

Chybně poskládané bílkoviny – příčina a možný terapeutický cíl u neurodegenerativních nemocí

Neurodegenerativní onemocnění jsou způsobena progresivní ztrátou neuronů, která v závislosti na typu postižení může zasahovat vybrané oblasti nervového systému a postihovat sensorické, motorické a kognitivní funkce i jejich kombinace. Za jednu z hlavních příčin odumírání neuronů a zároveň typický znak neurodegenerativních chorob je považováno intracelulární nebo extracelulární hromadění chybně poskládaných bílkovin. Neurodegenerativních nemocí s akumulací chybně poskládaných bílkovin bylo popsáno několik desítek.

Chybně poskládané bílkoviny se v buňce vyskytují zároveň s neposkládanými, částečně poskládanými i se správně poskládanými molekulami stejného typu. Ve zdravé buňce jsou tyto nesprávné bílkoviny rozpoznávány molekulárními chaperony, které jim vracejí potřebný tvar, případně jsou určeny k odbourání v proteozomu či autofagii (bližší viz str. 282–285 této Živy). Současné studie ukazují, že kapacita systémů pro kontrolu kvality bílkovin u člověka klesá s věkem, a tím náš organismus postupně ztrácí schopnost bránit hromadění chybně poskládaných bílkovin, jež v některých případech může vyústit v porušení rovnováhy (proteostáze) a v propuknutí nemoci. Klesající kapacita systémů pro kontrolu kvality bílkovin může být také jedním z důvodů, proč se četnost výskytu neurodegenerativních onemocnění zvyšuje ve stáří. Vzhledem k prodlužující se délce lidského života, zejména v rozvinutých zemích, představuje rostoucí výskyt neurodegenerativních nemocí nejen

závažný zdravotní, ale rovněž socioekonomický problém.

Příčiny chybného skládání

Faktory či kombinaci faktorů spouštějících chybné skládání a hromadění bílkovin je těžké odhalit a zůstávají většinou neznámé. Předpokládá se, že ke vzniku neurodegenerativních chorob přispívají genetické faktory a vliv vnějšího prostředí.

Mutace v genech jsou jednou z nejprozkoumanějších příčin chyb při skládání bílkovin. Mutace většinou narušují primární strukturu bílkoviny – aminokyselinovou sekvenci, a tím ovlivňují i její další sbalování do trojrozměrného uspořádání. Genové mutace pak ovlivňují fungování dané bílkoviny, což vede buď ke ztrátě určité funkce molekuly, nebo naopak k získání nové. Příkladem ztráty funkce je mutace v parkinu, který působí jako ubikvitin-ligáza, tedy E3 enzym pro ubikvitinaci a odbourání cílových bílkovin v proteozomu. Nedostatek funkčního parkinu může

přispívat k hromadění neodbouraných bílkovin a rozvoji Parkinsonovy nemoci. Získání nové funkce většinou znamená vznik škodlivé schopnosti bílkoviny vytvářet shluky. Kromě hromadění a agregace mohou bílkoviny nesoucí mutaci pravděpodobně přímo zasahovat do buněčných dějů a vést např. k dysfunkci mitochondrií, oxidativnímu stresu, aktivaci astrocytů a mikroglie a s tím spojenému zánětu. Přesný mechanismus toxického působení konkrétních bílkovin není bohužel zatím příliš objasněn.

