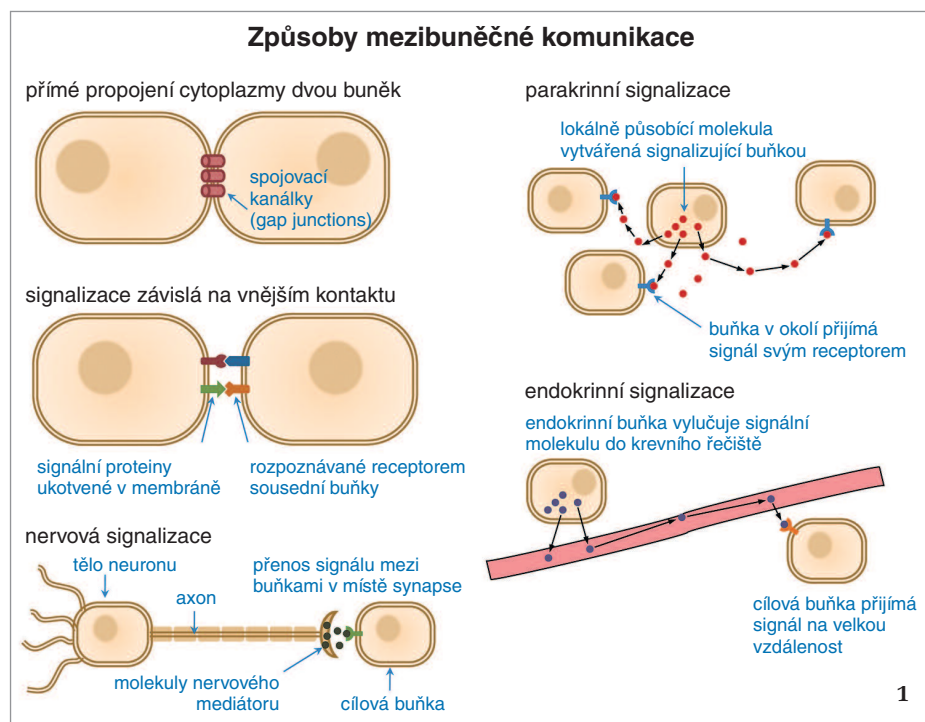
a vede tak k efektivní kontrakci svaloviny jako celku.

V jiných případech přímého kontaktu buněk se určitá bílkovina na povrchu jedné buňky přímo váže na receptor na povrchu sousední buňky. Tato signalizace závislá na kontaktu podává informace o umístění buňky mezi jinými buňkami a okolním prostředím a je nezbytná pro udržení celistvosti a správné organizace tkání nebo migraci buněk vyvíjejícího se embrya.

Mezibuněčná komunikace na větší vzdálenosti je zprostředkována pomocí sekrece, tedy uvolňování signálních molekul z buňky do mimobuněčného prostředí. Zde se mohou signální molekuly šířit v okolním mezibuněčném prostoru, nebo vstupovat do lymfatických či krevních cév a být roznášeny po celém organismu. Pokud jsou sekretovanou molekulou ovlivňovány buňky v blízkém okolí, hovoříme o parakrinní signalizaci. V případě, že jsou signální molekuly uvolňovány do tělesných tekutin, jako je krevní sérum, a tak transportovány na velké vzdálenosti po celém organismu, jde o endokrinní signalizaci. Endokrinní signalizace je např. využívána u bílkovinných hormonů vylučovaných žlázami s vnitřní sekrecí.

Zvláštním druhem signalizace je přenos signálu mezi dvěma neurony. Neuron vysílá výběžkem – axonem – elektrické signály vysokou rychlostí a často na velké vzdálenosti. V místě specializovaného spoje mezi dvěma nervovými buňkami (synapse) se elektrický signál mění na chemický. Z nervového zakončení axonu se do úzké štěrbiny mezi buňkami uvolní molekuly nervových mediátorů, které jsou ihned navázané na receptory cílové buňky. Podobně se přivádí signál z axonů nervových buněk na svalová vlákna, kde mediátory uvolněné z nervového zakončení řídí stah např. kosterního svalu.

