

ÚVODEM

Vážení přátelé,

Evropská biotechnologická federace („European Federation on Biotechnology“ (www.efbiotechnology.org), jejímž členem je i naše společnost, si letos připomíná 40 let od svého založení. Byla založena v r. 1978 na svém prvním kongresu ve švýcarském Interlaken a nyní oslaví své významné výročí opět na švýcarské půdě, a to v Ženevě. Jak jsme Vás již informovali, 18th European Congress on Biotechnology se bude konat ve dnech 1. – 4. července 2018 (www.ecb2018.com). Doporučujeme účastnit se a prezentovat tam výsledky českého biotechnologického výzkumu.

Rádi bychom Vám také připomněli, že na webových stránkách <https://www.sciencedirect.com/journal/biotechnology-advances/vol/36/issue/3> si můžete přečíst články našeho speciálního čísla Biotechnology Advances – Prospects in Biotechnology, které přináší přehledné články účastníků našeho mezinárodního symposia Biotech 2017 konaného v Národní technické knihovně v Praze 6 od 13. do 17. června 2017.

Jak je Vám jistě všem známo naše Biotechnologická společnost je zakládajícím členem Českého svazu vědeckotechnických společností (ČSVTS), který v současné době sdružuje 67 společností (podle současné legislativy „spolků“), které jsou samostatnými právními subjekty. K posilování postavení ČSVTS v regionech a k plnění jeho dlouhodobého programu slouží 4 domy techniky, a to: Dům techniky České Budějovice spol. s r.o., Dům techniky Ostrava (DTO CZ, s.r.o.), Dům techniky Pardubice spol., s.r.o. a Dům techniky Plzeň spol., s.r.o. Domy techniky hospodaří s majetkem Svazu na základě uzavřených nájemních smluv. Pátý Dům techniky ČSVTS Kladno, s.r.o. pro neschopnost plnit finanční závazky převzal přímo Svaz. Svaz dále hospodaří s dalším nemovitým majetkem Svazu a formou pronájmů získává prostředky na odbornou činnost svých společností, v našem případě přispívá na tisk a distribuci časopisu Biopropect. Pro různé menší akce je možné využívat školící středisko Svazu v Kytlici.

Naše společnost má v současné době svého zástupce v komisi pro vzdělávání a inovace, a to RNDr. Tomáše Vaňka, CSc. Uvítáme větší zájem našich členů o práci v komisích v příštím volebním období.

ČSVTS převzal obtížný úkol a to přípravu Světového inženýrského konventu WEC 2023 v Praze a ustanovil garanční výbor ve složení doc. Hanus, doc. Trojan, prof. Ulrichová a prof. Volf. Kongres by se měl konat v nové O2 kongresové hale, která by měla stát vedle současné O2 Arény. Podněty k programu je možné podávat garančnímu výboru.

Všem členům a podporovatelům doporučujeme číst „Zpravodaj“ ČSVTS, který vychází dvakrát ročně a je k dispozici na webových stránkách Svazu <http://zpravodaj.csvts.cz>. Poslední číslo 45 z května 2018 se věnuje zejména 100. výročí založení Československa.

Na valné hromadě Svazu konané 10 května 2018 na Novotného lávce v Praze 1 byly předány 4 medaile Christiana J. Willenberga. Dvě z nich obdrželi naši členové, a to paní prof. Ing. Jana Zabranská, CSc. a pan prof. Ing. Michal Dohányos, CSc. Další dvě pak pan Ing. Josef Proškovec, CSc. (Společnost Škoda, z.s.) a pan Ing. Jan Czudek (Česká hutnická společnost, z.s.). Medaile Christiana J. Willenberga je nejvyšším vyznamenáním, které uděluje ČSVTS (<http://www.csvts.cz/index.php/cs/>). CH. J. Willenberg byl stavební inženýr, který se zasloužil o založení Českého vysokého učení technického v Praze. Je i zakladatelem technické knihovny, neboť jeho knihy byly počátečním příspěvkem jejího založení. To nás, co působíme v Dejvicích, kde je současná technická knihovna v nové budově lokalizována, musí velmi potěšit.

Redakce Biopropectu Vám přeje příjemné prožití letních dnů a těší se na další spolupráci.

Se srdečnými pozdravy

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová



UNIVERSITY OF
CHEMISTRY AND
TECHNOLOGY
PRAGUE



International Conference on

**New Breeding Techniques (NBT) -
Hope for Agriculture and Food Chain**

13th September 2018

9:30 a.m. – 2:00 p.m.

**University of Chemistry and Technology Prague
Technická 5, Prague 6**

Admission FREE, REGISTRATION is needed

Info on: <https://www.biotrin.cz/konference-o-novych-technikach-slechteni-rostlin/?preview=1>

MIKROSKOPY ODHALUJÍCÍ 3D-STRUKTURY PROTEINŮ V TÉMĚŘ ATOMÁRNÍM ROZLIŠENÍ: SCIENCE FICTION NEBO REALITA?

Michaela Rumlová

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha
michaela.rumlova@vscht.cz

Úvod

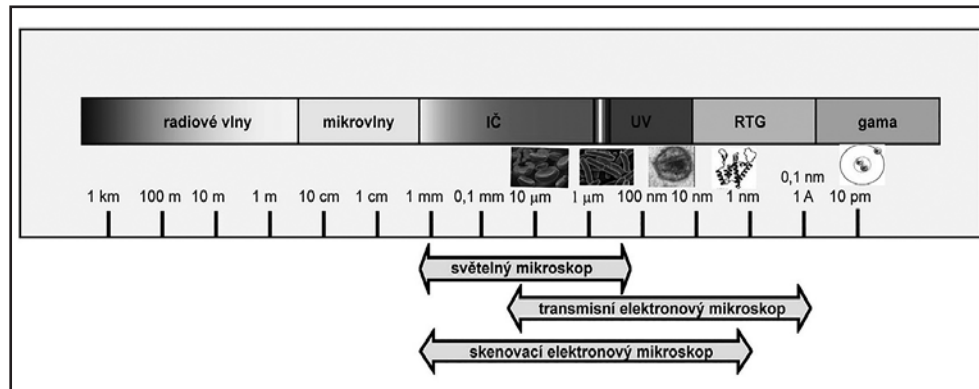
Mikroskopy představují v současnosti jedno z nepostradatelných vybavení řady klinických a mikrobiologických laboratoří. Neslouží ovšem pouze k pozorování buněk či buněčných procesů, ale současný trend ukazuje, že speciální typy elektronových mikroskopů tzv. kryo-elektronové mikroskopy (kryo-EM), se dají použít i pro určování trojdimensionálních (3D) struktur. A to nejen struktur větších a symetrických makromolekulových komplexů, jako například virových částic, ale i struktur jednotlivých proteinů. Pro zjišťování 3D struktur proteinů se až donedávna využívaly zejména dva přístupy: rentgenová krystalografie a nukleární magnetická resonance (NMR). Nicméně nedávný pokrok v detekci elektronů a zpracování obrazu způsobil doslova revoluci v rozlišení, a kryo-EM začíná na poli strukturní analýzy soupeřit s rentgenovou krystalografií.

Důvodů je několik, zejména však to, že kryo-elektronové mikroskopy analyzují biologické preparáty téměř v jejich přirozeném stavu. Vzorky totiž nemusí být krystalizovány, fixovány ani barveny, ale jsou připraveny pouze prudkým zamražením (vitrifikací). Další velkou výhodou oproti strukturním analýzám rentgenovou krystalografií a NMR, které vyžadují velké množství purifikovaného materiálu (většinou několik miligramů) je fakt, že kryo-EM je schopná analyzovat velmi malé množství vzorku (desetinu miligramu). Během posledních několika let byla pomocí kryo-EM rekonstruována celá řada 3D struktur různých typů proteinů či proteinových komplexů v rozmezí molekulových hmotností od stovky po několik tisíc kDa a v rozlišení kolem 2 – 4 Å.

Od světelného po elektronový mikroskop

Pokud se řekne: „mikroskop“, většině z nás se vybaví běžný stolní světelný mikroskop, používaný pro pozorování mikrometrových objektů, se kterým jsme se setkali ve školních praktikách z biologie a mikroskopovali např. vlasy, struktury listů ale i jednotlivé buňky, živočišné či bakteriální. Abychom se ale mohli podívat dovnitř do buňky, např. na detaily jednotlivých organel, světelný mikroskop nám už stačit nebude. Základní

charakteristikou mikroskopů je totiž jejich rozlišovací schopnost. Tu lze definovat jako nejmenší vzdálenost dvou bodů pozorovaného objektu, kdy ještě nesplynou v jeden a můžeme je rozlišit. Tato mez rozlišení mikroskopu je úměrná vlnové délce použitého záření. V případě světelného mikroskopu je jako zdroj záření využito viditelné světlo, které má rozsah vlnových délek přibližně od 380 – 750 nm. Špičkové světelné mikroskopy mají rozlišovací schopnost 0,2 μm (200 nm). Jelikož velikost běžné živočišné buňky se pohybuje kolem 10 – 30 μm a bakteriální buňky kolem 1 μm, lze tyto objekty světelným mikroskopem pozorovat. Pokud ale chceme pozorovat objekty menších rozměrů, musíme využít jiný zdroj záření o kratších vlnových délkách. V mikroskopii se využívá proud elektronů, který má vlnovou délku v rozmezí přibližně 0,01 – 0,001 nm, tedy dostatečně krátkou na vizualizaci detailů objektu na atomové úrovni (Obr. 1).



Obr. 1: Spektrum a vlnové délky elektromagnetického záření. Znázornění oblastí využívaných pro mikroskopii.

Mikroskopy, které místo světelného svazku používají tok elektronů, urychlený elektrickým polem, se označují elektronové mikroskopy. Jsou to také optická zařízení, jen místo skleněných čoček využívají čočky elektromagnetické. Další odlišností je, že svazek elektronů i pozorovaný preparát musí být umístěny ve vakuu. To je z toho důvodu, že za normálních podmínek elektrony interagují s molekulami plynů v atmosféře, čímž dochází k ovlivnění jejich dráhy letu. Za sestavení prvního elektronového mikroskopu v letech 1928 – 1933 byla Ernestu Ruskovi v roce 1986 udělena Nobelova cena. Rozlišení se oproti tehdy dostupným mikroskopům zlepšilo přibližně na cca 10 nm, takže bylo možno pozorovat podstatně menší objekty, např. velké molekuly DNA, RNA či velké komplexy, např. ribosomy. Od dob prvního elektronového mikroskopu šel technologický

vývoj směrem k většímu rozlišení, takže některé typy moderních kryo-elektronových mikroskopů určených pro biologii jsou schopny určovat trojrozměrné struktury proteinů o velikosti stovek kilodaltonů. Dosažená rozlišení umožňují rozlišit postranní řetězce jednotlivých aminokyselin.

Podle způsobu přípravy vzorku a tvorby obrazu můžeme elektronové mikroskopy rozdělit na dva základní typy: skenovací nebo také někdy nazývaný řádkovací (SEM) a transmisní elektronový mikroskop (TEM). V případě SEM jsou analyzované vzorky většinou potažené kovovou vrstvou, aby se od ní dopadající elektrony mohly odrážet. Tyto odražené elektrony jsou zachyceny detektory, obraz je zvětšen, optikou mikroskopu zaostřen a převeden na viditelné záření snímáné např. CCD (z angl. charge coupled device) kamerou. Výsledným obrazem je snímek, který zachycuje povrchovou strukturu preparátu. U TEM je nezbytné připravit velmi tenký vzorek (o tloušťce většinou 100 nm), aby jím mohly elektrony procházet. Elektrony pozorovaným preparátem procházejí a pomocí objektivu je vytvořen elektronový obraz. Obraz je zvětšen, a zaostřen na zobrazovací systém např. stínítko z luminiscenčního materiálu či převeden na viditelné záření, které je zaznamenáváno např. CCD kamerou. Lze tedy říci, že SEM technika je využívána spíše pro zobrazení povrchů vzorků, zatímco pomocí TEM můžeme pozorovat a analyzovat vnitřní struktury vzorku (Obr. 2).

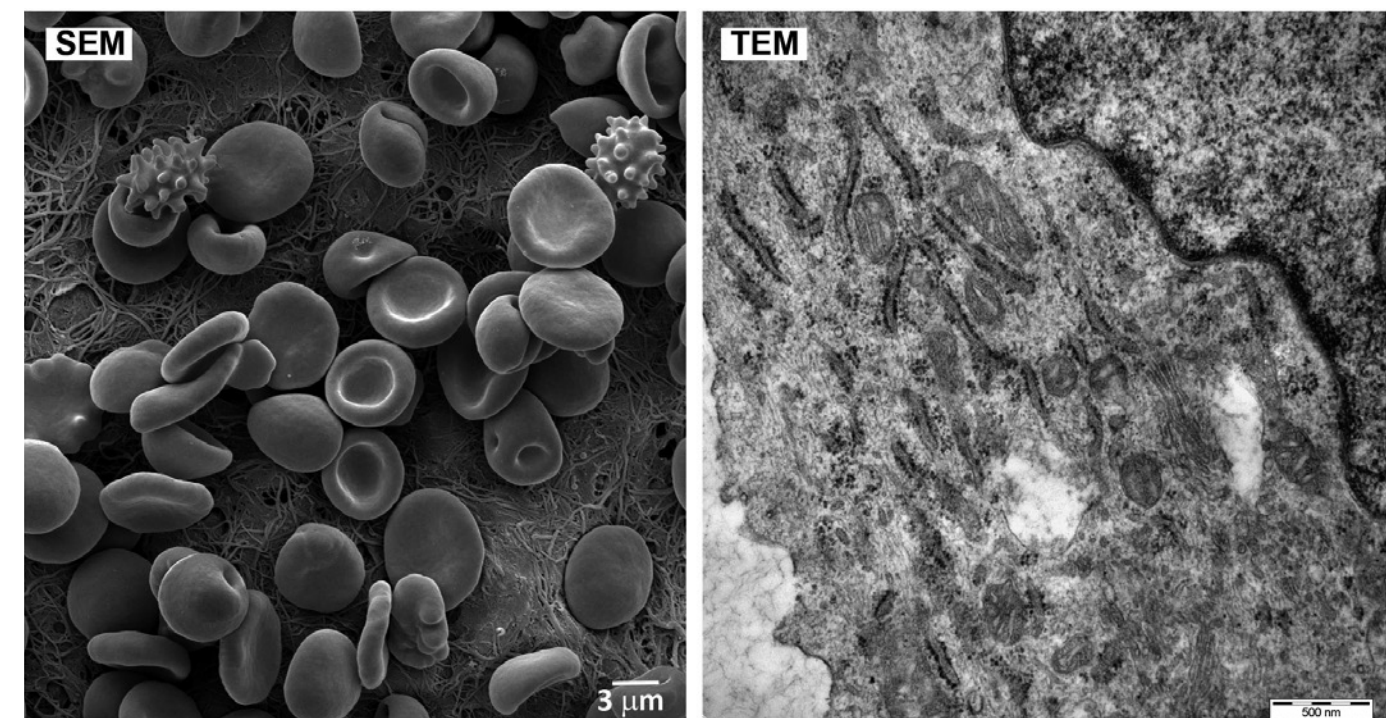
Protože ve vzduchu by docházelo k rozptylu elektronů, musí být elektronové mikroskopy provozovány za vysokého vakua. Za těchto podmínek dochází k rychlému odpařování vody a to pro biologické vzorky, které obsahují vodu a přirozeně se vyskytují ve vodném prostředí, představuje značnou komplikaci. Navíc ionizující záření štěpí chemické vazby, a tak biologický materiál

poškozuje. Další komplikací je, že biologické vzorky jsou velmi málo kontrastní a je proto nutné je barvit. Při TEM se pro barvení používají roztoky solí těžkých kovů, které přímo interagují s přichozími elektrony a vytváří příslušný fázový kontrast. A i když v takto negativně zbarveném a na vzduchu vysušeném biologickém vzorku zůstává navázáno značné množství vody, po jeho vložení do vstupní komory elektronového mikroskopu a vystavení vysokému vakuu, je tato voda rychle odstraněna. Ztráta hydratačního obalu biologického preparátu může způsobit jeho částečné poškození a vznik artefaktů. Vzhledem k velikosti krystalků použitých solí, která se pohybuje řádově kolem 5 až 7 Å pro barvicí roztoky jako je uranyl-acetát nebo fosfowolframová kyselina, je rozlišení limitováno také tímto parametrem.

Kryo-elektronová mikroskopie

Jednou z možností, jak biologické vzorky uchovat v téměř přirozeném prostředí a částečně je tak ochránit před ionizujícím zářením, je mikroskopování při velmi nízkých teplotách, tedy využití kryo-elektronové mikroskopie (kryo-EM). Vzorek je rychle zamražen na velmi nízkou teplotu, většinou okolo –180°C, a i samotné mikroskopování probíhá při této teplotě. Základy k metodě super-rychlého zmrazení, tzv. vitrifikaci vzorku, položil v osmdesátých letech minulého století Jacques Dubochet^{1,2}. Principem je, že zmrazení vzorku musí proběhnout tak, aby voda byla převedena v amorfní pevnou látku (tzv. skelný led) a nedošlo k tvorbě ledových krystalků.