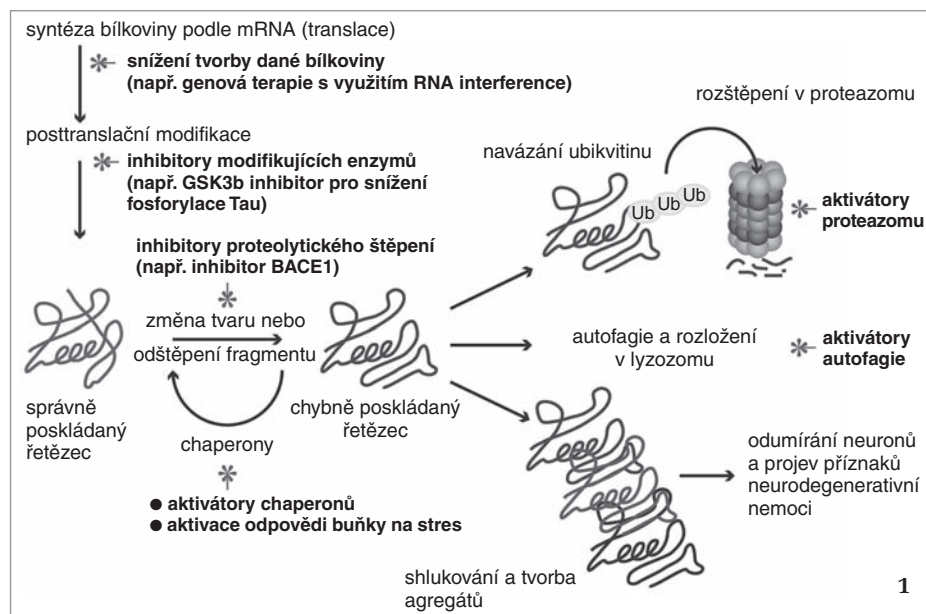
Kromě příčinné mutace mají vliv na vznik onemocnění i některé fyziologické a patologické procesy (např. změny intenzity syntézy bílkovin, posttranslačních modifikací, transportu bílkovin v buňce, sekrece bílkovin, stres, infekce, stárnutí), které mohou zvyšovat množství chybně poskládané bílkoviny, snižovat účinnost jejího odbourání, a tím napomáhat k hromadění.

Bílkoviny schopné tvořit agregáty obsahují v molekule menší úseky, které mohou shlukování iniciovat. Shlukování je často spuštěno po odštěpení takových úseků s labilní strukturou proteázami a v tom případě dochází k akumulaci odštěpených fragmentů. Typickým příkladem je hromadění α -amyloidu u Alzheimerovy nemoci – peptidu, který obsahuje prvních 42 aminokyselin, odštěpeného z amyloidu prekurzorového proteinu. Vzniklý agregát představuje kompaktní a termodynamicky vysoce stabilní stav díky velmi intenzivnímu kontaktu mezi jednotlivými řetězci bílkovin. Pro buňku je obtížné až zcela nemožné agregát rozrušit. Termodynamická stabilita navíc přispívá ke schopnosti agregátu měnit okolní správně zformované bílkoviny do amyloidních forem, což je podobné způsobu šíření prionových proteinů. Takové šíření chybně poskládaného motivu do původně správně zformovaných bílkovin se předpokládá vedle zmíněného α -amyloidu např. u Tau proteinu, α -synucleinu nebo TDP-43 (viz tab. 1). Na šíření vadných bílkovin do zdravých buněk se zřejmě mohou podílet i extracelulární váčky.

Léčebné cíle

Vývoj léčby zaměřené na určité prostorové uspořádání bílkoviny s tendencí vytvářet shluky je velmi komplikovaný, neboť molekula může procházet několika změnami prostorového uspořádání a není zcela jasné, která forma je náchylná k agregaci. Proto vývoj léčby neurodegenerativních nemocí směřuje spíše na potlačení syntézy dané bílkoviny (např. za využití genové terapie pomocí interferujících RNA), potlačení štěpení na toxické fragmenty (mimo jiné inhibicí enzymu BACE1 odštěpujícího α -amyloid z prekurzorového proteinu), nebo je zacílen na posttranslační úpravy dané bílkoviny (např. snížení fosforylace Tau proteinu; obr. 1).