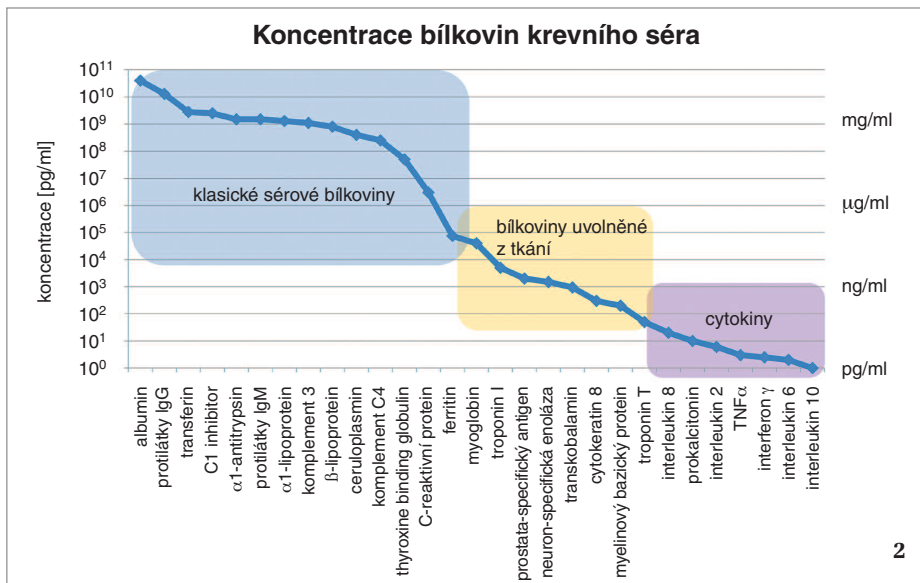
V tomto článku se zaměříme na mezibuněčnou komunikaci pomocí sekrece proteinů a popíšeme metody, kterými lze bílkoviny uvolňované z buněk do mimobuněčného prostředí studovat.



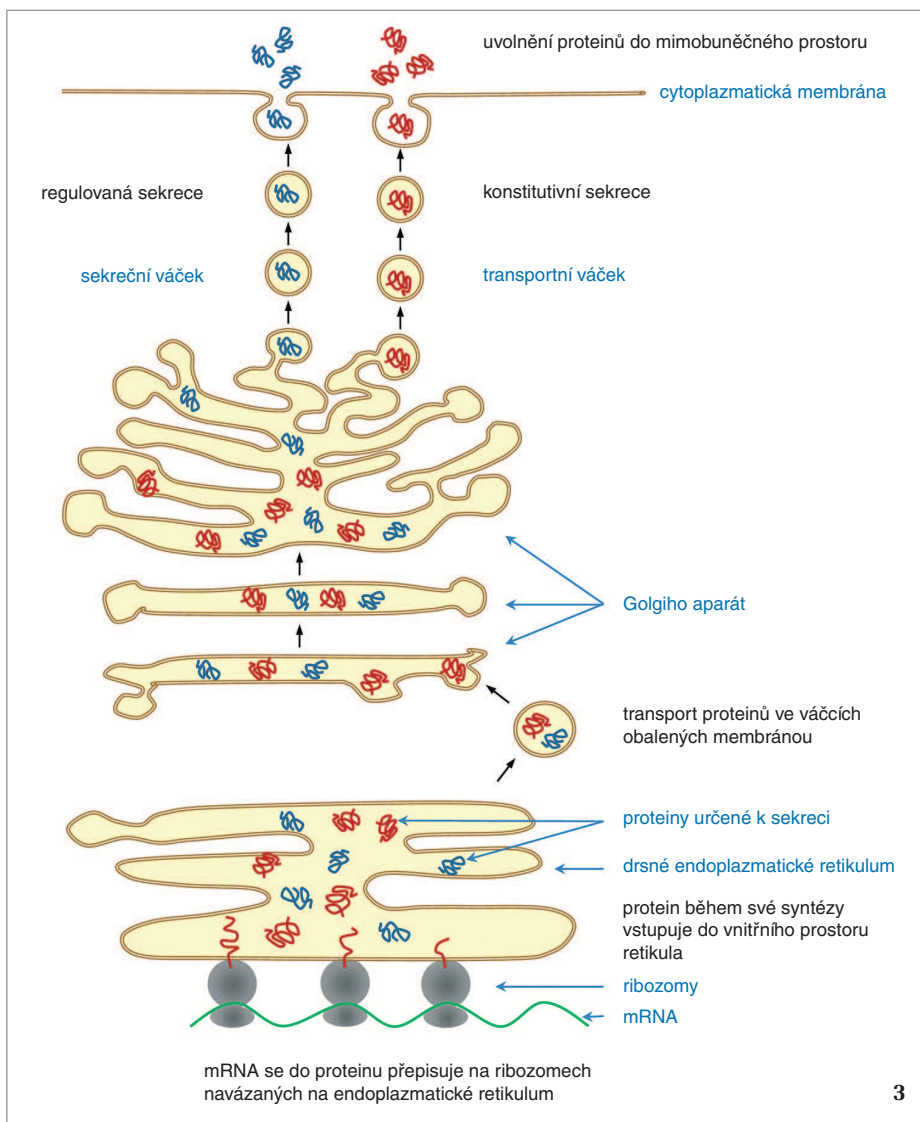
1 Způsoby komunikace mezi buňkami na malé a velké vzdálenosti (bližší vysvětlení v textu)