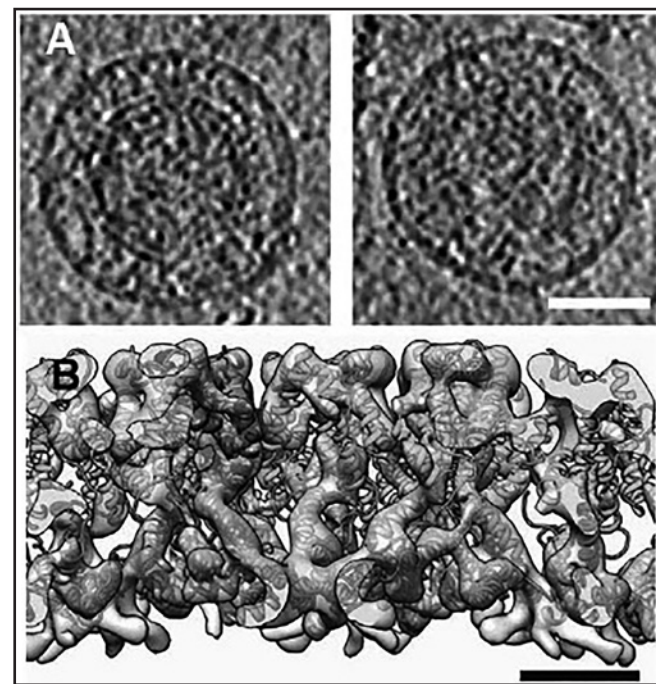
Analýzovaný vzorek (stačí pouze pár mikrolitrů o poměrně nízkých koncentracích) je nanesen na speciální elektronmikroskopické sítky a zmrazen. Jako nejběžnější kryogen je používán kapalný ethan. Zmrazení vede k vytvoření tenké vrstvy nekystalického, sklovi-



Obr. 2: Znázornění buněk pomocí SEM a TEM. Vlevo SEM snímek lidských erythrocytů, vpravo TEM snímek ultratenkého řezu lidskou embryonální ledvinovou buňkou (HEK 293). Laskavě poskytnuto Ing. Jiřinou Kaufmanovou (SEM) a Ing. Romanou Hadravovou (TEM).

tého (vitrifikovaného) ledu. V této vrstvě jsou přítomny analyzované částice, náhodně natočené v nejrůznějších orientacích. Připravené vzorky jsou v zmrazeném stavu vloženy do mikroskopu a za použití nízkých dávek elektronů, aby nedošlo k poškození vzorku, jsou snímány obrazy. Získaný obraz zachycuje analyzované částice ve dvourozměrné (2D) projekci (Obr. 3A)³.

Ačkoliv poměr signálu k šumu pozadí je na těchto snímcích velmi nízký (vzorky nejsou barveny ani kontrastovány), analýzou mnoha odlišných 2D obrazů částic v různých orientacích a jejich následným průměrováním lze ještě zlepšit poměr signálu k šumu, a tím pádem i získat vyšší rozlišení. Jelikož jsou analyzované částice náhodně orientovány, lze pořídit sadu snímků zachycujících analyzovanou částici z mnoha různých pohledů. Spojením mnoha tisíců těchto odlišných snímků lze vytvořit 3D rekonstrukci struktury o vysokém rozlišení⁴ (Obr. 3B)³.



Obr. 3: (A) Kryo-EM snímek purifikovaných retrovirových částic, měřítko 50 nm. (B) získaná 3D rekonstrukce struktury, měřítko 25 Å. (adaptováno z ref. 3)

Vyšší poměry signál : šum a tedy vyšší rozlišení bylo možno získat pro větší proteinové komplexy, komplexy s navázanými nukleovými kyselinami, či komplexy vykazující vnitřní symetrii. To vysvětluje, proč struktury ikosaedrálních virových kapsid a ribosomů byly dlouho v popředí kryo-EM analýzy. Největší pokroky v rozlišení byla zaznamenána právě pro velké ikosaedrální viry. V roce 1997 byla kryo-EM rekonstruována struktura viru hepatitidy B v rozlišení 7,4 Å⁵ a 9 Å⁶, které poprvé umožnilo rozlišit hlavní prvky sekundární struktury. V roce 2008 bylo zrekonstruováno několik virových struktur o vyšším rozlišením⁷⁻⁹ včetně struktury epsilon-15 viru s rozlišením 4,5 Å⁷. V roce 2010 pak byly získány kryo-EM mapy, s dostatečným rozlišením pro *de novo* vytvoření atomových modelů pro Aquareovirus (3,3 Å)¹⁰ a Adenovirus (3,6 Å)¹¹.

Pro částice bez symetrie, byla 3D rekonstrukce daleko obtížnější. Teoretické odhady, předpovídající,

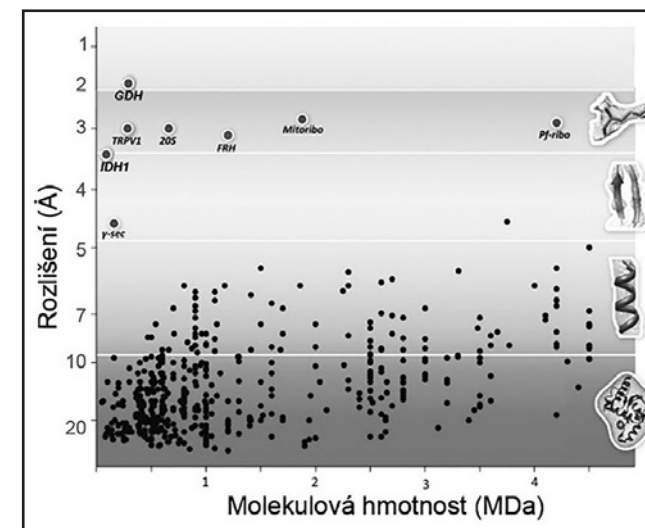
že by pomocí kryo-EM mělo být možné stanovit struktury s atomárním rozlišením (tedy 1 Å) pro proteinové komplexy s molekulovou hmotností kolem 100 kDa¹² se zdály být až příliš optimistické. Až na téměř atomární strukturu bakteriorhodopsinu¹³, která byla za ohromného úsilí získána pozdějším nositelem Nobelovy ceny Richardem Hendersonem a jeho kolegy, většina kryo-EM vyřešených struktur dostupných do roku 2010 nedosahovala takovýchto rozlišení. V té době, kryo-EM struktury komplexů s nízkou nebo žádnou symetrií dosahovaly rozlišení okolo 7 – 9 Å. Při tomto rozlišení jsou ve formě tyčinkám podobných útvarů viditelné alfa helixy, avšak beta struktury či postranní řetězce aminokyseliny rozlišit nelze¹⁴.

Neschopnost dosáhnout teoreticky možné rozlišení byla částečně způsobena neefektivní detekcí elektronů. Nízký počet elektronů, používaný z důvodů minimalizace poškození vzorků při ionizaci, způsoboval příliš vysoký šum pozadí, který zabíhalo spolehlivému určení orientace analyzovaných částic.

Revoluce v rozlišení aneb pokroky v kryo-EM

To vše se ale změnilo nedávným technologickým vývojem, který znamenal v kryo-elektronové mikroskopii ohromný průlom a doslova „revoluci v rozlišení“. Tento trend byl umožněn úspěchy ve dvou oblastech: v detekční technologii^{15,16} a ve zpracování obrazu a 3D rekonstrukci¹⁷.

V roce 2012 byly zavedeny prototypy nové generace digitálních detektorů elektronů tzv. DDD (z angl. direct electron detector device), umožňující jejich přímou detekci. Počet zaznamenaných elektronů se tím podařilo zvýšit z původní jedné pětiny na polovinu všech procházejících elektronů¹². Navíc modernizovaná elektronika umožnila daleko rychlejší zachycení snímků v podobě filmu. To vyřešilo další problém, který je spojen se zmrazenými hydratovanými vzorky: energie uvolňovaná přicházejícími elektrony způsobuje totiž uvnitř vrstvy ledu pohyb, který vede k rozmazání výsledných snímků. Filmy, zaznamenané během bombardování vzorku elektrony, mohou být zpracovány tak, aby bylo rozmazání účinně odstraněno. Souběžně s tímto vývojem došlo i k velkému pokroku v algoritmech pro klasifikaci a rekonstrukci struktur, umožňující získat nejen samotnou strukturu proteinů, ale i informace o jejich dynamice. Rok 2013, kdy se digitální elektronové detektory staly komerčně dostupnými, znamenal v oblasti kryo-EM revoluci. Vylepšení a automatizace metod pro zpracování obrazu zpřístupnilo tyto techniky i pro „nespecialisty“, neboť nebylo nutné „ladit“ klíčové parametry, ale bylo možné je přímo naměřit¹⁸. V této době se začaly objevovat první 3D struktury vzorků v téměř atomárním rozlišení, zahrnující pestrou škálu makromolekul. Ukázalo se, že stanovení 3D struktury proteinů či jejich komplexů o molekulové hmotnosti menší než 200 kDa je reálně dosažitelné pomocí kryo-EM^{19,20}. Nejnovější kryo-EM struktury se dostávají pod rozlišení 3Å²¹⁻²⁴, ale byly už publikovány práce, ve kterých byla překonána hranice 2Å²⁰ (Obr. 4).



Obr. 4: Vývoj kryo-elektronové mikroskopie z hlediska rozlišení i velikosti analyzovaných molekul. Černé tečky reprezentují kryo-EM struktury stanovené v letech 2000 – 2012, šedivé tečky s bílým okrajem jsou některé vybrané struktury publikované od 2013 dosud: γ-sekretasa (γ-sec), 20S proteasom, F420 (NiFe) hydrogenasa, velká podjednotka kvasinkového mitochondriálního ribosomu (Mitoribo), cytoplasmatický ribosom *Plasmodium falciparum* (Pf-ribo), glutamátdehydrogenasa (GDH), isocitrátdehydrogenasa (IDH1). (adaptováno z ref. 15)

Tyto úspěchy vedly také k tomu, že v roce 2017 byla udělena Nobelova cena za chemii právě třem průkopníkům kryo-elektronové mikroskopie: Jacquesi Dubochetovi, Richardu Hendersonovi a Joachimmu Frankovi.

Kryo-elektronová tomografie

Aplikace kryo-EM v biologii zahrnuje široké spektrum možných analýz: od zobrazování neporušených částí tkáně, jednotlivých buněk, virových částic až po molekuly bílkovin. Pro analýzu biologických struktur se postupně vyvinuly dva hlavní směry kryo-elektronová tomografie (kryo-ET) a 3D rekonstrukce jednotlivých makromolekul neboli částic (single-particle analysis: SPA)²⁵. Tyto metody byly použity jednotlivě i v celé řadě dalších přístupů, ve kterých jsou informace získané kryo-EM kombinovány s doplňujícími informacemi např. z rentgenové krystalografie či NMR.

Obecně postupy 3D rekonstrukce struktur individuálních molekul vyžadují, aby tyto molekuly byly izolovány. Pro mnoho biologických molekul, jako jsou např. membránové proteiny, velké buněčné ultrastruktury či pleomorfní virové částice, však izolace z jejich přirozeného prostředí může znamenat ztrátu či poškození jejich charakteristického strukturního rysu. Příčina může být prá-

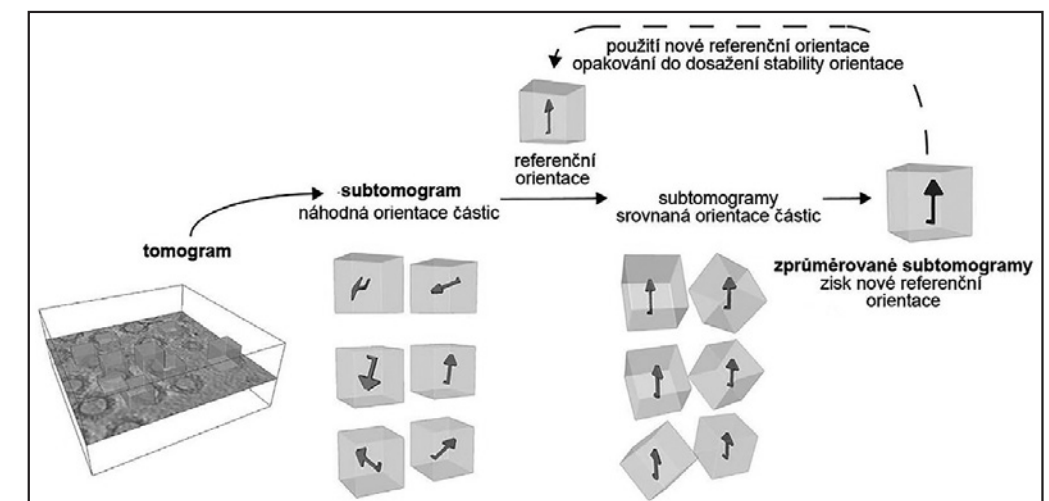
vě v izolaci, kdy může dojít k odstranění přechodných vazebných partnerů, které ale mohou důležité pro nativní „*in situ*“ konformaci analyzovaných částic. V těchto případech je tedy nutné analyzovat částice v jejich původním prostředí, např. v membráně, v příslušné organelle, nebo v rámci celé buňky. Tento přístup je označován jako kryo-elektronová tomografie (kryo-ET) a umožňuje vyřešení strukturních vlastností analyzovaných částic i ve složitých nativních podmínkách, dokonce i uvnitř buňky.

Kryo-ET umožňuje 3D rekonstrukci z množiny získaných 2D obrazů různě orientovaných biologických vzorků. Rekonstrukční přístupy kryo-ET se odlišují od těch, používaných pro analýzu makromolekul a postupy používané pro 3D rekonstrukci individuálních makromolekul nelze často aplikovat pro analýzu komplexů *in situ*. Důvodem je právě přítomnost „kontaminujících“ molekul z prostředí, vyskytujících se okolo analyzovaných částic. Tyto molekuly často překrývají příslušný kryo-EM snímek a komplikují následnou analýzu obrazu²⁶.

V kryo-ET dochází k naklápění analyzovaného vzorku do přesně definovaných úhlů, a při každém naklopení je snímán a ukládán obraz vzorku. Z této sady mnoha kopií 2D obrazů, je poté sestavena 3D rekonstrukce analyzovaného vzorku neboli tomogram. K odstranění kontaminujících struktur z prostředí a zvýšení poměru signálu k šumu a rozlišení, mohou být 3D obrazy analyzovaných částic z celého tomogramu „vystříženy“ za vytvoření tzv. subtomogramu. Následně dochází ke srovnání orientace jednotlivých částic na příslušných subtomogramech a jejich průměrování. Iterace těchto posledních dvou kroků probíhá až do dosažení největšího možného rozlišení (Obr. 5). Výsledkem je detailní informace o 3D struktuře částice analyzované *in situ*^{4,26}.

3D rekonstrukce jednotlivých makromolekul nebo částic (single-particle analysis)

Principem SPA je průměrování tisíců snímků identických molekul. Základní předpoklad je, že trojrozměrné objekty, které jsou reprezentovány jejich nasnímanými



Obr. 5: Schéma pracovního postupu průměrování subtomogramů v kryo-ET. (adaptováno z ref. 4)

dvourozměrnými projekcemi, jsou totožné. Na rozdíl od tomografie, která zaznamenává více pohledů na stejný biologický objekt ze sérií různě nakloněných tomogramů, strategii SPA je shromažďování dat z mnoha kopií identických biomolekul. Vzhledem k tomu, že jednotlivé molekuly zamrzly během přípravy vzorku v náhodných orientacích, není nutné naklápění vzorku.

Typické soubory dat pro SPA se skládají z tisíců obrazů, z nichž každý obsahuje až tisíc projekcí biologické molekuly v různých směrech. Proces rekonstrukce obrazu alternuje mezi dvěma kroky: hledání orientace pro všechny projekce částice a 3D rekonstrukce. Během rekonstrukce jsou všechny orientované projekce částic zobrazeny ve 3D poli a je vytvořena 3D elektronová mapa. Tento cyklus se obvykle opakuje tak dlouho, dokud se zvyšuje rozlišení.

Závěr

Nedávný vývoj v oblasti hardware a vylepšení software pro zpracování obrazu, který vedl ke zvýšení rozlišení analýzy částic, odstartoval novou éru kryo-EM.

Literatura

1. Dubochet, J. & McDowell, A. W.: *J Microsc-Oxford* 124(Dec), Rp3 (1981).
2. Dubochet, J., Adrian, M., Teixeira, J., et al.: *J Phys Chem-Us* 88(26), 6727 (1984).
3. Schur, F. K., Hagen, W. J., Rumlova, M., et al.: *Nature* 517(7535), 505 (2015).
4. Briggs, J. A.: *Curr Opin Struct Biol* 23(2), 261 (2013).
5. Bottcher, B., Wynne, S. A. & Crowther, R. A.: *Nature* 386(6620), 88 (1997).
6. Conway, J. F., Cheng, N., Zlotnick, A., et al.: *Nature* 386(6620), 91 (1997).
7. Jiang, W., Baker, M. L., Jakana, J., et al.: *Nature* 451(7182), 1130 (2008).
8. Yu, X., Jin, L. & Zhou, Z. H.: *Nature* 453(7193), 415 (2008).
9. Zhang, X., Settembre, E., Xu, C., et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6), 1867 (2008).
10. Zhang, X., Jin, L., Fang, Q., et al.: *Cell* 141(3), 472 (2010).
11. Liu, H., Jin, L., Koh, S. B., et al.: *Science* 329(5995), 1038 (2010).
12. Fernandez-Leiro, R. & Scheres, S. H.: *Nature* 537(7620), 339 (2016).
13. Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., et al.: *J Mol Biol* 213(4), 899 (1990).
14. Bai, X. C., McMullan, G. & Scheres, S. H.: *Trends Biochem Sci* 40(1), 49 (2015).

Během posledních pár let byly pomocí SPA vyřešeny struktury různých typů proteinů či jejich komplexů v rozmezí velikostí od stovky po několik tisíc kDa, v rozlišení 3 Å^{21-24,27,28} či dokonce menším než 2 Å²⁰. V kombinaci s kryo-ET, která umožňuje určení 3D struktury vysoce složitých, pleomorfních proteinových komplexů v jejich přirozeném prostředí v kontextu buňky či organely, představuje dnešní moderní kryo-EM silný nástroj pro určování trojrozměrné struktury biologických makromolekul, včetně analýzy jejich dynamiky.

Poděkování

Autorka tímto děkuje prof. Ing. Tomáši Rumlovi, CSc a doc. Ing. Pavel Ulbrichovi, Ph.D. za pomoc při sepisování manuskriptu.