Zároveň probíhá vývoj obecněji mířených postupů, tedy necílených jen na konkrétní chybně poskládanou molekulu,



Tab. 1 Příklady chybně poskládaných bílkovin u vybraných neurodegenerativních nemocí člověka. [* – charged multivesicular body protein 2b, CHMP2B]

Onemocnění	Chybně poskládaná bílkovina
Alzheimerova nemoc	amyloid prekurzorový protein k mikrotubulům přídružený protein Tau presenilin-1 apolipoprotein E
Parkinsonova nemoc	α -synuclein parkin k mikrotubulům přídružený protein Tau
Huntingtonova nemoc	huntingtin junctophilin-3 apolipoprotein L1
amyotrofická laterální skleróza	RNA-vazebný protein fúzovaný u sarkomu (FUS) TAR-DNA vazebný protein 43 (TDP-43) neurofilamentum – těžký řetězec nabitý protein multivezikulárních tělísek 2b * superoxid dismutáza [Cu-Zn]
spinocerebelární ataxie	ataxin-8 a jiné ataxiny
Creutzfeldtova–Jakobova nemoc	prionový protein PrP ^{Sc}
frontotemporální demence	TAR-DNA vazebný protein 43 (TDP-43)

kteří se soustřeďují na zvýšení aktivity chaperonů či podporu systémů k odbourávání bílkovin (obr. 1). Molekulární chaperony, zejména pak proteiny teplotního šoku (Heat shock proteins, Hsp), hrají klíčové role ve skládání, odbourání nebo narušení shluků patologických proteinů a významně se podílejí na prevenci tvorby a hromadění chybně poskládaných bílkovin. Experimentální zvýšení tvorby Hsp či jejich aktivace na zvířecích a *in vitro* buněčných modelech poskytují slibné výsledky. Testovány jsou i chemické látky (např. glycerol, dimetyl sulfoxid, trimethylamin-N-oxid), které se chovají podobně jako molekulární chaperony – zvyšují stabilitu bílkovin v globulární formě, a tím zvyšují pravděpodobnost správného skládání.

Nově vyvíjené postupy k aktivaci odbourávání bílkovin se zaměřují na oba hlavní

systemy pro degradaci bílkovin, tedy ubiquitin-proteazomový systém i autofagii. Chybně poskládané a ubiquitinované bílkoviny mohou blokovat aktivitu proteazomu, až ho dokonce přímo ucpat (např. prionový protein bohatý na struktury skládaného listu nebo ubiquitinovaný a agregovaný Tau protein), proto se aktivátory proteazomového systému jeví jako správná cesta pro vývoj nových terapií. Vývoj aktivátorů však zatím není příliš úspěšný, většina testovaných látek nevykazuje dostatečnou účinnost. Výjimkou může být rolipram, který u myšího modelu aktivoval proteazom a snižoval agregaci proteinu Tau.

Mezi stimulatory autofagie se jeví nadějnou molekulou rapamycin. V buňkách inhibuje kinázu mTOR, která se podílí na regulaci buněčného dělení, apoptózy a autofagie. U transgenických myších modelů Alz-

heimerovy, Parkinsonovy nebo Huntingtonovy nemoci a u transgenických myší exprimující prionový protein PrP^{Sc} rapamycin podporoval odstraňování patologických agregátů bílkovin, zlepšoval poznávací a motorické schopnosti myší a zpomaloval neurodegeneraci mozku těchto zvířat. Na druhou stranu u myšího modelu amyotrofické laterální sklerózy (ALS) rapamycin aktivitu autofagie naopak snižoval. Různorodé účinky rapamycinu zahrnují i prodloužení délky života a oddalování stárnutí pokusných zvířat. U člověka se využívají imunopresivní účinky rapamycinu pro předcházení rejekci (odvržení) u transplantací ledvin. Další aktivátory autofagie, včetně přírodních substancí kurkuminu a resveratrolu, jsou nyní v klinickém testování. Nevýhodou aktivátorů autofagie založených na inhibici mTOR dráhy jsou jejich vedlejší účinky, zahrnující mimo jiné narušení metabolismu cukrů a tuků vedoucí např. k cukrovce (diabetu 2. typu).