2 Koncentrace bílkovin krevního séra člověka. Graf ukazuje obrovský rozsah koncentrací různých bílkovin v séru zdravého člověka. Proteinové a peptidové hormony, růstové faktory, interleukiny a cytokiny dosahují víc než milionkrát nižších koncentrací než většina klasických sérových bílkovin. Analýza málo koncentrovaných molekul vyžaduje vysoce specializované laboratorní techniky.

3 Přehled sekreční dráhy. Klasicky sekretované bílkoviny se z buněk uvolňují sekreční dráhou probíhající přes endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. V těchto organelách dochází k úpravám molekul, čímž proteiny získávají svou strukturu a funkci. Trvale (konstitutivně) sekretované proteiny jsou k povrchu buňky dopravovány v transportních vácích. U regulované sekrece se obsah sekrečních váčků uvolňuje ven z buňky až po přijetí určitého signálu.



s velmi silným účinkem se řadí proteinové a peptidové hormony (např. inzulin, glukagon, prolaktin, oxytocin a gastrin) a cytokiny (interleukiny, interferony, chemokiny a růstové faktory, jako např. erythropoetin, epidermální růstový faktor, fibroblastový růstový faktor). Koncentrace cytokinů v lidském séru dosahují často jen několika jednotek či desítek pikogramů na mililitr, což je o 9 řádů méně než koncentrace albuminu (obr. 2). Tyto vysoce aktivní molekuly nacházejí široké uplatnění v biologickém výzkumu, kde se využívají např. k aktivaci buněk imunitního systému, podpoře množení buněk v buněčných a tkáňových kulturách nebo k jejich diferenciaci do požadovaných buněčných typů. V lékařství se cytokiny a protilátky proti nim a jejich receptorům začínají široce používat v tzv. biologické léčbě (článek o tomto tématu vyjde v následujícím čísle Živa).



### Jak sekrece probíhá

Většina bílkovin je z buněk vylučována sekreční dráhou probíhající přes endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát (obr. 3). Tyto dvě buněčné orgány jsou tvořeny systémem váčků ohraničených lipidovou membránou. Bílkoviny určené k sekreci vstupují dovnitř váčků endoplazmatického retikula již během své syntézy. V endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu jsou proteiny upraveny, aby získaly správnou strukturu a funkci. Váčky obsahující hotové funkční proteiny nakonec vyprázdní svůj obsah mimo buňku splnutím membrány váčku s cytoplazmatickou membránou (tzv. exocytóza).

Typická savčí buňka obsahuje kolem 10 000 různých druhů proteinů a každý z nich se musí nacházet na správném místě (např. uvnitř mitochondrií, v jádře, lyzozomech, cytoplasmě, nebo být sekretován mimo buňku). Třídění proteinů do cílových destinací začíná již během jejich syntézy na cytoplazmatických ribozomech. Většina proteinů určených k sekreci nese na začátku polypeptidového řetězce (N-konec) specifickou sekvenci, která se skládá z jedné nebo více kladně nabitých aminokyselin následovaných nepřerušenou řadou 6–12 hydrofobních aminokyselin. Tato signální sekvence dává informaci ribozomu, aby se během překladu mRNA do proteinu navázal na endoplazmatické retikulum. Vznikající polypeptidový řetězec je přímo během své syntézy přenášen do vnitřního prostoru retikula. V něm dochází k posttranslačním úpravám proteinu, které zahrnují odštěpení signální sekvence, správné sbalení proteinu do trojrozměrné struktury, tvorbu disulfidických můstků, navázání cukerných řetězců a sestavení proteinů skládajících se z více podjednotek. Správně poskládané proteiny jsou transportovány do Golgiho aparátu, zatímco chybně složené jsou odbourány.