15. McMullan, G., Faruqi, A. R. & Henderson, R.: *Methods in enzymology* 579(1) (2016).
16. McMullan, G., Chen, S., Henderson, R., et al.: *Ultra-microscopy* 109(9), 1126 (2009).
17. Ripstein, Z. A. & Rubinstein, J. L.: *Methods in enzymology* 579(103) (2016).
18. Scheres, S. H.: *J Mol Biol* 415(2), 406 (2012).
19. Bai, X. C., Yan, C., Yang, G., et al.: *Nature* 525(7568), 212 (2015).
20. Merk, A., Bartesaghi, A., Banerjee, S., et al.: *Cell* 165(7), 1698 (2016).
21. Banerjee, S., Bartesaghi, A., Merk, A., et al.: *Science* 351(6275), 871 (2016).
22. Bartesaghi, A., Merk, A., Banerjee, S., et al.: *Science* 348(6239), 1147 (2015).
23. Campbell, M. G., Veesler, D., Cheng, A., et al.: *Elife* 4((2015).
24. Grant, T. & Grigorieff, N.: *Elife* 4(e06980) (2015).
25. Murata, K. & Wolf, M.: *Biochim Biophys Acta* 1862(2), 324 (2018).
26. Wan, W. & Briggs, J. A. G. (2016). *Methods in enzymology*, edited by R. A. Crowther, pp. 329: Academic Press.
27. Fischer, N., Neumann, P., Konevega, A. L., et al.: *Nature* 520(7548), 567 (2015).
28. Yu, G., Li, K., Huang, P., et al.: *Structure (London, England : 1993)* 24(11), 1984 (2016).

POHLED DO NITRA ŽIVÝCH BUNĚK BEZ INVAZIVNÍ CHEMIE POMOCÍ HOLO-TOMOGRAFIE

Michaela Pluskalová

HPST, s. r. o.; michaela.pluskalova@hpst.cz

Úvod

Ernst Abbe definoval před 140 lety základní paradigma optické mikroskopie, které limituje použití světelných objektivů na rozlišení detailů bližších, než je polovina vlnové délky světla použitého k pozorování. Dobu posledních několika let lze charakterizovat razantním rozvojem mikroskopických technik, které dokázaly tyto základní teze prolomit a postoupit za jejich hranice^{1,2}. V tomto článku bychom Vám rádi přiblížili novou techniku, jejíž hlavní předností je možnost sledování buněčných dějů bez potřeby barvení a možnost kombinovat ji s fluorescenčně značenými sondami. K tomuto účelu byl vyvinut holografický mikroskop 3D Cell Explorer-*fluo* švýcarskou společností Nanolive. Tradiční mikroskopické techniky vyžadují složité a časově náročné protokoly přípravy vzorků, které jsou ve větší či menší míře invazivní vůči buňkám s rizikem jejich poškození. Revoluční tomografický mikroskop 3D Cell Explorer umožní pohlédnout do intracelulárního prostoru živých buněk bez potřeby buňky jakkoliv značit. Během vteřin je možné zaznamenat 3D obraz buněk ve vysokém rozlišení a sledovat interakce buněk, reakce buněk na ošetření, virologické či bakteriální napadení a různé další podněty atp. Připojení fluorescenčního modulu dovoluje kombinovat vysoce kvalitní tomografická data s fluorescenčními markery pro přesnou identifikaci organel nebo detekci proteinů. Švýcarská společnost Nanolive vyvinula tento unikátní neinvazivní a velmi rychlý nástroj, který lze využít v různých oblastech výzkumných, ale i diagnostických, počínaje buněčnou biologií, neurologií a studiem interakcí buněk, přes onkologický a toxikologický výzkum, či vývoj nanomateriálů.

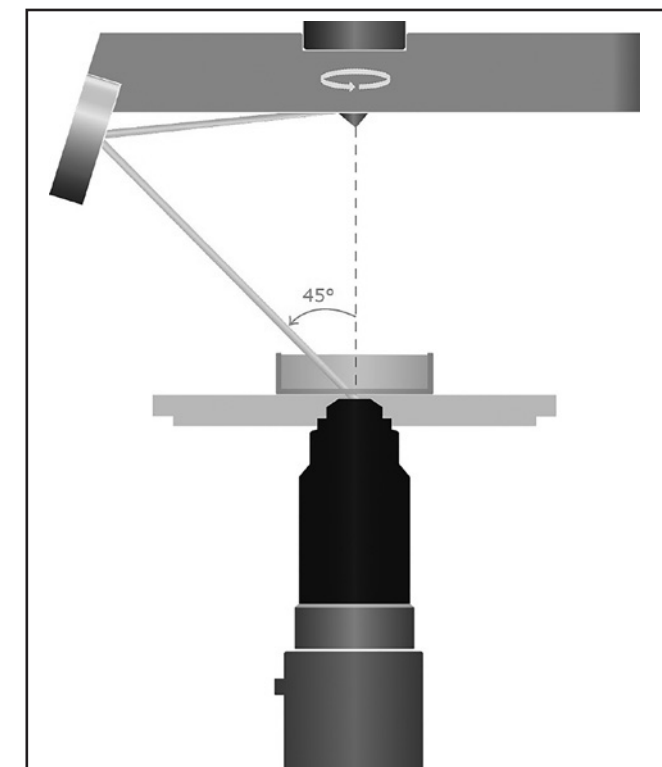
Nanolive SA

Buněčné dobrodružství 3D Cell Exploreru začalo na polytechnické univerzitě EPFL ve švýcarském Lausanne během doktorského studia Dr. Yanna Cotte a Dr. Fatiha Toy v Laboratoři mikrosystémů prof. Christiana Depeursinge. Popsali mikroskopickou kvantitativní metodu, která přesáhne optický difrakční limit a umožní pozorování živých buněk bez jakéhokoliv dalšího značení nebo modifikace³. Pro realizaci jejich teorie vznikla koncem roku 2013 společnost Nanolive SA jako start-up v EPFL Innovation Park pro vývoj hardware a softwaru. Nanolive úspěšně sestavili první mikroskop 3D Cell Explorer a uvedli na trh v roce 2015. Jeho vlastnosti se dají shrnout do čtyř podstatných základních parametrů.

1. Pro získání dostatečného kontrastu využívá holografii.
2. Rotačním skenováním se získává tomografická informace.
3. Zařízení se samo kalibruje a je snadné pro obsluhu.
4. Pokročilé algoritmy umožňují rychlou rekonstrukci obrazu.

Nanolive technologie

Technologie Nanolive kombinuje holografii s rotačním skenováním a detekuje změny světla, které prochází buněčnými strukturami, tzn. 4D distribuci fyzikální veličiny lomu světla v buňce (Obr. 1). Využívá toho, že každá buňka má svou vlastní komplexní strukturu. Vzorek se umístí mezi objektiv s vysokou clonou a rotační rameno se zdrojem světla, kterým je laserová dioda se zeleným paprskem o vlnové délce 520 nm. Laserový paprsek se rozděluje na dva paprsky, z nichž první prochází vzorkem a druhý je referenční. Vzorkem prochází laserový paprsek pod úhlem 45° a pomocí rotačního ramene se otáčí 360° okolo vzorku. Zaznamenává se série hologramů díky kombinaci referenčního paprsku a paprsku procházejícího vzorkem. Výsledný obraz se zobrazí na monitoru počítače již během 2 sekund. Mikroskop má velikost zobrazeného pole 80X80X30 μm s vertikálním rozlišením 500 nm and laterálním 200 nm. Ač se tedy jedná o světelný mikroskop, tímto „trikem“ lze překonat omezení v rozlišení světelné mikroskopie dané vlnovou délkou světla a dostaneme se na úroveň skenovacího elektronového mikroskopu³.

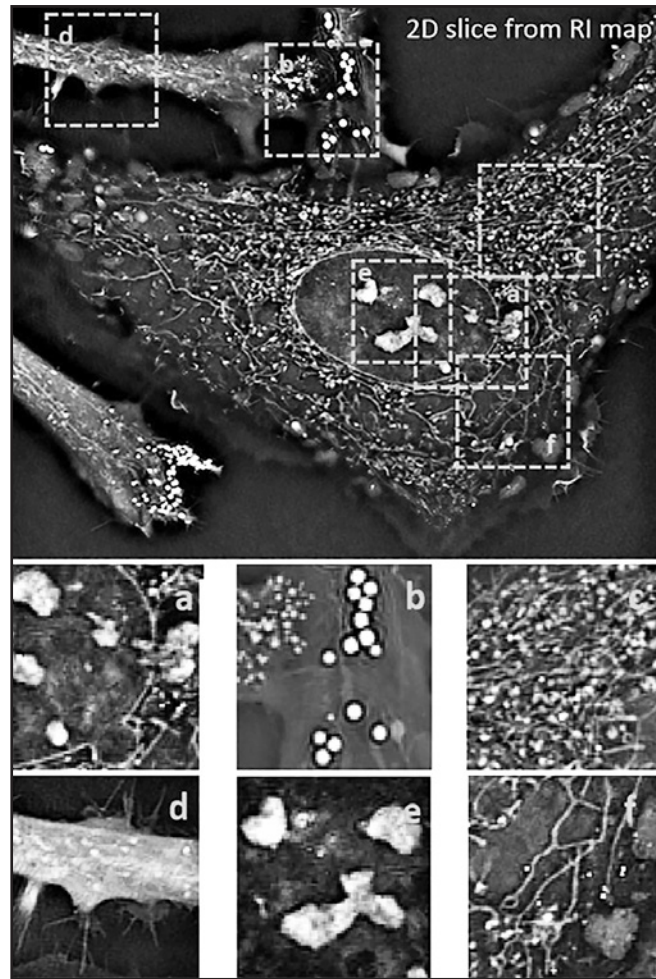


Obr. 1: Schéma průchodu laserového paprsku vzorkem do objektivu pod úlem 45° pomocí rotačního ramene, které se otáčí okolo vzorku a po každém otočení o 3,6° zaznamenává obraz. V kombinaci s referenčním paprskem se tak získá série 96 hologramů a lze vytvořit prostorovou rekonstrukci buňky. (Zdroj Nanolive SA)

Konstrukce mikroskopu je až překvapivě rozměrově malá, avšak velmi stabilní a elegantní. To je umožněno unikátním řešením jednodílné základní konstrukce. Software Steve pro obsluhu mikroskopu i následnou 3D rekonstrukci je uživatelsky velmi příznivý. Začít pracovat s mikroskopem je tak možné již po krátkém zaškolení. Optika mikroskopu je samozaostřovací, což je zajímavé zvláště při dlouhodobějším sledování buněk.

Pro monitorování buněčných procesů v delším časovém úseku je možné použít stolní inkubátor, do kterého se vloží mistička se vzorkem buněk v kultivačním médiu. Lze tak sledovat v přímém přenosu buněčné pochody v přirozeném prostředí (5 CO₂ & 37°C, vlhkost) po celé hodiny i dny, kde by jediným omezením mohla být pouze paměť připojeného počítače. Dlouhodobé pozorování buněk je možné i díky použitému nízkoenergetickému laseru, který je vůči živým buňkám zcela šetrný.

Praktickým příkladem možnosti detailního zobrazení intracelulárních struktur je snímek myšního fibroblastu na obr. 2 převzatý od Nanolive SA. Jedná se o živé buňky v kultivačním médiu, které byly umístěny v kontrolovaném prostředí stolního inkubátoru. Je možné jasné rozeznat jaderné struktury (jádro, jadérko a jadernou membránu), síť mitochondrií, lipidové kapénky, lysosomy a plasmatickou membránu.



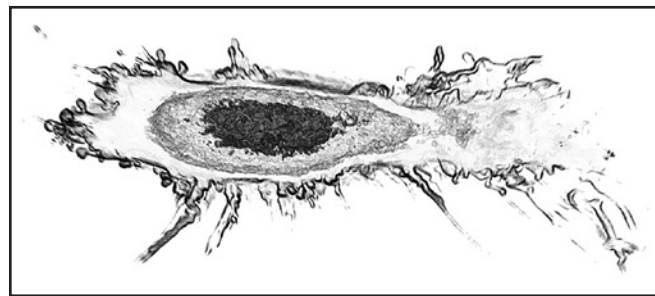
Obr. 2: Intracelulární struktury v živém myším fibroblastu: a. jádro a jaderná membrána, b. lipidové kapénky, c. lysosomy, d. plasmatická membrána, e. jadérko, f. mitochondrie. (Zdroj Nanolive SA)

Pro přesnou detekci intracelulárních organel je možné kombinovat holografii i s fluorescenčními značkami a zaznamenat epi-fluorescenci pomocí fluorescenčního modulu. Můžete tak využít zároveň výhod jak neinvazivní buněčné tomografie, tak i multikanálové epi-fluorescence. 3D Cell Explorer-fluo disponuje třemi fluorescenčními kanály, které se střídají v řádu mikrosekund. Po vysvícení fluorescenčního signálu však můžeme pokračovat pohodlně dále s pozorováním buněk na úrovni tomo-holografie.

Rekonstrukce obrazu ve 3D

Základním grafickým výstupem je černobílý obraz složený ze 100 vrstev, mezi kterými lze přecházet podobně jako u výstupů z konfokálního mikroskopu. Obraz se vytváří z tzv. voxelů (3D pixely), což jsou specifické hodnoty indexu lomu a prostorových koordinát. Na rozdíl od fluorescence se jedná o absolutní hodnoty, které jsou vlastností daného biologického systému a jsou fyzikálním znakem organel. Díky tomu je možné snadno, a hlavně jednotně porovnávat vzorky z různých experimentů. Získaný obraz je možné převést do všech základních grafických formátů nebo použít tzv. digitální barvení.

3D obraz lze vytvořit za pomoci tzv. digitálního barvení v softwaru Steve od Nanolive, který lze stáhnout zdarma na libovolný počítač a zpracovávat snímky i dodatečně. Jak již bylo uvedeno, Nanolive vychází z toho, že hodnota indexu lomu je fyzikální charakteristikou buněčných struktur⁴. Software Steve dokáže snadno přiřadit zvolenou barvu k zadané oblasti indexů lomu. Výsledkem jsou krásné 3D rekonstrukce celých buněk. Příkladem je 3D rekonstrukce fibroblastu z lymfatických uzlin na obr. 3. Atraktivní možností je vytvořit digitální řez buňkou a nahlédnout tak neinvazivně do intracelulárního prostoru. Kromě získání jednotlivých snímků je možné zachycovat videa a sledovat tak buňky v čase. I pro účely videosekvencí lze s výhodou použít digitálního barvení a sledovat v přímém přenosu pohyby digitálně obarvených buněk ve 3 D.



Obr. 3: Prostorová rekonstrukce obrazu v softwaru Steve živého fibroblastu z lymfatických uzlin. (Zdroj Nanolive SA)

Závěr

3D Cell Explorer se dostal v roce 2015 mezi The Scientist's Top 10 Innovations. Tato technologie je přelomová možností zachytit v přirozeném prostředí živé neznačené buňky ve vysokém rozlišení, aniž by bylo potřeba je barvit. Oproti nestabilnímu fluorescenčnímu značení,

které je relativní veličinou, je index lomu jednotlivých organel veličinou absolutní, což umožňuje dlouhodobé studie, porovnání různých vzorků stejného biologického původu a zcela neinvazivní dlouhodobé pozorování.

Literatura:

1. Hell SW: *Science* 316(5828) 1153 (2007).
2. Kim T, Zhou R, Goddard LL, Popescu F: *IEEE Photon. J.* 6(2),1943 (2014).
3. Cotte Y, Toy F, Jourdain P, et al.: *Nature Photonics.* 7(2), 113 (2013).

Souhrn

Pluskalová M.: Pohled do nitra živých buněk bez invazivní chemie pomocí holo-tomografie

Nanolive je příkladem rozvíjející se technologie v oblasti nanoskopie, která kombinuje holografii a tomografii (Tomografická difrakční mikroskopie, TDM). Tato technologie nepoužívá žádné značení, proto můžeme pozorovat buňky v jejich přirozeném prostředí, aniž bychom je jakkoliv modifikovali nebo měnili pomocí chemických značek. Můžeme tak zaznamenat všechny důležité životní buněčné pochody a tímto unikátním způsobem lépe pochopit chování buněk. Digitální holografický tomograf 3D Cell Explorer vytváří kolekci 96 vrstev v ose Z, kdy každá vrstva je vlastně detailní mapou indexů lomu (Refractive Index, RI) intracelulárních struktur. Tato inovativní technologie dokáže rekonstruovat ve vysokém rozlišení (x, y:200nm; z:400nm; t:1.7sec) kvalitní trojrozměrný obraz transparentních neznačených vzorků. Buňky je možné umístit do malého inkubátoru, a tak lze monitorovat chování buněk v kontrolovaném prostředí (teplota, CO₂, O₂, vlhkost) po dobu hodin, dnů i týdnů. Díky fyzikální podstatě zaznamenávání indexů lomu, je možné provádět následnou kvantitativní analýzu dat. 3D Cell Explorer-fluo obohacuje tomografická data o možnost kombinace s fluorescenčními značkami a umožňuje tak přesnou identifikaci organel, proteinů nebo dalších látek značených flourescenčně. Tato neinvazivní inovativní technika otevírá možnosti pro nové fascinující aplikace pro studium buněčného cyklu/smrti, studium infekce uvnitř buněk, lokalizaci nanočástic a imuno-onkologii.

Klíčová slova: Tomografická difrakční mikroskopie, TDM, zobrazování živých buněk, holografie, tomografie, index lomu

Summary

Pluskalova M: Look inside live cells without invasive chemistry using holo-tomography

Nanolive technology is an example of emerging smart nanoscopic technique by combining holography with tomography (Tomographic Diffractive Microscopy, TDM). This technology is 100 label free, so we can observe cells in their real environment without any behaviour modifications nor alterations due to chemical markers and capture important events all along cells life time and understanding in a unique way how cells behave. Digital Holographic Tomograph, called 3D Cell Explorer, creates a collection of 96 Z-stacked layers, each layer being a detailed Refractive Index (RI) map of the cells observed. This innovation technique guarantees three-dimensional high spatio-temporal resolution imaging (x, y:200nm; z:400nm; t:1.7sec) of transparent unlabeled specimens. Cells can be cultured and monitored under controlled environment conditions in continuous time-lapse for days/weeks using on-stage incubator. Based on the quantitative nature of the refractive index measurements, the system enables for quantitative data analysis for single cells and tissues. Moreover, 3D-Cell Explorer-fluo enriches high quality tomographic data with fluorescent markers and enables also precise intracellular detection of organelles, proteins or drugs based on fluorescence staining. This not invasive and quantitative imaging technique permits new intriguing applications in the cell death/cell cycle analysis, intracellular infection, intracellular nanoparticles localization and immuno-oncology.