Do vývoje léčby neurodegenerativních nemocí způsobených ukládáním chybně poskládaných bílkovin je celosvětově investováno obrovské úsilí vědeckých týmů i nemalé finanční obnosy. Vývoj léčby ale komplikuje ne zcela přesně známá fyziologická funkce bílkovin schopných tvořit agregáty a neznámé vlastnosti různých forem těchto bílkovin. Zároveň je velmi obtížné najít spolehlivé biomarkery, které by se daly použít ke sledování účinnosti nově vyvíjených terapií, zejména pak u neurodegenerativních nemocí s pomalým chronickým průběhem.

Práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (reg. č. 19-01747S).

Použitou literaturu uvádíme na webu Živy. K dalšímu čtení Živa 2014, 6: 262–265; 2016, 6: 274–277 a 2017, 1: 4–7.

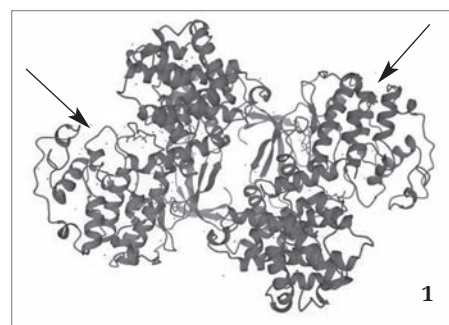
Jan Černý

Metabolické rovnováhy a zpětné vazby



Tématem 56. ročníku biologické olympiády (2021/2022) je regulace a zpětné vazby. Vybíráme ukázkou z připravovaného textu, z kapitoly zabývající se metabolickými rovnováhami, termoregulací, příjmem a výdejem látek. Náš metabolismus představuje koordinovaný orchestr tisíců chemických reakcí katalyzovaných enzymy, které se v některých bodech stýkají, navazují na sebe, využívají společných meziproductů, občas jdou proti sobě. Jednou z fyzikálních vlastností těla, která přímo ovlivňuje rychlost chemických reakcí, tekutost membrán či aktivitu membránových transportérů, je teplota. Rychlost enzymatických reakcí dále závisí na koncentraci reaktantů a produktů a je regulována změnou tvaru (konformací) příslušného enzymu, které se zde budeme nyní věnovat blíže.

K regulaci dochází vazbou jiné bílkoviny nebo metabolitu, která v obou případech může vést k aktivaci či inhibici. Podobně fungují posttranslační modifikace, např. kovalentní vazba organické nebo anorganické molekuly do struktury enzymu (viz také str. 282–285 této Živy). Velice časté jsou regulační fosforylace – navázání zbytku kyseliny fosforečné na postranní řetězce aminokyselin. V našich buňkách dochází nejčastěji k fosforylaci aminokyselin serinu, treoninu a tyrozinu. Všechny tyto aminokyseliny mají ve své struktuře -OH skupinu, která se reakcí s adenosin trifosfátem (ATP) esterifikuje. Navázaný fosfát je původně posledním třetím „P“ ve struktuře ATP. Tuto reakci katalyzují kinázy, odštěpení fosfátu pak fosfatázy. Oba typy enzymů mohou být aktivační, nebo inhibiční.



1 Dimer fosforylované cyklin-dependentní kinázy-2 (CDK, na obrázku jsou označeny šipkou) navázané na cykliny A. Na <https://www.rcsb.org/3d-view/1JST/1> si s touto strukturou můžete otáčet, zvětšovat ji a identifikovat jednotlivé aminokyseliny. Podle: D. Sehnal a kol. (2018)

Konkrétní situaci si popíšeme na jedné z nejdůležitějších buněčných bílkovin – cyklin-dependentní kináze (CDK, obr. 1), která reguluje buněčný cyklus. Jestli je CDK aktivovaná nebo inhibovaná, přímo souvisí s tím, zda (a kdy) se buňka rozdělí, případně zůstane v klidovém stavu.