Většina sekretovaných proteinů obsahuje jeden nebo několik cukerných řetězců. V Golgiho aparátu probíhá vazba dalších cukerných zbytků na proteiny a zároveň složitá enzymatická úprava cukerných řetězců. Velká část sekretovaných proteinů (např. albumin, inzulin, glukagon) je syntetizována ve formě neaktivních proproteinů a vyžaduje odštěpení části polypeptidu

### Sekretované bílkoviny

Typické sekretované bílkoviny se z buněk uvolňují neustále (konstitutivně). Patří mezi ně bílkoviny krevního séra vytvářené převážně jaterními buňkami nebo bílkovinné složky mezibuněčných prostor (extracelulární matrix) uvolňované buňkami pojivové tkáně. Jsou tvořeny ve velkém množství – např. albumin krevního séra dosahuje koncentrací desítek miligramů v mililitru séra.

V jiných buňkách jsou bílkoviny určené k sekreci skladovány a uvolní se ven až po přijetí určitého signálu, tedy regulovaně. Takto řízené jsou vylučovány např. prekuzory trávicích enzymů z buněk slinivky břišní nebo bílkoviny mléka z buněk mléčné žlázy. Zvláštním případem jsou bílkoviny, jejichž koncentrace v tělesných tekutinách jsou mizivé, ale zároveň dostatečné k tomu, aby vyvolaly potřebný efekt u cílových buněk. Mezi takové bílkoviny



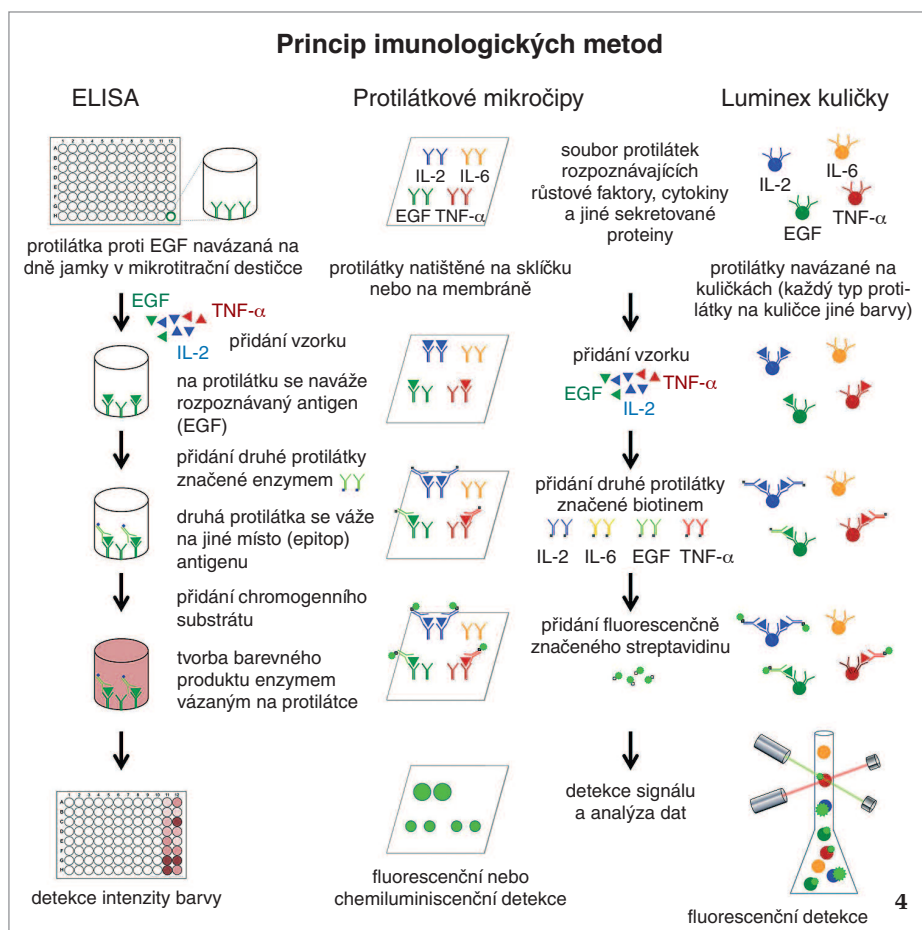
ke své aktivaci. Tato proteolytická aktivace nastává v Golgiho aparátu, nebo přímo v sekrečních váčcích transportovaných od Golgiho aparátu k buněčnému povrchu. Obsah váčků je vyprázdněn ven z buňky pomocí exocytózy.