Keywords: Tomographic Diffractive Microscopy, TDM, live cell imaging, holography, tomography, refractive index

SERINOVÉ PROTEASY HELMINTŮ NAPADAJÍCÍCH ČLOVĚKA

Lenka Ulrychová

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR; ulrychova@uochb.cas.cz

Úvod

Proteolytické enzymy (peptidasy, proteasy, proteiny) se hojně nalézají ve všech eukaryotických a prokaryotických systémech včetně virů. Katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb, bílkovin nebo peptidů. Podle místa štěpení se proteasy dělí na exopeptidasy (štěpí na konci peptidového řetězce) a endopeptidasy (štěpí uvnitř peptidového řetězce). Endopeptidasy dále dělíme podle katalytického mechanismu do 6 hlavních tříd na serinové, threoninové, cysteinové, aspartátové, glutamátové proteasy a metaloproteasy. Serinové proteasy (SP) jsou charakterizovány přítomností reaktivního serinového zbytku v aktivním místě enzymu, který je nezbytný pro katalýzu enzymové reakce. SP jsou nejlépe prostudovanou skupinou všech studovaných proteas a mají ze všech tříd nejpočetnější zastoupe-

ní buněk. Připojením fluorescenčního modulu je navíc možné obě technologie, holografii a fluorescenci kombinovat a využít přednosti obou.

4. Pollaro L, Piazza BD, Cotte Y: *www.microscopy-today.com* (2015).

ní. Hrají významnou roli v řadě fyziologických procesů zahrnujících jak nespecifickou degradaci proteinů jako je trávení, tak i specifickou fragmentaci proteinů v procesech jako jsou apoptóza, koagulace, přenos signálu, etc.^{1, 2}. Zároveň hrají významnou roli v řadě patologických stavů v organismu, například při vzniku zánětu či nejrůznějších onemocnění^{3, 4}.

Parazitární helminti (parazitíční červi) jsou pokládáni za významné patogenní organismy, které ohrožují zdraví a život stovek milionů lidí po celém světě. Naprostá většina helmintů patří do dvou významných živočišných kmenů. První kmen představuje parazitické ploštěnce (kmen Platyhelminthes) zahrnující dvě pro člověka nejvýznamnější třídy parazitů: motolice (trematoda) a tasemnice (cestoda). Do druhého kmene jsou zařazeni zástupci hlístic (nematoda). V každé skupině je něko-

lik desítek zástupců, kteří jsou schopni infikovat savce včetně člověka a způsobit závažná onemocnění, která mohou končit smrtí⁵. Odhaduje se, že krevní motolicí rodu *Schistosoma*, která způsobuje závažné onemocnění, je celosvětově infikováno více než 240 miliónů lidí a v tropických oblastech představuje po malárii druhé nejzávažnější parazitární onemocnění⁶. *Fasciola hepatica* ohrožuje nejen lidskou populaci, ale zároveň způsobuje značnou devastaci chovů hospodářských zvířat ve všech částech světa, kde způsobuje velmi závažné ekonomické ztráty⁷. Významnými nematody způsobujícími závažná onemocnění člověka jsou zástupci rodů *Toxocara*, *Trichuris*, *Ancylostoma* či *Filaria*, z řad cestod například *Spiromentra*, *Hymenolepis* nebo *Taenia*. Parazitární onemocnění jsou navíc často komplikována tzv. koinfekcí, kdy je postižený napadený více druhy parazitů^{8, 9}.

Proteasy helmintů se hojně uplatňují při interakci hostitele a parazita, kdy jsou parazitem využívány bě-

hem procesu nákazy, migrace v organismu hostitele a ovlivňování fyziologických funkcí nebo imunitního systému hostitele. Současně hrají SP důležitou roli v nejrůznějších esenciálních procesech parazita, jako jsou příjem potravy, reprodukce či trávení¹⁰⁻¹⁷. Produkce různých typů SP se liší v rámci životního cyklu parazita a probíhá buď po celou dobu jeho života, nebo je vázána pouze na dané životní stádium parazita či na prostředí, ve kterém se parazit momentálně nachází^{18, 19}. Ačkoliv, jak bylo uvedeno výše, patří SP mezi nejlépe prostudovanou skupinu proteas obecně, u helmintů je tomu naopak. Dosavadní výzkum se soustředil zejména na studium cysteinových a aspartových proteas²⁰⁻²⁴, zatímco zájem o serinové proteasy helmintů byl až na výjimky upozaděn. Tento článek proto shrnuje dosavadní poznatky o úloze serinových proteas, které jsou produkovány parazitickými červy rodů nematoda, trematoda a cestoda. Souhrnné informace jsou v tabulce číslo I.

Tabulka I. Stručný přehled serinových proteas (SP) helmintů infekčních pro člověka.

Role SP	Název SP	Biologická funkce	Parazit
Příjem potravy	DPPII	trávení	<i>S. mansoni</i>
	PCP	trávení	<i>S. mansoni</i>
	DPPII	trávení	<i>F. hepatica</i>
	TsSerP	mimotělní trávení	<i>T. spirallis</i>
	TspSP-1	mimotělní trávení	<i>T. spiralis</i>
	85 kDa	mimotělní trávení	<i>T. muris</i> , <i>T. suis</i> , <i>T. trichiura</i>
	105 kDa	mimotělní trávení	<i>T. muris</i> , <i>T. suis</i> , <i>T. trichiura</i>
Rozmnožování	TRY-5	spermatogeneze	<i>C. elegans</i>
	As-TRY-5	spermatogeneze	<i>A. suum</i>
	85 kDa	párování dospělců	<i>T. muris</i> , <i>T. suis</i> , <i>T. trichiura</i>
	105 kDa	usnadnění párování	<i>T. muris</i> , <i>T. suis</i> , <i>T. trichiura</i>
Penetrace do hostitele a tělní migrace	SmCE	penetrace přes kůži	<i>S. mansoni</i>
	ShCE	penetrace přes kůži	<i>S. haematobium</i>
	SdCE	penetrace přes kůži	<i>S. douutthiti</i>
	DPPII	tělní migrace v hostiteli	<i>S. mansoni</i>
	TsSerP	tělní migrace v hostiteli	<i>T. spiralis</i>
	NBL-1	tělní migrace v hostiteli	<i>T. spiralis</i>
	Ts23-2	tělní migrace v hostiteli	<i>T. spiralis</i>
	TspSP-1	tělní migrace v hostiteli	<i>T. spiralis</i>
	TppSP-1	tělní migrace v hostiteli	<i>T. pseudospiralis</i>
	?	tělní migrace v hostiteli	<i>O. volvulus</i>
	?	tělní migrace v hostiteli	<i>T. canis</i>
	85 kDa	tělní migrace v hostiteli	<i>T. muris</i> , <i>T. suis</i> , <i>T. trichiura</i>
	105 kDa	tělní migrace v hostiteli	<i>T. muris</i> , <i>T. suis</i> , <i>T. trichiura</i>
	trypsinová SP	tělní migrace v hostiteli	<i>Sp. mansoni</i>

Tabulka I. (pokračování)

Ovlivnění imunitního systému	spektrum SP	degradace IgE, C3, C4, faktor B, komplemetu faktor H, clusterinu	<i>S. mansoni</i>
	mastiny	vychytávání IgG	<i>S. haematobioum</i> , <i>S. japonicum</i>
	36 kDa	degradace IFN-γ	<i>Sp. mansoni</i>
	?	degradace IgG, albumin	<i>T. canis</i>
	?	degradace C5a	<i>B. malayi</i>
Ovlivnění fyziologických funkcí hostitele	SmSP1	regulace cévního tonu	<i>S. mansoni</i>
	SmSP2	regulace cévního tonu a fibrinolýza	<i>S. mansoni</i>
	SmPOP	regulace cévního tonu	<i>S. mansoni</i>
	27 kDa	adherace krevních destiček na povrch vajec	<i>S. mansoni</i>
	sK1	vazodilatace cév	<i>S. mansoni</i>
	Ag5	neznámá	<i>E. granulosis</i>
	TsAg5	neznámá	<i>T. solium</i>
	36 kDa	ovlivnění krevní koagulace	<i>A. caninum</i>

Role serinových proteas při příjmu potravy a trávení parazitických helmintů

Savci tráví proteinové složky potravy pomocí kaskády proteolyticky enzymů, tvořené serinovými a aspartátovými proteasami jako trypsin, chymotrypsin, pepsin nebo gastricsin. Naproti tomu parazitiční helminti tráví potravu pomocí enzymatické kaskády založené především na cysteinových a aspartátových proteasach^{25,26}. Výsledné produkty jsou následně vstřebány a využity jako živiny potřebné pro růst, zachování základních biologických funkcí a pro rozmnožování. Nematoda a trematoda využívají jako hlavní zdroj energie natrávenou extracelulární matrix, či krev a jiné tělní tekutiny hostitele²⁷. Přestože helminti ve svém střevě degradují potravu zejména pomocí cysteinových a aspartátových proteas, některé práce uvádějí, že SP mohou být také zapojeny do trávicích procesů: například dipeptidyl-peptidasa II (DPPII)^{28, 29} nebo prolyl-karboxypeptidasa (PCP, také známá jako lysosomální Pro-Xaa karboxypeptidasa)²⁹, byly lokalizovány ve střevě helmintů, což naznačuje jejich roli v trávení.

Dále byly SP identifikovány v exkrečně-sekrečních produktech helmintů. Tyto SP jsou uvolňovány parazitem do hostitele, kde štěpí okolní tkáň, které následně slouží jako potrava. Například všechna životní stadia nematoda *Trichinella spirallis* uvolňují z jícnu (oesophagus) do svého okolí serinovou proteasu trypsinového typu TsSerP, která napomáhá v migraci parazita a zároveň se spekuluje o tom, že se účastní příjmu potravy³⁰C. Za podobnými účely vylučuje trematod *Fasciola hepatica* proteasu DPPII či nematod *Trichuris muris* dvě částečně charakterizované SP (85 a 105 kDa)^{31, 32}.

Je nutné zmínit, že motolice absorbují živiny především přes střevní epitel, ale jsou také schopné přijímat živiny povrchem těla (tegument)³³⁻³⁵. Naproti tomu tasemnice nemají vyvinutou trávicí soustavu, a jsou plně adaptovány na příjem živin pouze přes tegument. Současně s živinami jsou zřejmě do těla tasemnic vstřebávány některé trávicí enzymy (vč. serinových proteas) hostitele^{33, 36}. Dospělé tasemnice se usazují v tenkém střevě bohatém na živiny a s pomocí nejrůznějších transportérů či prostou difúzí, je absorbují. Přestože tasemnice spoléhají hlavně na trávicí enzymy přítomné v gastrointestinálním traktu hostitele, uvolňují přes tegument do prostředí i vlastní trávicí enzymy včetně proteas, které jim zajišťují snazší a rychlejší příjem energie³⁷.

Role serinových proteas při rozmnožování helmintů

Sexuální reprodukce je nezbytná pro velkou část eukaryot. Během evoluce došlo k vývoji vysoce specializovaných reprodukčních buněk – gamet, kdy samice začaly produkovat menší množství větších vajíček, zatímco samci velké množství malých pohyblivých spermií. Oba typy buněk jsou adaptované ke vzájemnému splynutí, které je následováno vývojem nového organismu³⁸. Tasemnice a naprostá většina motolic jsou hermafrodité, naopak hlísti bývají odděleného pohlaví. Přesto jsou všichni zástupci těchto skupin vázáni na produkci obou typů pohlavních buněk a není překvapením, že je jejich vznik a osud enzymaticky regulován³⁹.

Caenorhabditis elegans (háďátko obecné) je nepatogenní nematod, který slouží jako modelový organismus výzkumníkům nejrůznějších oborů. Byl mj. využit pro studium pohlavních buněk helmintů, protože jeho vývojová stádia zahrnují jak pohlavní rozmnožování dvou jedinců, tak samooplození⁴⁰. Semenná tekutina (sperma), bohatá na proteinové složky, hraje důležitou roli v reprodukci samců, avšak mechanismy zapojené do regulace rozmnožování zůstávají do značné míry neznámé. Bylo prokázáno, že sperma *C. elegans* obsahuje serinovou proteasu TRY-5, která je významná pro aktivaci spermií a zároveň se spekuluje, že načasování aktivace souvisí s přenosem spermatu do dělohy^{41, 42}. Ortologický enzym As-TYR-5 byl identifikován v hojně rozšířené lidské škrkavce *Ascaris suum* společně se specifickým inhibítorem této proteasy, který se pravděpodobně účastní zpětné regulace spermatogeneze⁴³.

Role serinových proteas při invazi helmintů do hostitele a následné migraci v těle hostitele

Některé druhy parazitických červů musí nejprve sami nalézt svého hostitele a aktivně penetrovat do jeho tkání (*Ancylostoma caninum*, *Schistosoma mansoni*). Jiné druhy jsou do hostitele přenášeny pasivně, například spolu s potravou (*Echinococcus granulosus*, *Pragonimus westermani*, *Fasciola hepatica*) nebo přes tzv. vektora (přenašeče), kterým je např. parazitující hmyz (*Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*). Několik studií prokázalo, že se těchto procesů významně účastní různé typy SP.

Příkladem aktivní penetrace jsou larvy schistosom (cerkárie) infikující člověka. Larvy musí nejprve nalézt svého hostitele (na základě chemických signálů, termo- a/nebo fototaxe) a po přichycení na jeho pokožku začnou sekretovat obsah z tzv. acetabulárních žláz, který obsahuje značné množství serinové proteasy, cercariální elastasy (SmCE)^{44, 45}. Cercárie pomocí SmCE degradují elastin v kožní tkáni, čímž si vytvoří vstupní bránu do svého konečného hostitele⁴⁶. Na základě sekvence bylo identifikováno celkem 8 isoform SmCE, z čehož existuje několik ortologních proteinů u příbuzných druhů *Schistosoma haematobium* a *Schistosoma douthitti*⁴⁷.

Po penetraci do hostitele, ať už aktivní či pasivní, musí parazité překonat nejrůznější bariéry, aby docestovali do cílové tkáně, kde se usídlí. K tomu helminti opět využívají proteolytické enzymy včetně SP. Například tasemnice *Spirometra mansoni*, která u člověka způsobuje onemocnění zvané sparganóza, nakazí člověka během příjmu kontaminované potravy. Larva, která se uvolní ve střevě, může migrovat tělem prakticky do jakýchkoliv tkání, ale nejčastěji se usídlí v podkoží. Migraci jim usnadňují dvě trypsinové proteasy schopné štěpit kolagen. Tyto proteiny vykazují silnou protilátkovou odpověď, a proto je možné je využít jako antigeny v serologické diagnóze⁴⁸.

Podobnou strategii využívá intracelulární nematod *Trichinella spiralis*, který je schopný celý životní cyklus dokončit v jednom hostiteli. Dospělci parazitují na epiteliálních buňkách střevní stěny a larvy v koster-

ních svalech. Různá životní stádia *T. spiralis* uvolňují v exkrečně-sekrečních produktech do svého okolí SP, které usnadňují vznik infekce degradací extracelulární matrix^{49, 50}. Jejich exprese je ovlivněna jednak vývojovým stádiem parazita, ale také jeho lokalizací v hostiteli^{51, 52}. Serinová proteasa NBL-1 je typická pouze pro migrující larvy, kterým usnadňuje přesun ze střeva do svalů⁵⁰. Ve svalů larvy kolem sebe vytvářejí cysty tzv. „nurse cells“, ve kterých přežívají mnoho let⁵³. V genomu *T. spiralis* byla dále objevena serinová proteasa Ts23-2, k jejíž expresi dochází výhradně u larev opouzdřených ve svalové tkáni⁵⁴. Životní cyklus *T. spiralis* pokračuje tak, že se svalovina s opouzdřenými larvami dostane do trávicího traktu nového hostitele, kde je natrávena a larvy se z cyst uvolní. Po uvolnění začnou sekretovat peptidasu označovanou TspSP-1, která jim pravděpodobně napomáhá v migraci a usazování v tenkém střevě. Exprese této SP je ukončena u dospělých červů usídlených ve střevě^{54, 55}. Ortolog této proteasy TppSP-1 byl detekován u larvy příbuzného druhu *T. pseudospiralis*, avšak jeho funkce zatím nebyla detailně probádána⁵⁶.

Jiný nematod *Onchocerca volvulus* je druh filárií, které jsou původcem tzv. říční slepoty u přibližně 20 milionů lidí v subtropickém pásmu Afriky a Jižní Ameriky. Samice sídlí v tzv. podkožních nodulech zatímco infekční larvy (mikrofilárie) a samci aktivně migrují tělem hostitele. Dospělí samci migrují z nodulu do nodulu, aby oplodnili samice, zatímco larvy opouštějí noduly a zůstávají v epidermis, aby mohly být přeneseny komárem (*Simulium damnosum*) do dalšího hostitele. Kožní a pojivové tkáně tedy tvoří hlavní bariéru, kterou musí filárie překonávat během migrace. Všechna parazitární stádia proto vylučují spektrum serinových proteas, které jsou schopné degradovat kolagen (typ IV), fibronektin, laminin, elastin a další složky extracelulární matrix⁵⁷. Detailní popis jednotlivých enzymů však stále chybí. Obdobně využívají serinové proteasy při tělní migraci i larvy nematoda *Toxocara canis*^{58, 59}.

Nematod *Trichuris muris* svými enzymy narušuje epitel tlustého střeva a cíleně ho přetváří v tzv. syncytiom (soubuní vzniklé splynutím samostatných buněk), do kterého se dospělci svou tenkou přední částí zanořují a fixují. V exkrečně-sekrečních produktech dospělých jedinců *T. muris* byly identifikovány dvě aktivní formy SP (85 a 105 kDa), které se podílejí na vzniku syncytiálního prostředí³¹ a jedna SP chymotrypsinového typu, která depolymerizuje mucin Muc2 chránící střevní sliznici. Předpokládá se proto, že výše popsané SP hrají velmi důležitou roli během usazování parazita ve střevě a také usnadňují párování a snášení vajíček⁶⁰. Transkripty ortologních genů pro enzymy štěpící muciny byly detekovány u příbuzných druhů *Trichuris trichiura* a *Trichuris suis*. Byla u nich prokázána nejen schopnost degradovat Muc2, ale spekuluje se o možných imunomodulativních účincích^{61, 62}.

Role serinových proteas v interakci parazit-hostitel

Ovlivňování hostitelského imunitního systému

Endogenní parazité (přežívající uvnitř těla hostitele) jsou vystaveni přímému kontaktu s imunitním systé-

mem hostitele. V průběhu evoluce si na molekulární úrovni vyvinuli nejrůznější unikové strategie, aby se vyhnuli jeho účinkům a přežili tak v nepřátelském prostředí^{9, 63}. Často širokospektrá modulace hostitelské imunity může mít za následek zvýšenou náchylnost k infekci nebo rozvoji nádorových onemocnění v důsledku imunosuprese. Na druhou stranu může parazitární infekce vést ke snížení alergických, autoimunitních nebo zánětlivých reakcí⁶⁴. Velmi důležitou složkou imunitního systému hostitele je tzv. komplement, který je součástí nespecifické humorální imunitní odpovědi a je zapojen do boje proti parazitům.

Doposud bylo podrobně popsáno jen několik SP zapojených do obranných mechanismů parazitů. Velmi často se účastní degradace některých typů imunoglobulinů, cytokinů a složek komplementu. Například migrující larvy (cerkárie, schistosomula) lidských schistosom dokáží pomocí SP degradovat imunoglobulin E, který je zodpovědný za imunitní reakci proti helmintům⁶⁵. Nemaý proteolytický arzenál včetně SP využívá *S. mansoni* k degradaci různých složek komplementu (C3, C4, faktor B, komplement faktor H, clusterin a další). Mechanismus a enzymy zapojené do degradace komplementu jsou však stále otázkou budoucího výzkumu⁶⁶.

V extraktu larvy tasemnice *Sp. mansoni* byla identifikována SP chymotrypsinového typu (36 kDa), která odbourává lidský imunostimulační interferon γ (IFN- γ)⁴⁸. Enzym vykazující obdobné funkční vlastnosti byl nalezen v extraktu některých druhů motolic a nematodů^{44, 67}. Infekční larvy nematoda *T. canis* mají zase povrch tvořený hustou sítí glykoproteinů⁶⁸, jejíž součástí tvoří silně glykosylované SP schopné degradovat krevní složky jako albumin nebo imunoglobulin C⁵⁸.

Exkrečně-sekreční produkty mikrofilárií *Brugia malayi* zvyšují svou toleranci k imunitnímu systému tím, že štěpí složku komplementu C5a. Degradace C5a neprobíhá v přítomnosti inhibitorů SP, což naznačuje, že mikrofilárie uvolňují do svého okolí jednu nebo více SP, které brání eliminaci mikrofilárie v hostiteli⁶⁹.

Ovlivňování hostitelských fyziologických funkcí

Parazité jsou schopni molekulami sekretovanými do prostředí nebo lokalizovanými na svém povrchu úzce interagovat s hostitelem a ovlivňovat jeho fyziologické funkce ve svůj prospěch. Například krevní motolice *S. mansoni* mohou přežívat v mezenterických a portálních cévách člověka až desítky let^{70, 71}. Bylo popsáno mnoho zajímavých interakcí parazit-hostitel, ve kterých hrají důležitou roli nejrůznější enzymy včetně SP.

Z homogenátu dospělců *S. mansoni* byla purifikována serinová proteasa nazvaná sK1 s kalikreinovou aktivitou⁷². Tato proteasa vyštěpuje v krevním řečišti z kininogenu vasodilatační peptid bradykinin snižující arteriální tlak hostitele^{72, 73}.

Serinová proteasa s fibrinolytickou aktivitou (27 kDa) byla nalezena v extraktu vajec schistosom⁷⁴. Na jejich povrch snadno adherují krevní destičky, které vejce mechanicky maskují před hostitelovým imunitním systémem a také usnadňují přechod vajec přes cévní stěnu do střeva, díky čemuž může parazit pokračovat ve svém životním cyklu⁷⁵. Tento mechanismus je však zároveň

nebezpečný, protože mohou vznikat tromby fatální pro hostitele. Proto vejce zároveň produkují fibrinolytické enzymy jako SP (27 kDa), které agregované destičky částečně rozvolňují^{74, 75}.

Další charakterizovanou SP schistosom je SmSP1. (*Schistosoma mansoni* serine protease 1), která je vysoce exprimovaná u vajec a v nižší míře u dospělých červů. U dospělých červů byla SmSP1 detekována v povrchových tuberkulech (v tegmentu) samců a exkrečně-sekrečních produktech dospělců a vajec⁷⁶. Předpokládá se, že SmSP1 představuje jeden z antikoagulačních a vazodilatačních faktorů modulujících krevní hemostázu během infekce krevničkou⁷³. SmSP1 je složena ze tří domén: katalytická doména, CUB doména (Complement-Uegf-BMP-1) a LDL doména (LDL-binding receptor domain class A). Díky své doménové organizaci a fylogenetické analýze je SmSP1 je podobná matriptasám¹⁸.

V genomu motolice *S. mansoni* byly nalezeny další 4 geny kódující SP homologické s SmSP1 (nazvané SmSP2-SP5). Z těchto SP je nejvíce charakterizovaná SmSP2, která je přítomná v homogenátu i v exkrečně-sekrečních produktech stádií infikujících člověka (schistosomula, dospělec, vejce). Rekombinantní SmSP2 specificky fragmentuje bioaktivní peptidy a proteiny podílející se na regulaci cévního tonu a na fibrinolýze (2018, Leontovych A. et al. Přijato PLOS NTD). Ortology SmSP2 (nazývané mastiny) jiných schistosom napadajících člověka (*S. haematobium* a *S. japonicum*) byly identifikovány jako antigeny, se kterými interagují imunoglobuliny G pacientů se získanou rezistencí na léčivo praziquantel⁷⁷.

Larvy tasemnic *Echinococcus granulosus* a *Taenia solium* sekretují ortology SmSP2 označované antigen 5 (Ag5 a TsAg5). I když jejich funkce zůstává neobjasněná, využívají se v současné době jako spolehlivé diagnostické nástroje v sérologii⁷⁸⁻⁸⁰.

S. mansoni prolyl oligopeptidasu (SmPOP) je 80 kDa enzym lokalizovaný v tegmentu dospělých schistosom. SmPOP štěpí bioaktivní peptidy hostitelské krve, které se podílejí na vazoregulaci, jako je angiotenzin I a bradykinin⁸¹. Angiotenzin I, který je vazokonstrikčním hormonem produkovaný renin-angiotenzinovým systémem (hlavním fyziologickým regulátorem krevního tlaku), je konvertován SmPOP na vasodilatační angiotenzin-(1-7), který inhibuje proliferaci buněk, angiogenezi, fibrózu a záněť⁸². Proteolytické štěpení SmPOP dále inaktivuje bradykinin, vazodilatační hormon generovaný systémem kalikrein-kinin, který se také podílí na regulaci⁸¹.

Jinou částečně prostudovanou SP hojně rozšířeného hematofágního nematoda *Ancylostoma caninum* je SP (36 kDa) detekovaná v exkrečně-sekrečních produktech infekčních larev L3. Tato SP velmi efektivně degraduje fibrinogen na menší polypeptidy, čímž brání koagulaci krve⁸³. Účinek fibrinolýzy je navíc umocněn tím, že tato SP (36 kDa) zároveň umožňuje přeměnu plasminogenu na tzv. mini-plasmin. Ten štěpí fibrin a navíc je rezistentní k běžným inhibitorům plasminu, čímž se jeho antikoagulační účinky zesilují. Díky tomuto enzymu *A. caninum* elegantně řeší problém s krevní koagulací a ulehčuje si příjem potravy.

Závěr

Parazitičtí helminti v současné době infikují zhruba miliardu lidí po celém světě⁸. Onemocnění bývají poměrně často komplikována tzv. koinfekcí, kdy je člověk nakažen současně dvěma či více druhy parazitů⁹. Během infekce se parazité přizpůsobují podmínkám, ve kterých žijí a zároveň ovlivňují okolí ve svůj prospěch. V tom jim napomáhají nejrůznější proteasy, které helminti využívají jako nástroje pro snazší rozvoj infekce. Tyto enzymy jsou zapojeny do všech podstatných mechanismů umožňujících přežití parazita jako trávení, reprodukce, napadení hostitele, ovlivnění jeho fyziologických funkcí a imunitní odpovědi^{24, 84}. Specifická léčiva nebo vakcíny, které by cílily na proteasy nezbytné pro tyto mechanismy, by poskytnuly efektivní prostředek pro boj s těmito parazity.

Tento článek shrnuje dosavadní poznatky o SP parazitických červů infikujících člověka. Do dnešní doby se výzkumu SP parazitických červů nevěnovala přílišná pozornost, ačkoliv u většiny eukaryotických organismů hrají podstatnou úlohu. Přes omezené množství informací, které jsou o roli SP u helmintů známy, se ukazuje, že nejsou důležité pouze pro endogenní metabolické procesy helmintů, ale že jsou také aktivně zahrnuté do molekulárních interakcí s hostitelem. V uplynulém

Literatura

1. Neurath H: *J Cell Biochem* 32(1), 35 (1986).
2. Neurath H: *Journal of Cellular Biochemistry* 32(1), 35 (1986).
3. Antalis TM, Bugge TH, et al.: *Prog Mol Biol Transl Sci* 99(1 (2011).
4. Patel S: *Allergol Immunopathol (Madr)* (2017).
5. Wakelin D (1996). *Medical Microbiology*, edited by th & S. Baron. Galveston (TX).
6. Colley DG, Bustinduy AL, et al.: *Lancet* 383(9936), 2253 (2014).
7. Kelley JM, Elliott TP, et al.: *Trends Parasitol* 32(6), 458 (2016).
8. Lustigman S, Prichard RK, et al.: *PLoS Negl Trop Dis* 6(4), e1582 (2012).
9. Hotez PJ, Brindley PJ, et al.: *J Clin Invest* 118(4), 1311 (2008).
10. Dzik JM: *Acta Biochim Pol* 53(1), 33 (2006).
11. Figueiredo BC, Ricci ND, et al.: *Front Immunol* 6(22 (2015).
12. Cuesta-Astroz Y, Oliveira FS, et al.: *Int J Parasitol* 47(9), 529 (2017).
13. Cai P, Gobert GN, et al.: *Int J Parasitol* 46(7), 453 (2016).
14. Knox D: *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms* 712(155 (2011).
15. Mckerrow JH, Caffrey C, et al.: *Annu Rev Pathol* 1(497 (2006).
16. Page AP, Stepek G, et al.: *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 4(2), 133 (2014).
17. Yang Y, Wen YJ, et al.: *Korean J Parasitol* 53(1), 1 (2015).
18. Horn M, Fajtova P, et al.: *PLoS Negl Trop Dis* 8(3), e2766 (2014).

desetiletí rapidně pokročila technologie sekvenování nukleových kyselin a došlo k rozvoji bioinformatických metod, což umožnilo analyzovat nebývalý počet genomů helmintů⁸⁵. Kromě toho došlo k intenzivnímu zapojení metody RNAseq (whole transcriptome shotgun sequencing) pomocí níž lze určit kvantitu a lokalizaci genových transkriptů v čase⁸⁶. Kombinací dat z celogenomového sekvenování a RNAseq bylo možné identifikovat celou řadu nových proteas (vč. SP) a míru jejich exprese napříč životními stádii parazitických červů⁸⁷⁻⁸⁹. Tím se také usnadnilo mezidruhové porovnávání, kdy se ukázalo, že mnohé geny pro SP jsou mezidruhové konzervované⁸⁴. Toto zjištění může být podstatné pro vývoj širokospektrých léčiv, kdy je možné zničit více druhů parazitů podáním jednoho typu léčiva. V současné době stále není mnoho informací o funkci a významu jednotlivých typech SP helmintů dostupných, ale je zřejmé, že tvoří velmi slibné terapeutické cíle pro vývoj léků, vakcín, profylaxe nebo diagnostických markerů.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu InterBioMed LO1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

19. Dvorak J, Fajtova P, et al.: *Biochimie* 122(99 (2016).
20. Robinson MW, Dalton JP, et al.: *Trends Biochem Sci* 33(12), 601 (2008).
21. Delcroix M, Sajid M, et al.: *J Biol Chem* 281(51), 39316 (2006).
22. Goupil LS, Ivry SL, et al.: *PLoS Negl Trop Dis* 10(8), e0004893 (2016).
23. Li S, Chung YB, et al.: *Parasitol Res* 93(1), 36 (2004).
24. Sajid M and Mckerrow JH: *Mol Biochem Parasit* 120(1), 1 (2002).
25. Williamson AL, Brindley PJ, et al.: *Trends Parasitol* 19(9), 417 (2003).
26. Caffrey CR, Mckerrow JH, et al.: *Trends Parasitol* 20(5), 241 (2004).
27. Brown A, Burleigh JM, et al.: *Parasitology* 110 (Pt 5) (555 (1995).
28. Bogitsh BJ and Dresden MH: *J Parasitol* 69(1), 106 (1983).
29. Hall SL, Braschi S, et al.: *Mol Biochem Parasit* 179(1), 18 (2011).
30. Trap C, Fu B, et al.: *Parasitol Res* 98(4), 288 (2006).
31. Drake LJ, Bianco AE, et al.: *Parasitology* 109 (Pt 5) (623 (1994).
32. Carmona C, Mcgonigle S, et al.: *Parasitology* 109 (Pt 1)(113 (1994).
33. Dalton JP, Skelly P, et al.: *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 82(2), 211 (2004).
34. Halton DW: *International Journal for Parasitology* 27(6), 693 (1997).
35. Izvekova GI and Frolova TV: *Biology Bulletin Reviews* 7(2), 150 (2017).
36. Izvekova GI, Kuperman BI, et al.: *Comp Biochem Physiol A Physiol* 118(4), 1165 (1997).
37. Izvekova GI and Komova AV: *Biology Bulletin* 32(2), 167 (2005).

38. Lesch BJ and Page DC: *Nat Rev Genet* 13(11), 781 (2012).
39. Ellis RE and Stanfield GM: *Semin Cell Dev Biol* 29(17 (2014).
40. L'hernault SW: *WormBook* 1 (2006).
41. Smith JR and Stanfield GM: *PLoS Genet* 7(11), e1002375 (2011).
42. Shakes DC: *PLoS Genet* 7(11), e1002392 (2011).
43. Zhao Y, Sun W, et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(5), 1542 (2012).
44. Mckerrow JH, Pino-Heiss S, et al.: *J Biol Chem* 260(6), 3703 (1985).
45. Mckerrow JH and Salter J: *Trends Parasitol* 18(5), 193 (2002).
46. Dvorak J, Mashiyama ST, et al.: *Biochimie* 90(2), 345 (2008).
47. Young ND, Jex AR, et al.: *Nat Genet* 44(2), 221 (2012).
48. Kong Y, Chung YB, et al.: *Parasitology* 108 (Pt 3) (359 (1994).
49. Todorova VK and Stoyanov DI: *Parasitol Res* 86(8), 684 (2000).
50. Yang Y, Lacour SA, et al.: *Parasitology* 142(6), 783 (2015).
51. Ros-Moreno RM, Vazquez-Lopez C, et al.: *Folia Parasitol (Praha)* 47(1), 49 (2000).
52. Robinson MW and Connolly B: *Proteomics* 5(17), 4525 (2005).
53. Gottstein B, Pozio E, et al.: *Clin Microbiol Rev* 22(1), 127 (2009).
54. Nagano I, Wu Z, et al.: *J Parasitol* 89(1), 92 (2003).
55. Wang B, Wang ZQ, et al.: *Exp Parasitol* 134(2), 148 (2013).
56. Cwiklinski K, Meskill D, et al.: *Vet Parasitol* 159(3-4), 268 (2009).
57. Haffner A, Guilavogui AZ, et al.: *Exp Parasitol* 90(1), 26 (1998).
58. Gonzalez-Paez GE, Alba-Hurtado F, et al.: *Biomed Res Int* 2014(418708 (2014).
59. Robertson BD, Bianco AT, et al.: *Exp Parasitol* 69(1), 30 (1989).
60. Hasnain SZ, McGuckin MA, et al.: *PLoS Negl Trop Dis* 6(10), e1856 (2012).
61. Foth BJ, Tsai IJ, et al.: *Nature Genetics* 46(7), 693 (2014).
62. Jex AR, Nejsun P, et al.: *Nature Genetics* 46(7), 701 (2014).
63. Macdonald AS, Araujo MI, et al.: *Infect Immun* 70(2), 427 (2002).
64. Maizels RM and Mcorley HJ: *J Allergy Clin Immunol* 138(3), 666 (2016).

Souhrn

Ulrychová L.: Serinové proteasy helmintů napadajících člověka

Trematoda, cestoda a nematoda jsou parazitičtí helminti, kteří způsobují vážná onemocnění lidí na celém světě a jsou také odpovědní za devastaci chovů hospodářských zvířat. Je alarmující, že se každým rokem eviduje stoupající rezistence na současná farmaka a na některá onemocnění dokonce neexistuje léčba. Proto jsou enzymy helmintů intenzivně zkoumány jako potenciální cíle pro vývoj léků a vakcín. Proteasy jsou slibnými kandidáty, protože mají důležitou roli v přežívání parazita v hostiteli: umožňují invazi, výživu, rozmnožování parazita, ovlivňují imunitním systém hostitele a modulují jeho fyziologii. Serinové proteasy helmintů ve srovnání s jinými skupinami enzymů nebyly dosud detailně studovány. Ačkoliv byly identifikovány v genomech různých druhů helmintů ve významném množství, jejich biologické role a biochemické funkce zůstávají do značné míry neznámé. Nicméně, rostoucí množství genomických a proteomických studií ukazují, že tato třída proteas hraje podstatnou roli v interakcích mezi hostitelem a parazitem a v jeho přežívání. Tato práce shrnuje veškeré dostupné poznatky o serinových proteasach parazitických helminthů infekčních pro člověka.