Některé proteiny, jako např. fibroblastový růstový faktor nebo interleukin 1 beta (IL-1β), nenesou signální sekvenci a nevstupují tedy do klasické sekreční dráhy přes endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Takové proteiny se z buněk uvolňují alternativními způsoby. Jedním z nich je přenos proteinu přes cytoplazmatickou membránu pomocí specializovaných membránových transportérů, které jsou schopné přenést i poměrně objemné proteiny sbalené do finální trojrozměrné struktury. Proteiny se mohou z buněk uvolňovat také ve váčcích obalených membránou (mikrovezikuly nebo exozomy), které mohou navíc obsahovat mediátorovou RNA a krátké nekódující RNA (miRNA z anglického micro RNA), a hrají tak velmi významnou úlohu v mezibuněčné komunikaci a signalizaci. Existují i další mechanismy neklasické sekrece, které však dosud nejsou dostatečně objasněny.

### Studium sekretovaných bílkovin v praxi

V posledních pěti letech došlo v mnoha vědních oblastech k velkému nárůstu zájmu o sekretované molekuly. V mikrobiologii probíhá výzkum proteinů uvolňovaných bakteriemi, kvasinkami a plísněmi, které je možné využít v biotechnologiích, potravinářském průmyslu, zemědělství nebo při ochraně životního prostředí. Výsledky těchto studií se uplatňují nejčastěji při výrobě biopaliv, syntéze chemických látek, potravních doplňků a léčiv, odbourávání toxických látek, odpadů a při likvidaci ropných havárií. Podrobně se také zkoumají interakce mezi mikroorganismy a člověkem při infekčních onemocněních. V oblasti základního výzkumu ve vývojové biologii se studují vztahy buněk při utváření tkání a orgánů vyvíjejícího se embrya. V zemědělství probíhá mimo jiné analýza složení rostlinných buněčných stěn. To vede k získání nových odrůd ovoc a zeleniny (např. rajčat) s upravenými buněčnými stěnami, které jsou odolné proti nechtěnému měknutí a znehodnocení plodů během přepravy a skladování.

Problematika sekretovaných bílkovin je snad neaktuálnější v lidské medicíně, a to zejména v onkologii. Pokud budou nalezeny bílkoviny typické pouze pro nádorové buňky a přítomné v měřitelném množství v krvi pacienta, bude možné je snadno využít k odhalení nádorového bujení v časném stadiu, kdy onemocnění bývá obvykle ještě poměrně dobře léčitelné. Molekuly uvolňované z nádorových buněk lze využít nejen pro určení diagnózy, ale i pro sledování účinnosti léčby. Další velmi studovanou oblastí jsou lidská civilizační, metabolická a degenerativní onemocnění, jako např. obezita, cukrovka, vysoký krevní tlak, opotřebením kloubních chrupavek (artróza) nebo degenerativní onemocnění nervového systému. Zde se intenzivně zkoumají bílkoviny sekretované tukovou tkání, svalovými buňkami, buňkami cévních stěn (endotelové buňky),



ale také kmenovými buňkami, které by bylo možno použít k hojení a obnově poškozených tkání. Poslední dobou se ukazuje, že za obnovu poškozené tkáně nemusí být zodpovědné pouze kmenové buňky – podobný efekt mají často molekuly sekretované těmito buňkami. Ty pak podporují dělení buněk přítomných v tkáni, zabráňují jejich odumírání, a tím se podílejí na regeneraci poškozených. S trochou nadsázky můžeme říct, že takto by bylo možné pacientovi ušít na míru koktejl růstových faktorů a dalších molekul, které by mu byly schopny obnovit poškozenou chrupavku v kolenní, srdeční sval po infarktu, nebo třeba zmírnit úbytek nervových buněk při Alzheimerově chorobě. Zároveň by zde odpadly některé etické a technické problémy se získáním dostatečného počtu kmenových buněk, zajištěním tolerance přenesených buněk imunitním systémem příjemce apod.