Klíčová slova: proteolytický enzym; serinová proteasa; parazit; helmint, terapie

65. Pleass RJ, Kusel JR, et al.: *Int Arch Allergy Immunol* 121(3), 194 (2000).
66. Da'dara AA, Siddons G, et al.: *Molecular and Biochemical Parasitology* 215(40 (2017).
67. Sakanari JA, Staunton CE, et al.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(13), 4863 (1989).
68. Gems D and Maizels RM: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(4), 1665 (1996).
69. Rees-Roberts D, Mullen LM, et al.: *Int J Parasitol* 40(5), 527 (2010).
70. Hall SC and Kehoe EL: *Calif Med* 113(2), 75 (1970).
71. Gryseels B, Polman K, et al.: *Lancet* 368(9541), 1106 (2006).
72. Carvalho WS, Lopes CT, et al.: *Parasitology* 117 (Pt 4)(311 (1998).
73. Da'dara A and Skelly PJ: *Blood Rev* 25(4), 175 (2011).
74. Doenhoff MJ, Stanley RG, et al.: *Parasitology* 126(231 (2003).
75. Ngaiza JR and Doenhoff MJ: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 193(1), 73 (1990).
76. Cocude C, Pierrot C, et al.: *Parasitology* 118 (Pt 4) (389 (1999).
77. Pearson MS, Becker L, et al.: *Front Immunol* 6(213 (2015).
78. Lorenzo C, Salinas G, et al.: *Biochem J* 369(Pt 1), 191 (2003).
79. Rueda A, Sifuentes C, et al.: *Mol Biochem Parasitol* 180(2), 115 (2011).
80. Li Y, Xu H, et al.: *Parasitol Res* 110(6), 2315 (2012).
81. Fajtova P, Stefanic S, et al.: *PLoS Negl Trop Dis* 9(6), e0003827 (2015).
82. Gallagher PE, Arter AL, et al. (2013). *Handbook of Biologically Active Peptides*, edited by A. J. Katin, pp. 494.
83. Hotez PJ and Cerami A: *J Exp Med* 157(5), 1594 (1983).
84. Yang Y, Wen Y, et al.: *Korean J Parasitol* 53(1), 1 (2015).
85. Zarowiecki M and Berriman M: *Parasitology* 142(S85 (2015).
86. Wang Z, Gerstein M, et al.: *Nature Reviews Genetics* 10(1), 57 (2009).
87. Stoltzfus JD, Pilgrim AA, et al.: *Mol Biochem Parasitol* 215(11 (2017).
88. Robinson MW, Menon R, et al.: *Mol Cell Proteomics* 8(8), 1891 (2009).
89. Wang S and Hu W: *Front Microbiol* 5(313 (2014).

Summary
Ulrychová L.: Serine proteases of human helminths

Trematodes, cestodes and nematodes are parasitic helminths causing serious human diseases worldwide and are also responsible for livestock devastation. Due to rising evidence of resistance to current pharmaceutical therapy, helminth-derived proteins are being extensively studied as potential drug and vaccine targets. Among them, proteases are promising candidates as they operate the host–parasite interface, where they may facilitate parasite invasion, nutrition intake, fertilization, host-immune system evasion, and modulate host physiology. Surprisingly, serine proteases of helminths, in comparison to other groups of proteases, are largely neglected. Serine proteases have been identified in helminth genomes in significant abundance but their biological roles and biochemical functions are poorly understood. However, increasing volumes of genomic and proteomic studies indicate that this class of proteases plays substantial roles in host-parasite interactions and in parasite survival. Here, we discuss serine proteases of parasitic helminth and their known or hypothetical functions.

Keywords: proteolytic enzyme; serine protease; parasite; helminth, therapy

MITOCHONDRIÁLNÍ TOXICITA INDUKOVANÁ LÉČIVY

Lenka Barchánková, Helena Mertlíková-Kaiserová, Miroslav Hájek
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.; lenka.pohlova@uochb.cas.cz

Úvod

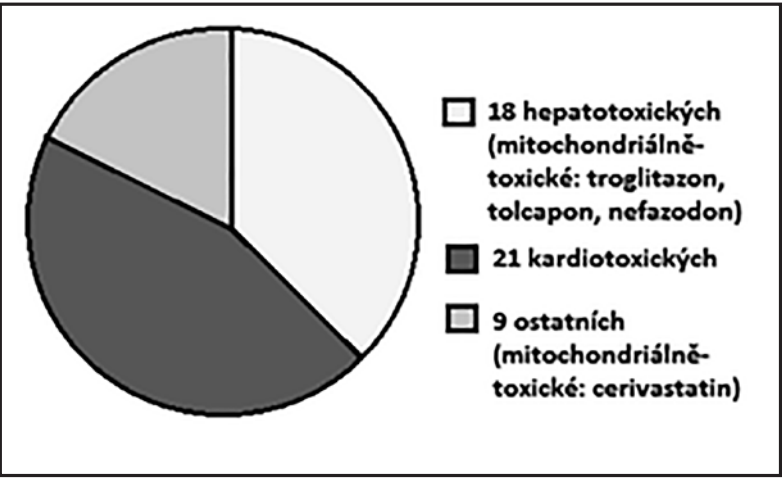
Původně primitivní aerobní alfa-proteobakterie byly integrovány do našich jednobuněčných glykolytických předků, aby daly vznik semiautonomním organelám produkujícím energii – mitochondriím¹.

Mitochondrie jsou známy především jako buněčné „elektrárny“ produkující přibližně 95 % buněčného ATP. Jejich počet v jednotlivých typech buněk koreluje s mírou buněčné a tkáňové metabolické aktivity. Jejich význam však není pouze energetický. Tyto funkčně mnohostranné orgány hrají důležitou roli v mnoha buněčných procesech jako je oxidace mastných kyselin, syntéza steroidů, termogeneze, homeostáza vápníku, programovaná buněčná smrt a další².

S vývojem nových metod, které umožňují studium mitochondriálních funkcí, je stále více zřejmé, že schopnost některých léčiv interferovat s fyziologickými mitochondriálními procesy je příčinou jejich následné toxicity³. Léčiva indukovaná mitochondriální dysfunkce mohou být důsledkem zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), změn v permeabilitě vnitřní mitochondriální membrány, narušení elektronového transportního řetězce (ETC) či syntézy ATP, poškození mitochondriální DNA (mtDNA) nebo inhibice β-oxidace mastných kyselin. Negativní účinky léčiv na mitochondrie se v první řadě projeví v energeticky aktivních tkáních vyžadujících velké množství ATP (játra, srdce, ledviny, mozek) a mohou mít různé klinické projevy v podobě hepatotoxicity, nefrotoxicity, kardiotoxicity, a jiných negativních účinků⁴.

Mezi lety 1990 a 2007 bylo americkým regulačním úřadem Food and Drug Administration (FDA) z trhu staženo 48 léčiv především z důvodu jejich hepatotoxických a kardiotoxických nežádoucích účinků (Obr. 1).

U čtyř léčiv z tohoto souboru byla příčinou nežádoucích účinků a následného vyřazení z prodeje mitochondriální toxicita³. Kromě vyřazení z prodeje je mnoho léčiv z důvodů závažných vedlejších účinků, jejichž podstatou je ovlivnění mitochondriálních funkcí, označeno tzv. „black box warning“. Jedná se o nej přísnější varování agentury FDA o existenci jasných důkazů, že dané léčivo může mít za určitých podmínek nebezpečné nežádoucí účinky⁵ (Tab. I).



Obr. 1: Povaha nežádoucích účinků 48 léčiv vyřazených z prodeje³ (upraveno).

Další data ukazují, že z důvodů nežádoucích účinků léčiv ročně zemře v USA a Evropě více než 100 000 lidí⁶. Ačkoliv se na vedlejších účincích léčiv podílejí různé mechanismy, je zřejmé, že mitochondrie a jejich dysfunkce hrají v této oblasti důležitou roli⁴. Z těchto důvodů je nanejvýš potřebné odhalit případnou mitochondriální toxicitu potenciálních léčiv v co nejčasnějších fázích preklinického výzkumu a optimalizovat strukturu aktivní látky s cílem minimalizovat její toxicitu.

Tab. I: Mitochondriálně toxické nežádoucí účinky vybraných léčiv, jejich klinické projevy a informace o existenci varování vydaného agenturou FDA.

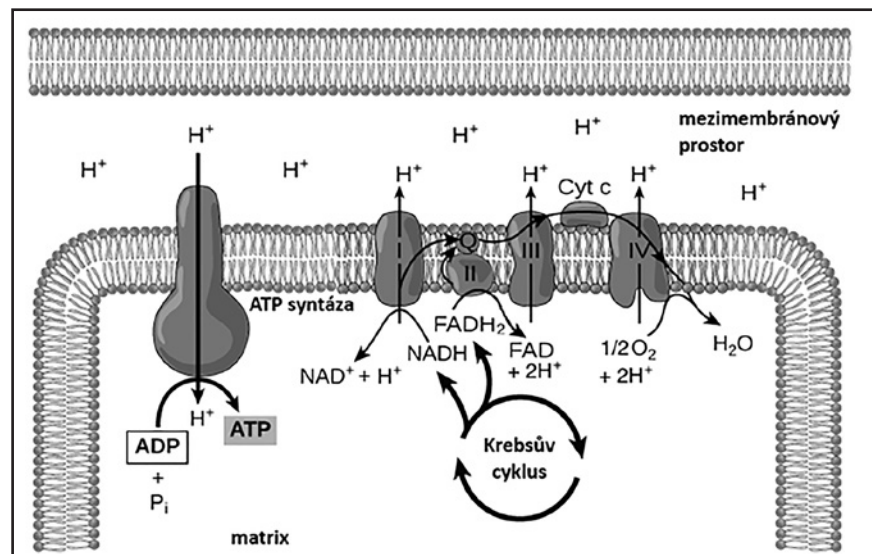
Skupina léčiv	Mitochondriální dysfunkce	Klinický projev	Black box warning
Analgetika • nimesulid	rozpřažení OXPHOS ^{3,4}	hepatotoxicita ⁸ , kardiotoxicita ⁹	ne
• indometacin	rozpřažení OXPHOS ^{3,4}	kardiotoxicita ⁹ , gastrointestinální toxicita ¹⁰	ano ¹¹
• diklofenak	rozpřažení OXPHOS ^{3,4} , otevření mitochondriálního tranzitního póru ^{12,13}	hepatotoxicita ¹⁴	ano ¹⁵
• acetaminofen (paracetamol)	zvýšená produkce ROS, inhibice ETC metabolitem ¹⁶ , inhibice β-oxidace ¹⁷	hepatotoxicita ^{16,18}	ano ¹⁹
• ibuprofen	inhibice β-oxidace ^{17,20}	hepatotoxicita, kardiotoxicita ²⁰	ne
Antibiotika • chloramfenikol	inhibice mitochondriální proteosyntézy, vyčerpání rinitiny feu v mitochondriích ²¹	aplastická anemie ²¹	ano ²²
• linezolid	inhibice mitochondriální proteosyntézy ²¹	laktátová acidóza ²¹	ne
Antipsychotika • chlorpromazin	inhibice ETC (komplex I) ²³ , zvýšená produkce ROS ²⁴	tardivní dyskineze ²³ , fototoxicita ²⁴	ano ²⁵
Antidepresiva • nefazodon	inhibice ETC (komplex I) ²⁶	hepatotoxicita ²⁶	stažen z prodeje ²⁷
Antiepileptika • valproová kyselina	zvýšená produkce ROS ²⁸ , inhibice β-oxidace ¹⁷	hepatotoxicita ^{17,28}	ano ²⁹
Antidiabetika • metformin	inhibice ETC (komplex I) ³⁰	laktátová acidóza ³⁰	ano ³¹
• troglitazon	inhibice ETC (komplex I) ³⁰ , otevření mitochondriálního tranzitního póru ³²	hepatotoxicita ³²	stažen z prodeje ³³
Protinádorová léčiva • doxorubicin	zvýšená produkce ROS (redoxní cyklus) ³⁴	kardiotoxicita ³⁴	ano ³⁵
Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptasy • zalcitabin • didanosin • stavudin • tenofovir	inhibice replikace mtDNA ³⁶	periferní neuropatie, kardiomyopatie, hepatotoxicita, laktátová acidóza ³⁶	ne ano ³⁷ ano ³⁸ ano ³⁹

Mechanismy mitochondriálních dysfunkcí indukovaných léčivy

Inhibice elektronového transportního řetězce (ETC) a oxidativní fosforylace (OXPHOS)

Mitochondrie jsou zodpovědné za produkci většiny buněčného ATP. Syntéza ATP je závislá na spřažení dvou procesů probíhajících na vnitřní mitochondriální mem-

bráně – oxidace substrátů vzniklých v Krebsově cyklu (NADH a FADH₂) proteinovými komplexy dýchacího řetězce a fosforylace ADP na ATP za využití energie protonového gradientu mezi vnější a vnitřní membránou. Elektrochemický protonový gradient vzniká v důsledku již zmíněné oxidace substrátů a přenosu elektronů prostřednictvím elektronového transportního řetězce (ETC) na kyslík. (Obr. 2)⁴.



Obr. 2: Schéma oxidativní fosforylace⁴⁰. (upraveno)

OXPHOS je inhibována jak klasickými inhibitory komplexů (rotenon, antimycin A, KCN, CO, oligomycin A), tak tzv. rozpřahovači (FCCP, 2,4-dinitrofenol), které odpojují přenos elektronů od syntézy ATP. Podobně mohou s OXPHOS interferovat i různé typy léčiv. Některá léčiva způsobují zeslabení protonmotivní síly přenosem vodíku z mezimembránového prostoru do matrice (především protonofory, ale jsou známy i neprotonoforní slabší rozpřahovače), jiná permanentním otevřením mitochondriálního tranzitního póru³.

Jako rozpřahovače působí mnoho nesteroidních protizánětlivých léčiv, které fungují především jako protonofory. Výsledkem je snížený membránový potenciál, zvýšená spotřeba kyslíku bez syntézy ATP, energie uvolněná v podobě tepla, vyčerpání ATP a následně poškození buněk a buněčná smrt. Příkladem těchto inhibitorů OXPHOS je diklofenak, indometacin, nimesulid^{3,4}.

Inhibice komplexu I dýchacího řetězce (ETC) je další častou příčinou narušení OXPHOS a byla pozorována u několika skupin léčiv. Antidepressivum nefazonon působí v důsledku inhibice komplexu I hepatotoxicky²⁶. Stejný komplex inhibují antipsychotika chlorpromazin a haloperidol, což má za následek mimovolní pohyby různých svalových skupin²³. Klinickým projevem inhibice komplexu I antidiabetiky fenforminem, buforminem a metforminem je laktátová acidóza³⁰.

Předávkování acetaminofenem (paracetamolem) je v USA jedním z nejčastějších důvodů akutního selhání jater. Paracetamol je metabolizován cytochromem P450 na reaktivní metabolit N-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI), který se kovalentně váže na více různých proteinových komplexů dýchacího řetězce a inhibuje tím jejich funkci. Navíc reaguje se sulfhydrylovou skupinou glutathionu, čímž narušuje antioxidační ochranu v játrech^{2,18}.

Zvýšená produkce ROS

Pojem reaktivní formy kyslíku (ROS) zahrnuje molekuly a volné radikály s jedním nepárovým elektronem odvozené od molekulárního kyslíku. Patří mezi ně superoxidový radikál ($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) a neradikálové oxidanty jako je peroxid vodíku (H_2O_2) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$)^{41,42}.

Endogenní ROS jsou vedlejší produkty normálního mitochondriálního metabolismu, přičemž většina je ve formě $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 produkována reakcemi komplexu I a III během OXPHOS jako nezbytný intermediát oxidační reakce katalyzované kovem^{41,43}. Za normálních okolností je $\cdot\text{O}_2^-$ rychle konvertován superoxid-dismutasou 2 (SOD2) v matrice a superoxid-dismutasou 1 (SOD1) v mezimembránovém prostoru na H_2O_2 . Rozklad H_2O_2 na vodu a kyslík je katalyzován katalasou v peroxizomech a glutathionperoxidasou asociovanou s mitochondriální membránou⁴.

Zatímco malé odchylky od rovnováhy mezi produkcí ROS a antioxidační ochranou mohou mít signalizační

úlohu, nekontrolované narušení této rovnováhy vede k hromadění ROS (oxidační stres), jehož důsledkem je poškození proteinů, lipidů a DNA⁴³.

Mitochondriálně toxická léčiva zvyšují produkci $\cdot\text{O}_2^-$, hlavního prekursoru většiny ROS, prostřednictvím tří hlavních mechanismů: a) inhibicí ETC a následnou kumulací elektronů, které reagují s O_2 za vzniku $\cdot\text{O}_2^-$; b) přenosem elektronu z ETC přenašeče na O_2 (tzv. redoxní cyklus) a c) snížením hladiny glutathionu potřebného k detoxikaci H_2O_2 glutathionperoxidasou^{42,45}.

Doxorubicin je příkladem léčiva působící mechanismem redoxního cyklu. Selektivně odvádí elektrony z komplexu I za tvorby nestabilního semichinonu, který redukuje O_2 na $\cdot\text{O}_2^-$, což vede k oxidačnímu stresu a vyčerpání glutathionu³⁴.

Jedním z klinických projevů toxicity léčiv způsobenou zvýšenou produkcí ROS je kožní fototoxická, popřípadě fotoalergie. Fotochemickou aktivitu vykazují především léčiva obsahující ve své struktuře substituenty chlóru, jehož UV-indukovaná disociace vede ke zvýšené tvorbě ROS. Fotodechlorinace chlorpromazinu generuje $\cdot\text{O}_2^-$ a $^1\text{O}_2$ přenosem elektronů z excitovaného intermediátu na kyslík. Tyto ROS následně interagují s DNA a proteiny. Výsledkem je hyperpigmentovaná a zarudlá kůže. Fototoxicky působí celá řada léčiv (diuretika, nesteroidní protizánětlivá léčiva, antibiotika, antidepressiva a další), mechanismus účinku často zahrnuje produkci ROS, ne však vždy²⁴.