### Kdo to tady vlastně mluví?

Velmi často nás zajímá, která buňka je zdrojem vysílaných signálů, nebo naopak, které proteiny je buňka schopna za určitých podmínek tvořit. To lze jen velmi obtížně zjistit ze vzorku krevního séra, které proudí celým organismem a unáší proteiny produkované různými buňkami. Proto bývá nutné vydat se jinými cestami.

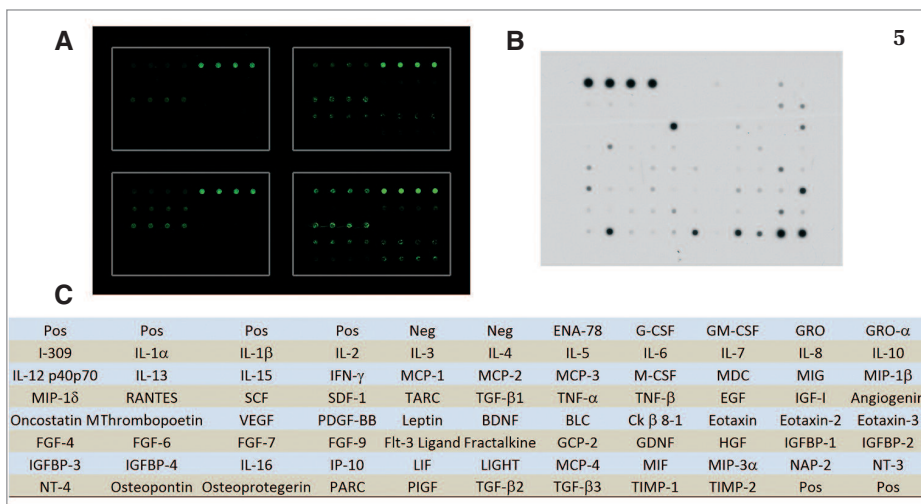
Zdá se, že nejjednodušším řešením je vyjmout studovaných buněk ven z organismu a jejich pěstování *in vitro*, tedy v umělém živném roztoku ve formě buněčných kultur. Přežití a množení většiny buněk v umělém živném médiu závisí na přítomnosti séra jako zdroje růstových faktorů a dalších látek. Přítomnost séra a zejména albuminu a dalších hlavních

### 4 Princip imunologických metod.

Imunologické techniky využívají vysokou citlivost protilátek. Metodou ELISA lze měřit koncentraci jedné bílkoviny (jako příklad je uveden epidermální růstový faktor EGF – blíže v textu). Pomocí protilátkových mikročipů nebo metody Luminex lze detekovat desítky až stovky sekretovaných bílkovin v jednom experimentu (zde pro zjednodušení uvádíme příklad detekce čtyř různých bílkovin). Ve zkoumaném vzorku je ve větším množství přítomen interleukin 2 (IL-2) a v menší koncentraci EGF a tumor nekrotizující faktor alfa (TNFα). Všechny tři metody umožňují stanovit koncentraci zkoumaného proteinu ve vzorku. U metody ELISA dochází k tvorbě barevného produktu enzymem navázaným na protilátce. Intenzita barvy odpovídá koncentraci měřené bílkoviny. U mikročipů a metody Luminex je protilátka značená biotinem, na který se váže fluorescenčně značený streptavidin – intenzita jeho fluorescence odpovídá množství měřené bílkoviny. Fluorescence protilátek na mikročipu se detekuje pomocí fluorescenčního skeneru.