Poškození mitochondriální DNA (mtDNA)

Mitochondrie mají svůj vlastní mitochondriální genom. Lidská mtDNA je dvouvláknová cirkulární molekula s 16569 páry bází, která obsahuje 37 genů kódujících 13 proteinů ETC a 24 nekódujících ribonukleových kyselin (2 rRNA a 22 tRNA). Na rozdíl od nukleární DNA není mtDNA metylována a tvoří nukleoproteinový komplex s histony. Skládá se z těžkého (bohatý na G) a lehkého (bohatý na C) řetězce a je organizována do nukleoidu v komplexu s transkripčním faktorem A (TFAM), který je asociován s vnitřní mitochondriální membránou^{46,47}.

Je známo několik skupin léčiv, které interferují s mtDNA a jejími procesy jako je replikace, transkripce

a syntéza proteinů. Interagují především s mitochondriální DNA polymerasou (nukleosidové inhibitory reverzní transkriptasy), mitochondriální ribozomální RNA (některá antibiotika) a s mitochondriálními topoizomerasami (protinádorová léčiva). Zároveň je mtDNA z důvodů absence histonů, blízkosti ETC a omezených reparačních schopností velmi náchylná k oxidativnímu poškození působením ROS²⁰.

Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptasy (zalcitabin, didanosin, stavudin, tenofovir) po fosforylaci na jejich aktivní formu soutěží s přirozenými nukleotidy a integrují se do mtDNA. Jelikož postrádají 3'-hydroxylovou skupinu, dochází k terminaci replikace. To vede ke snížení počtu kopií mtDNA, tedy i snížené syntéze 13 proteinů ETC, které mtDNA kóduje. Pozorovanými symptomy mitochondriální toxicity způsobené nukleosidovými inhibitory je periferní neuropatie, kardiomyopatie, hepatotoxicita, laktátová acidóza a jiné³⁶.

Z důvodu strukturální podobnosti mezi mitochondriálními a bakteriálními ribozomy existuje několik tříd antibiotik cílených na prokaryotický ribozom, které inhibují zároveň syntézu mitochondriální proteinů. Jedná se o chloramfenikol, tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy, linezolid. Klinické projevy vedlejších účinků těchto antibiotik jsou různé. Chloramfenikol je spojován s aplastickou anémií u geneticky predisponovaných jedinců, aminoglykosidy se koncentrují v endolymfě a perilymfě vnitřního ucha, kde v důsledku vysoké koncentrace působí ototoxicky²¹.

Narušení mitochondriálního metabolismu

V matrice probíhají dvě hlavní mitochondriální metabolické dráhy – Krebsův cyklus a β -oxidace mastných kyselin. Aby mohly mastné kyseliny, vzniklé v cytosolu štěpením triacylglycerolů, podstoupit β -oxidaci, potřebují prostoupit mitochondriální membránou do matrice. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem se do matrice dostávají difúzí přes membránu, mastné kyseliny s dlouhým řetězcem procházejí mitochondriální membránou ve své aktivované formě (acyl-CoA) s pomocí enzymů karnitinpalmitoyltransferas (CPT1, CPT2). Produktem β -oxidace je acetyl-CoA, který vstupuje do Krebsova cyklu. Krebsův cyklus generuje redukované formy koenzymů FADH_2 a NADH , donory elektronů, které jsou reoxidovány v respiračním řetězci⁴.

Inhibice β -oxidace má za následek kumulaci volných mastných kyselin a triacylglycerolů v cytoplazmě v podobě malých vezikul nebo větších vakuol. Kumulace intermediátů může následně narušovat produkci ketonových látek, glukoneogenezi, respiraci, syntézu ATP, membránový potenciál nebo indukovat apoptózu stimulací mitochondriálního tranzitního póru. Typickým klinickým projevem inhibice β -oxidace je steatóza neboli ztučnění jater^{4,48}.

Jsou známy čtyři hlavní mechanismy inhibice β -oxidace léčivy, přičemž stejné léčivo může působit prostřednictvím více mechanismů. Přímá inhibice enzymů β -oxidace byla popsána u několika skupin léčiv jako je ibuprofen (nesteroidní protizánětlivé léčivo), tianepitin (antidepressivum), amiodaron (antiarytmikum), tamoxifen (nesteroidní antiestrogenní léčivo), perhexilin (antianginózní léčivo)^{20,49}. Metabolit kyseliny valpro-

ové, 2,4-dien-valproyl-CoA, rovněž přímo inhibuje enzymy β -oxidace. Zároveň kyselina valproová tvoří estery s CoA a L-karnitinem, čímž snižuje hladiny těchto kofaktorů. Dalším mechanismem inhibice β -oxidace je inhibice nepřímá, narušením ETC. Takto působí například již zmiňovaná léčiva amiodaron nebo perhexilin. Dále může být β -oxidace sekundárně ovlivněna na úrovni mtDNA, protože snížený počet kopií mtDNA úzce souvisí s narušením ETC^{17,49}.

Interakce s mitochondriálním tranzitním pórem (MPTP)

Pro přežití a správnou funkci mitochondrií je stěžejní integrita vnitřní mitochondriální membrány. Léčiva ji mohou narušovat interakcí s lipidovou dvouvrstvou nebo s membránovými transportéry²⁰.

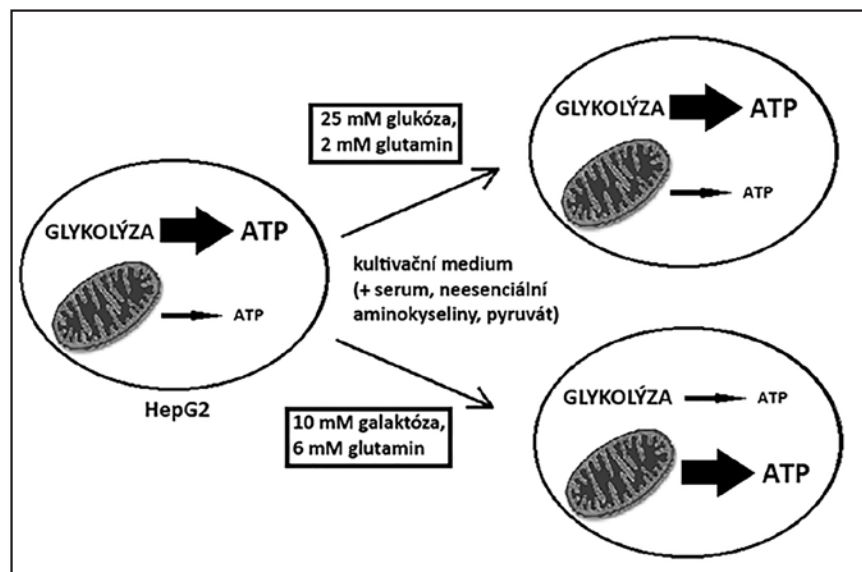
Nejčastějším léčivým atakovaným membránovým transportérem je proteinový komplex mitochondriálního tranzitního póru (MPTP), který protíná vnější i vnitřní mitochondriální membránu a zajišťuje neselektivní řízenou výměnu metabolitů (do velikosti 1,5 kDa) mezi mitochondriemi a cytosolem. Jeho permanentní otevření v důsledku různých událostí (vysoká koncentrace vápníku a/nebo ROS, deplece adeninových nukleotidů, alkalické pH) vede ke ztrátě membránového potenciálu, přerušení OXPHOS a vyrovnání osmotických tlaků mezi matricí a cytosolem, což má za následek bobtnání mitochondrií, prasknutí vnější mitochondriální membrány a vylití obsahu mezimembránového prostoru, včetně proapoptických faktorů, do cytosolu⁵⁰. Permanentní otevření MPTP indukují antidiabetika troglitazon⁵¹ a gemfibrozil⁵², rovněž nesteroidní protizánětlivé léčivo diklofenak, působící mimo jiné jako rozpřahovač OXPHOS¹².

Metody detekce mitochondriálních dysfunkcí

Glukoso-galaktosový test

Snadnou a zároveň cenově dostupnou metodou, která je schopna odhalit akutní mitochondriální toxicitu sloučenin a je hojně využívána již v časných fázích vývoje léčiv, je tzv. glukoso-galaktosový test (GLU/GAL test)⁵³. Principem testu je potlačení tzv. Crabtree efektu, což je schopnost rychle proliferujících buněk generovat ATP prostřednictvím glykolýzy namísto OXPHOS⁵⁴.

Nejčastěji používanou buněčnou linií pro účely tohoto testu jsou buňky HepG2 odvozené od jaterního karcinomu. Ty jsou za standardních kultivačních podmínek (kultivační medium s vysokou hladinou glukosy) relativně rezistentní vůči mitochondriálním toxikantům, protože nezbytné ATP vytvářejí zejména glykolýzou. Jsou-li však kultivační podmínky změněny a glukosa v kultivačním mediu je nahrazena galaktosou, buňky jsou nuceny produkovat ATP prostřednictvím OXPHOS (Obr. 3). Tím se stanou podstatně citlivějšími vůči mitochondriálním toxikantům⁵³. Výstupem testu je srovnání viability buněk vystavených působení testované látky v glukosovém resp. galaktosovém mediu, přičemž se nejčastěji sleduje přímo produkce ATP (luminiscenční stanovení množství ATP v buněčném lyzátu) nebo aktivita mitochondriálních dehydrogenas (XTT test).

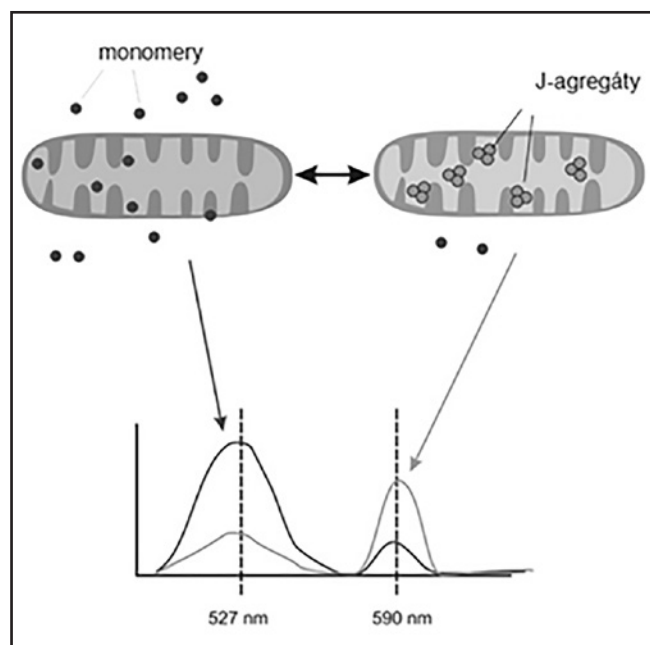


Obr. 3: Schematické znázornění principu Glu/Gal testu s HepG2 buňkami. Vysoká koncentrace glukózy jim umožňuje produkovat ATP přednostně prostřednictvím glykolýzy. Naopak buňky v kultivačním mediu bez glukózy jsou přinuceny využívat mitochondrie k tvorbě energie přepnutím metabolismu na oxidativní fosforylaci.

Hodnocení mitochondriálního membránového potenciálu ($\Delta\psi_m$)

Potvrdí-li se mitochondriální toxicita látky v GLU/GAL testu, je pro odhalení podstaty mitochondriální toxicity nutné přistoupit k dalším metodám zaměřeným na mitochondriální funkce. Logicky navazující hodnocení mitochondriálního potenciálu by mělo být dalším krokem v základním monitorování mitochondriální toxicity léčiv.

Mitochondriální membránový potenciál je generován elektrickým potenciálem napříč vnitřní mitochondriální membránou. Jeho pokles může být indukován léčivou rozptážením OXPHOS, inhibicí ETC, indukci mitochondriálního tranzitního póru nebo narušením dalších buněčných procesů jako je Krebsův cyklus nebo β -oxi-



Obr. 4: Princip fungování fluorescenční sondy JC-1 (upraveno)⁵⁹.

dace mastných kyselin⁵⁵. Monitorování mitochondriálního membránového potenciálu je klíčovým nástrojem k přímému posouzení stavu mitochondrií.

Pro hodnocení změn mitochondriálního potenciálu se nejčastěji používají fluorescenční kationické lipofilní sondy, které jsou schopny pronikat mitochondriální membránou a kumulovat se v mitochondriální matrix až do dosažení elektrochemické rovnováhy popsatelné Nernstovou rovnicí. Kumulace sondy v mitochondriální matrix je spojena s posunem excitačního a emisního fluorescenčního maxima barviva. Míra distribuce lipofilní kationické sondy do matrix je závislá na permeabilizaci mitochondriální membrány a tedy na mitochondriálním potenciálu. Čím víc je membrána polarizována (negativní membránový potenciál), tím více barviva se kumuluje v matrix a naopak^{55,56}.

Fluorescenční sondu lze detekovat průtokovou cytometrií, fluorescenční mikroskopii nebo spektrofotometrem.

Rhodamin 123, chloromethyl-tetramethyl-rosamin (Mito-Tracker OrangeTM), methyl- resp. ethyl ester tetramethylrhodaminu (TMRM, TMRE) nebo 3,3'-di-hexyloxakarbokyanin (DiOC6) jsou příklady těchto sond. Jejich použití však provází několik omezení zahrnující nízkou senzitivitu, cytotoxicitu, specifickou inhibici některé z mitochondriálních funkcí⁵⁷.

Specifičtější a citlivější ke změnám mitochondriálního membránového potenciálu je fluorescenční sonda 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-karbokyanin, známá jako JC-1. Molekuly JC-1 v monomerní formě vykazují difúzní zelenou fluorescenci napříč buňkou. Pokud je mitochondrie v dobré kondici a její membránový potenciál není narušen, kumulují se molekuly JC-1 v mitochondriální matrix za tvorby tzv. J-agregátů emitujících červenou fluorescenci (Obr. 4)⁵⁸. Z důvodu špatné rozpustnosti ve vodě se dnes používají spíše rozpustnější modifikace JC-1 (Mito-MPS, m-MPI)⁵⁵.

Sledování respirační kapacity

Klasickým nástrojem pro zhodnocení stavu respirační kapacity v mitochondriích je polarografické stanovení spotřeby kyslíku v izolovaných mitochondriích, tkáňových homogenátech i buněčných suspenzích⁶⁰. Ačkoliv se jedná o dobře zavedenou, spolehlivou a ověřenou metodu, jejímu plošnému využití brání několik limitujících faktorů, jako jsou časová náročnost, relativní složitost provedení, nutnost specifického vybavení, nepoužitelnost pro tzv. high-throughput screening.

Alternativním způsobem detekce molekulárního kyslíku je použití kyslíkových fluorescenčních sond. Výhody spočívají v nechemických a reverzibilních mechanismech detekce, senzitivě a selektivitě, potenciálu pro miniaturizaci, rychlosti odezvy a možnosti bezkontaktního měření skrze semitransparentní materiály. Pro-

střednictvím kyslíkových sond je možné neinvazivně sledovat celou řadu biologických objektů – živé buňky, tkáně, organismy a lze paralelně monitorovat několik vzorků, což nachází uplatnění mimo jiné i při sledování mitochondriální toxicity léčiv⁶¹.

V současné době se pro přípravu kyslíkových sond používají fluorescenční komplexy Ru(II) a fosforescenční Pt(II)- a Pd(II)-porfyriny. Existují dva základní typy kyslíkových sond: a) v pevném skupenství, které obsahují luminiscenční barvivo zakotvené v polymerním mediu propustném pro kyslík a b) ve vodě rozpustné kyslíkové sondy. Pro analýzu většího množství vzorků paralelně, kinetická a screeningová stanovení jsou využívány ve vodě rozpustné kyslíkové sondy⁶¹.

Dalším snadným, rychlým, účinným a zároveň neinvazivním přístupem hodnocení spotřeby O_2 je technologie Seahorse Extracellular Flux (XF). Pomocí této technologie lze paralelně měřit rychlost spotřeby kyslíku (OCR) a rychlost okyselení extracelulárního prostředí (ECAR), čímž je možné získat informace o stavu dvou hlavních energetických buněčných drah, mitochondriální respiraci a glykolýze, v reálném čase^{62,63}.

Seahorse XF analyzátory využívají k měření senzorové kazety s fluorescenčními senzory v mikrodětičkovém formátu (8, 24, 96 jamek). Optické senzory nejsou v přímém kontaktu se vzorkem, nedochází tak ke kontaminaci vzorků, ovlivnění měření autofluorescencí a není nutné senzory čistit. Uspořádání a automatizace technologie umožňuje postupný přidávek až čtyř látek (např. substrát, inhibitor, léčivo). Vlastní kinetické měření se uskutečňuje v komůrce, která je vytvořena pouze po krátkou dobu měření. Spotřebu kyslíku lze takto měřit na živých buňkách i izolovaných mitochondriích (Obr. 5)^{62,63}. Nevýhodou jsou vyšší pořizovací náklady na analyzátor a příslušný spotřební materiál.