U metody Luminex procházejí kuličky tenkou kapilárou, kde dva lasery zjišťují barvu kuličky (tedy který cytokin měříme) a zároveň fluorescenci streptavidinu.

sérových bílkovin nám ale značně komplikuje analýzu sekretovaných proteinů pomocí proteomických technik (viz dále). Proto se buňky pěstují v živném médiu bez séra, a to jen několik hodin (typicky 6–24 hodin, podle typu buněk), aby nedošlo k jejich odumírání, a tím se do živného roztoku neuvolnily také nitrobuňčné



**5** Protilátkové mikročipy pro detekci sekretovaných proteinů. A – Protilátkový mikročip pro měření hladin 10 prasečích cytokinů. V každém políčku ohraničeném rámečkem je analyzován jeden vzorek prasečího séra. Mikročip umožňuje měřit hladiny 10 cytokinů – po řádcích interleukiny IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, růstový hormon pro granulocytární řadu leukocytů a makrofágy (GM-CSF), interferon gama (IFNγ), transformující růstový faktor beta 1 (TGFβ1), tumor nekrotizující faktor alfa (TNFα), každý ve čtyřech opakováních. B – Protilátkový mikročip pro detekci 80 různých sekretovaných proteinů. Jako vzorek byl použit živý roztok, v němž byly pěstovány lidské neurony. Buňky do roztoku uvolňovaly některé cytokiny a růstové faktory. C – Mapa mikročipu z obr. B ukazuje rozmístění protilátek detekujících jednotlivé sekretované proteiny. Neurony za daných podmínek uvolňovaly IL-8, monocytární chemotaktický protein 1 (MCP-1), vazebný protein 2 pro inzulinu podobný růstový faktor (IGFBP2), osteopontin aj. Orig.: H. Kupcová Skalníková

bílkoviny. Médium se poté zkoumá na přítomnost proteinů vylučovaných z buněk. V některých případech je vhodné buňky před analýzou povzbudit ke zvýšené sekreci. Pokud jde o řízenou sekreci z buněk, tj. sekreční váčky uvolní svůj obsah ven až po přijetí určitého signálu, můžeme zvýšenou sekreci stimulovat vhodným signálem. Takto se využívá např. lipopolysacharid buněčné stěny bakterií, tumor nekrotizující faktor alfa (TNFα), interleukin 1 beta nebo interferon gama (IFNγ) ke stimulaci sekrece buněk imunitního systému (lymfocyty, monocyty), některých podpůrných buněk nervového systému (astrocyty, mikroglie) nebo i některých kmenových buněk (mezenchymové kmenové buňky, kmenové buňky tukové tkáně).

Umělé prostředí buněčných kultur nemusí zcela napodobovat přirozené prostředí v organismu a může tedy pozměnit buněčnou sekreci. Proto je v určitých případech výhodné vyjmout celou tkáň a *ex vivo* sledovat proteiny uvolněné z tkáně do živného média. Tato strategie byla úspěšně využita např. k identifikaci proteinů sekretovaných buňkami lidské chrupavky nebo tukové tkáně.

Nejvýhodnější se logicky zdá být analýza sekrece *in vivo*, tedy přímo v živém organismu. Toho lze dosáhnout rozborem některých lokálně tvořených tělních tekutin, jako jsou mozkomíšni mok, sliny, moč, plodová voda, synoviální tekutina v kloubech nebo intersticiální tekutina v tkáních. Nejzajímavější, ale technicky nejnáročnější je analýza intersticiální tekutiny, která vyplňuje mezibuněčné prostory a obsahuje proteiny lokálně uvolňované buňkami v jejich přirozeném prostředí. Přímo do tkáně je možné zavést velmi tenkou trubičku a odebrat vzorek mezibuněčné tekutiny pomocí mikrodiálýzy nebo kapilární ultrafiltrace. Tyto techniky byly úspěšně použity ke studiu sekrece v různých oblastech mozku u zdravých a nemocných jedinců, ale také v jiných tkáních, jako jsou tuková, svalová a jaterní tkáň nebo některé nádory.

### Jak naslouchat aneb metody pro analýzu sekretovaných bílkovin

Poznávání sekretovaných bílkovin je možné zejména díky obrovskému rozvoji analytických metod, k němuž došlo v posledním desetiletí. V současnosti existují dva hlavní metodické přístupy – proteomické a imunologické metody.

● Proteomické metody využívají k určení identity bílkoviny hmotnostní spektrometrii, která velmi přesně stanoví molekulovou hmotnost bílkoviny (nebo bílkoviny rozštěpené na menší peptidy) a podle ní se určí, o jaký protein jde. V posledních 10 letech byly vyvinuty vysoce specializované techniky umožňující nejen určit, jaké proteiny jsou ve vzorku obsaženy, ale také zjistit jejich množství. Pomocí hmotnostní spektrometrie lze velmi úspěšně analyzovat bílkoviny přítomné v méně složitých proteinových směsích nebo sekretované ve větším množství. Složitější směsi proteinů je vhodné předem rozdělit na více frakcí, abychom byli schopni detekovat i bílkoviny přítomné v menších koncentracích. Ve velmi složitých směsích, jako je např. krevní sérum, může být ale použití hmotnostní spektrometrie omezené. V analýze krevního séra metoda zatím není dostatečně citlivá, aby mohla detekovat cytokiny a některé růstové faktory vytvářené tělními buňkami, zejména pak v přítomnosti albuminu a dalších proteinů, které jsou v séru mnohonásobně v přebytku. Pro stanovení těchto velmi

málo koncentrovaných bílkovin jsou proto vhodné imunologické metody.

● Imunologické metody využívají vysokou citlivost protilátek k detekci antigenů a mohou se uplatnit i při stanovení bílkovin přítomných ve velmi malém množství (obr. 4). Pro měření hladiny jedné bílkoviny se používá ELISA (z anglického Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). V jamkách mikrotitrační destičky je navázaná protilátka proti námi zkoumanému antigenu (např. epidermálnímu růstovému faktoru EGF). Po přidání vzorku se molekuly EGF ze vzorku zachytí na protilátce v jamce. Po promytí přidáme další protilátku proti EGF, která však rozpoznává jinou část molekuly EGF (jiný epitop). Na této druhé protilátce je navázán enzym, jenž po přidání substrátu vytvoří barevný produkt. Čím bylo více EGF ve vzorku, tím vznikne sytější barva. Proměřením intenzity barvy tak můžeme stanovit, jestli byl EGF ve vzorku přítomen a v jakém množství.

Nedávno byly vyvinuty imunologické testy umožňující zároveň detekovat několik desítek až stovek bílkovin v jednom vzorku, což výrazně snižuje dobu analýzy i spotřebu samotného vzorku. Princip těchto testů se podobá principu metody ELISA. Protilátky se v tomto případě nenacházejí v jamkách destičky, ale jsou navázány na membráně či sklíčku ve formě protilátkových mikročipů (obr. 4 a 5), nebo jsou umístěny na kuličkách s definovanou spektrální adresou (zjednodušeně barvou) v případě metody Luminex (obr. 4). Druhá protilátka bývá většinou fluorescenčně značena. Podle pozice protilátky na čipu nebo podle barvy kuličky proto víme, jaký antigen stanovujeme, a na základě intenzity fluorescenčního signálu zjistíme množství stanovovaného proteinu ve vzorku. Výhodou fluorescenčního značení je velký dynamický rozsah, tedy široké rozmezí koncentrací, v němž lze spolehlivě měřit množství analyzovaných látek ve vzorku. To je velmi důležité např. pro stanovení koncentrací cytokinů, které mohou v případě aktivace buněk nebo při určitých onemocněních vzrůst i 100 až 1 000násobně.

### Závěrem

Sekretované bílkoviny hrají velmi významnou úlohu v komunikaci mezi buňkami a pomáhají udržet stálost (homeostázu) organismu. Výzkum bílkovin uvolňovaných buňkami se těší velkému zájmu vzhledem k možnostem využití výsledků v ekologii, zemědělství, při výrobě chemických látek, ale především v lékařství. V posledním desetiletí došlo k obrovskému rozvoji laboratorních technik pro studium sekretovaných bílkovin, které umožnily studovat a popsat sekreci mnoha typů buněk. I přes tyto významné pokroky stále není přesně známa funkce jednotlivých molekul, zejména pak jejich fungování za určitých podmínek (např. ve zdraví či nemoci) a jejich účinek v kombinaci s dalšími sekretovanými faktory. Výzkum bílkovin uvolňovaných z buněk tak bude jistě populární i v příštích desetiletích.

*Práce vznikla za podpory projektu ME 10044.*