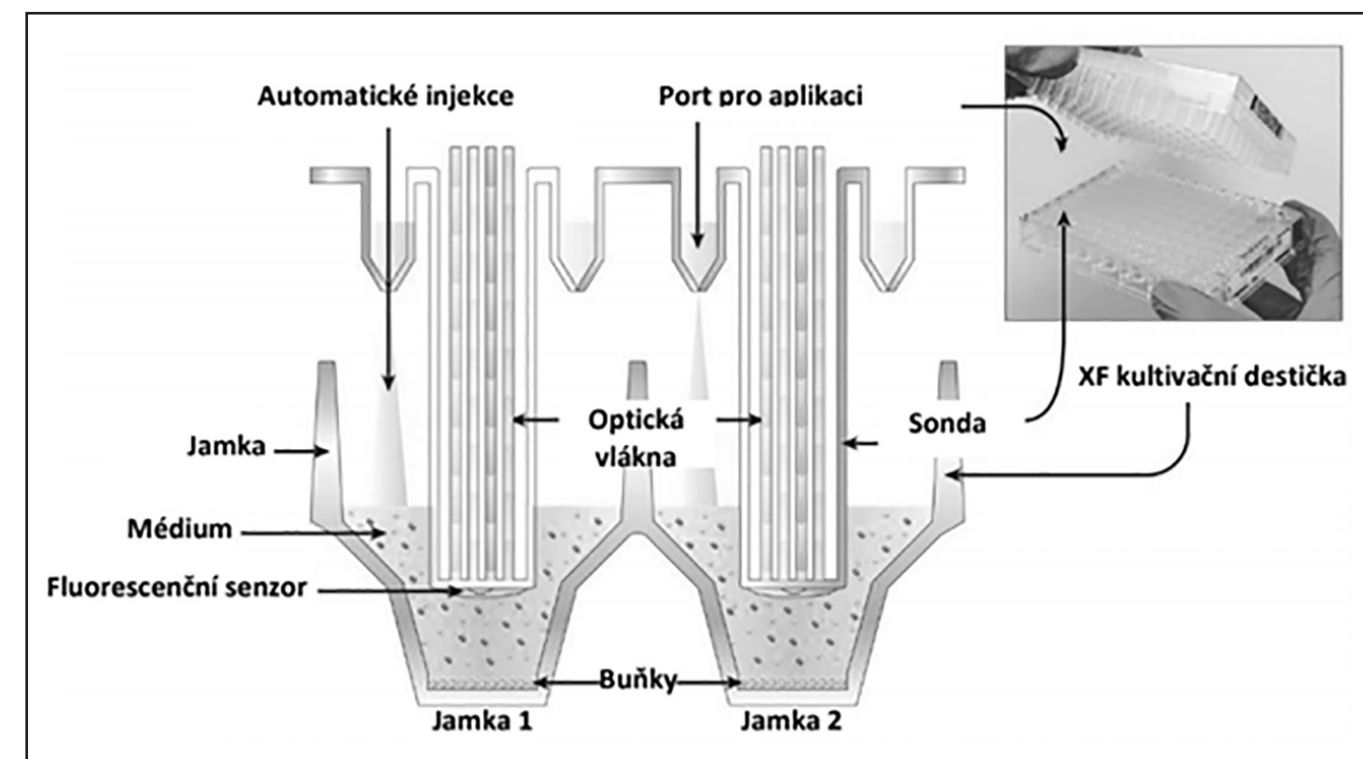
Detekce ROS

Z důvodů své vysoké reaktivity a existence několika buněčných mechanismů účinně eliminujících ROS, existují ROS *in vivo* pouze v pikomolárních nebo nízkých nanomolárních rovnovážných koncentracích. Jejich přímá detekce v biologickém systému proto vyžaduje substráty, které reagují s ROS rychle, konkurují antioxidantům a tvoří stabilní produkt, který může být kvantifikován. Příkladem takové přímé metody je tvorba aduktů kovalentně vázaných radikálů na tzv. spinové pasti detekovaných elektronovou paramagnetickou (spinovou) rezonancí (EPR)⁶⁵. Většina metod pro detekci ROS je proto nepřímých, využívajících fluorescenční a chemiluminiscenční sondy.

Existuje celá řada fluorescenčních sond, které se liší ve své specifitě, chemické povaze, excitačních a emisních maximech a tím i využitelností v různých typech aplikací⁶⁶. Z hlediska detekce mitochondriálních ROS je nejpoužívanější fluorescenční sondou mitochondriálně cílený hydroethidin (Mito-HE, MitoSOX Red[®]), jehož lokalizace do mitochondriální matrix je zajišťována kationickou trifenylylfosfoniovou skupinou (TPP⁺). Je specifický pro detekci $\cdot O_2^-$, se kterým reaguje v dvoukrokové reakci přes hydroethidiový radikál na fluorescenční produkt 2-hydroxyethidium, který je možné detekovat spektrofotometrem, průtokovým cytometrem, fluorescenčním mikroskopem, popřípadě HPLC^{65,67}.

Hodnocení stavu mitochondriální DNA (mtDNA)

Stav mtDNA lze posoudit kvalitativně i kvantitativně. Kvalitativní hodnocení mtDNA se provádí sekvenční analýzou a slouží k odhalení případných mutací. Pro kvantitativní analýzu, tedy odhad počtu kopií mtDNA, se často používá poměr množství mtDNA oproti nukleární DNA (nDNA)⁶⁸. Posouzením mitochondriální biogeneze lze odhalit chronickou mitochondriální toxi-



Obr. 5: Princip měření technologií Seahorse XF64 (upraveno).

citu sloučenin, které v akutních testech mitochondriální toxicity (viz výše) nejevily žádný toxický účinek. To je užitečné zejména pro testování antibiotik a antivirotik⁶⁹.

Pro účely stanovení poměru mtDNA/nDNA se dříve používaly hybridizační techniky (např. Dot Blot, Southern Blot), v současnosti je však v tomto směru nejvíce používanou metodou kvantitativní PCR. Metoda zahrnuje izolaci celkové buněčné DNA a následnou kvantifikaci mitochondriálního a nukleárního genu^{47,70}. Retina Mitox™ DNA assay je komerční kit pro kvantifikaci mtDNA. Jeho principem je přímé měření poměru mtDNA/nDNA, kdy amplifikace a detekce mtDNA a nDNA probíhá v jednom systému při stejných amplifikačních podmínkách (tzv. multiplexing) (Obr. 6). Z tohoto uspořádání vyplývají zjevné výhody v podobě robustnosti, nižšího rizika kontaminace a možnosti využití v tzv. high-throughput screeningu⁶⁸.

Jinou možností zhodnocení stavu mtDNA je kvantifikace exprese proteinů kódovaných mtDNA imunoblotingem⁷¹.

Závěr

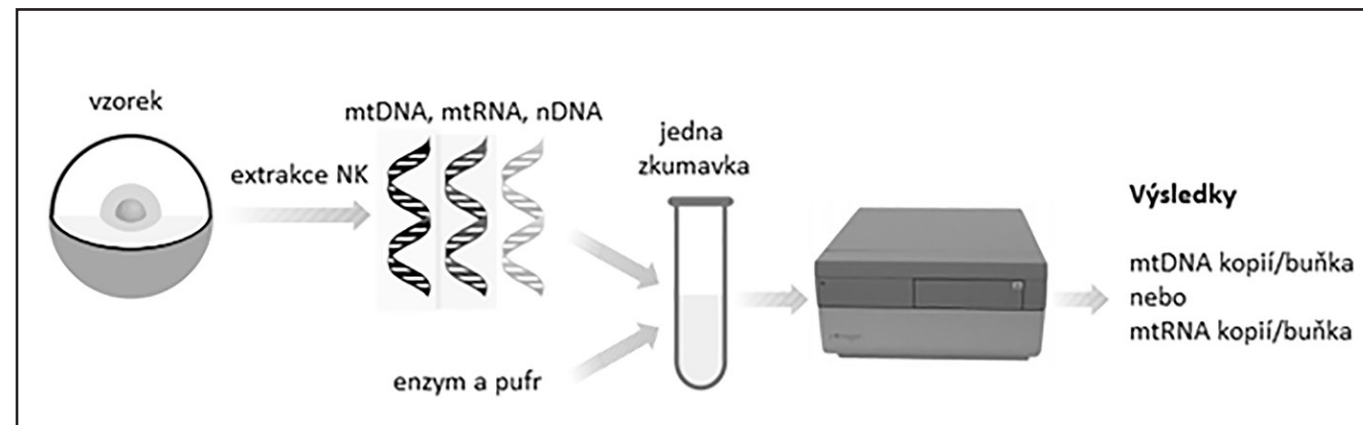
Dostatečná bezpečnost je pro použití v široké lidské populaci vedle průkazu účinnosti nejdůležitější vlast-

ností nově vznikajícího léčiva. Je-li tato bezpečnost zpochybněna v klinických testech (popřípadě i později), nese to s sebou nepříznivé důsledky v podobě ekonomických ztrát a především ohrožení zdraví pacienta. Z těchto důvodů je potřeba odhalit nežádoucí účinky léčiv v co nejranějších fázích preklinického výzkumu.

V mechanismech nežádoucích účinků léčiv jsou často atakovány mitochondrie a jejich funkce, což má za následek celou řadu klinických projevů, především pak v metabolicky aktivních tkáních. Z důvodů mitochondriální toxicity bylo z trhu staženo již několik léčiv. Díky stále se zdokonalujícím metodám lze v dnešní době mitochondriálně toxické účinky odhalit v cílených *in vitro* testech již v časných fázích vývoje, kdy je ještě snadné strukturu potenciálního léčiva modifikovat tak, aby byly zjištěné nežádoucí účinky léčiva na mitochondrie eliminovány či alespoň výrazně potlačeny.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu InterBioMed LO1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.



Obr. 6: Postup stanovení poměru mtDNA/nDNA za použití komerční metody Retina Mitox™ DNA assay⁷² (upraveno).

Literatura

1. Esposti MD et al.: *PLoS One* 9, e96566 (2014).
2. Wojtczak I, Zablocki K (2008): Basic mitochondrial physiology in cell viability and death. In: *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*. (Dykens J.A., Will Y. ed.), Wiley, New York, 1-35.
3. Nadanaciva S., Will Y. (2009): Current concepts in drug-induced mitochondrial toxicity. In: *Current Protocols in Toxicology* 40. Wiley, New York, 1-9.
4. Vuda M, Kamath A: *Mitochondrion* 31, 63 (2016).
5. <https://www.fda.gov/downloads/forconsumers/consumerupdates/ucm107976.pdf>, staženo 23. ledna 2018.
6. <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm110632.htm>, staženo 23. ledna 2018.
7. Szewczyk A, Wojtzak L: *Pharmacol Rev.* 54, 101 (2002).
8. Mingatto FE, et al.: *J Pharmacol Exp Ther* 303, 601 (2002).
9. Moreno-Sánchez R, et al.: *Biochem Pharmacol* 57, 743 (1999).
10. Somasundaram S, Rafi S, Hayllar J, et al.: *Gut* 41, 344 (1997).
11. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/018829s022lbl.pdf, staženo 23. ledna 2018.
12. Masubuchi Y, Nakayama S, Horie T: *Hepatology* 35, 544 (2002).
13. Masubuchi Y, Yamada S, Horie T: *J Pharmacol Exp Ther* 292, 982 (2000).

Literatura (pokračování)

14. Syed M, Skonberg Ch, Hansen SH: *Toxicology in Vitro* 31, 93 (2016).
15. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/022165lbl.pdf, staženo 23. ledna 2018.
16. Mehta R et al.(2008): Drug-associated Mitochondrial Toxicity. In: *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*. (Dykens J.A., Will Y. ed.), Wiley, New York, 71-126.
17. Massart J et al.: *Curr Pathobiol Rep* 1, 147 (2013).
18. Hinson JA et al.: *Handb Exp Pharmacol* 196, 369 (2010).
19. <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm239821.htm>, staženo 23. ledna 2018.
20. Olszewska A, Szewczyk A: *IUBMB Life* 65, 273 (2013).
21. Barnhill AE, Brewer MT, Carlson SA: *Antimicrob Agents Chemother* 56, 4046 (2012).
22. <https://online.epocrates.com/drugs/9511/chloramphenicol/Black-Box-Warnings>, staženo 23. ledna 2018.
23. Elmorsy E, Smith PA: *Biochem Biophys Res Commun* 460, 857 (2015).
24. Moore DE: *Drug Saf* 25, 345 (2002).
25. <https://online.epocrates.com/drugs/177/chlorpromazine>, staženo 23. ledna 2018.
26. Dykens JA, et al.: *Toxicol Sci* 103, 335 (2008).
27. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4944e/3.html>, staženo 23. ledna 2018.
28. Komulainen T, et al.: *Toxicology* 331, 47 (2015).
29. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh1465e/2.7.html#Jh1465e.2.7>, staženo 23. ledna 2018.
30. Wang DS, Kusuha H, et al.: *Mol Pharmacol* 63, 844 (2003).
31. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/021748s020lbl.pdf, staženo 23. ledna 2018.
32. Masubuchi Y, Kano S, Horie T: *Toxicology* 222, 233 (2006).
33. https://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/background/3634b1a_tab6c.htm, staženo 23. ledna 2018.
34. Berthiaume JM, Wallace KB: *Cell Biol Toxicol* 23, 15 (2007).
35. <https://online.epocrates.com/drugs/2402/doxorubicin>, staženo 23. ledna 2018.
36. Brinkman K, Kakuda TN: *Curr Opin Infect Dis* 13, 5 (2000).
37. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jwhozip01e/2.4.html#Jwhozip01e.2.4>, staženo 23. ledna 2018.
38. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/020412s040,020413s032lbl.pdf, staženo 23. ledna 2018.
39. <https://aidsinfo.nih.gov/drugs/290/tenofovir-disoproxil-fumarate/26/professional#S5.1>, staženo 23. ledna 2018.
40. https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:7oTVA-grZ@7/Oxidative-Phosphorylation, staženo 25. ledna 2018.
41. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ: *Physiol Rev* 94, 909 (2014).
42. Turrens JF: *J Physiol* 552, 335 (2003).
43. Held P: An introduction to reactive oxygen species, White Paper, BioTek Instruments Inc (2015).
44. Dröge W: *Physiol Rev* 82, 47 (2002).
45. Deawall DG et al.: *J Toxicol*, 1 (2012).
46. Taanman JW: *Biochim Biophys Acta* 1410, 103 (1999).
47. Malik AN, Czajka A: *Mitochondrion* 13, 481 (2013).
48. Rial E et al.: *Biochim Biophys Acta* 1797, 800 (2010).
49. Labbe D. et al.: *Fund Clin Pharmacol* 22, 335 (2008).
50. Scatena R et al.: *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C12 (2007).
51. Masubuchi Y et al.: *Toxicology* 222, 233 (2006).
52. Zhou S, Wallace K: *Toxicol Sci* 48, 82 (1999).
53. Marroquin LD et al.: *Toxicol Sci* 97, 539 (2007).
54. Diaz-Ruiz R et al.: *BBA-Bioenergetics* 1807, 568 (2011).
55. Sakamuru S et al.: *Physiol Genomics* 44, 495 (2012).
56. Perry SW et al.: *Biotechniques* 50, 98 (2011).
57. Scorrano L et al.: *J Biol Chem* 274, 24657 (1999).
58. Cossarizza A et al.: *Biochem Biophys Res Commun* 197, 40 (1993).
59. Held P et al.: Fluorescent detection of drug-induced mitochondrial toxicity, Application Note, BioTek Instruments Inc (2010).
60. Barrientos A, Fontanesi F, Díaz F (2009): Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. In: *Current Protocols in Human Genetics* 63. Wiley, New York, 1-14.
61. Papkovsky DB: *Methods Enzymol* 381, 715 (2004).
62. Rogers GW et al.: *PLoS ONE* 6, e21746 (2011).
63. Dranka BP et al.: *Free Radic Biol Med* 51, 1621 (2011).
64. <http://hpst.cz/molekularni-biologie/bunecna-analyza-seahorse-xf/technologie-seahorse-xf>, staženo 29. listopadu 2017.
65. Dikalov SI, Harrison DG: *Antioxid Redox Signal* 20, 372 (2014).
66. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC: *J Biochem Biophys Methods* 65, 45 (2005).
67. Forkink M et al.: *Biochim Biophys Acta* 1797, 1034 (2010).
68. de Mendoza C et al.: *AIDS Rev* 6, 169 (2004).
69. <http://www.mitosciences.com/PDF/mitotox.pdf>, staženo 25. ledna 2018.
70. Phillips NR, Sprouse ML, Roby RK: *Sci Rep* 4, 3887 (2014).
71. Birkus G, Hitchcock MJ, Cihlar T: *Antimicrob Agents Chemother* 46, 716 (2002).
72. http://www.primagen.com/inner_index.html?http&&www.primagen.com/mitox.html, staženo 29. listopadu 2017.

Souhrn

Barchánková L., Mertlíková-Kaiserová H., Hájek M.: Mitochondriální toxicita indukovaná léčiv

Mitochondriální dysfunkce vyvolané léky jsou často příčinou jejich vedlejších účinků, které mají celou řadu klinických projevů především v metabolicky aktivních tkáních. Z důvodů mitochondriální toxicity bylo z trhu staženo již několik léčiv. Díky stále se zdokonalujícím metodám lze mitochondriálně toxické účinky odhalit již v počátečních fázích vývoje, kdy je možné strukturu potenciálního léčiva modifikovat tak, aby byly nežádoucí účinky eliminovány. Je proto více než potřebné, aby včasné hodnocení mitochondriální toxicity bylo standardním postupem při vývoji nových léčiv.

Klíčová slova: mitochondrie, mitochondriální toxicita, vedlejší účinky léčiv

Summary

Barchánková L., Mertlíková-Kaiserová H., Hájek M.: Drug-induced mitochondrial dysfunctions

Drug-induced mitochondrial dysfunctions are often the cause of side effects, which have a variety of clinical manifestations, especially in metabolically active tissues. Due to mitochondrial toxicity, several drugs have been withdrawn from the market. With more refined methods, mitochondrial toxic effects can be detected in early stages of development, when the potential drug structure can be modified to eliminate side effects. It is therefore more than necessary to ensure that timely evaluation mitochondrial toxicity is a standard procedure in the drug development.

Keywords: mitochondria, mitochondrial toxicity, adverse drug reactions

cGAS-cGAMP-STING: SIGNALIZAČNÍ CESTA NEADAPTIVNÍHO IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Miroslav Smola, Evžen Bouřa

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR; miroslav.smola@uochb.cas.cz

Úvod

DNA je známa jako stimulant imunitního systému. V eukaryotních buňkách je obvykle přítomna pouze v buněčném jádru a mitochondriích¹. V případě výskytu DNA v cytosolu, ať už následkem buněčného poškození nebo následkem napadení cizím organismem, reaguje organismus silnou imunitní odezvou ve formě tvorby interferonů a dalších cytokinů².

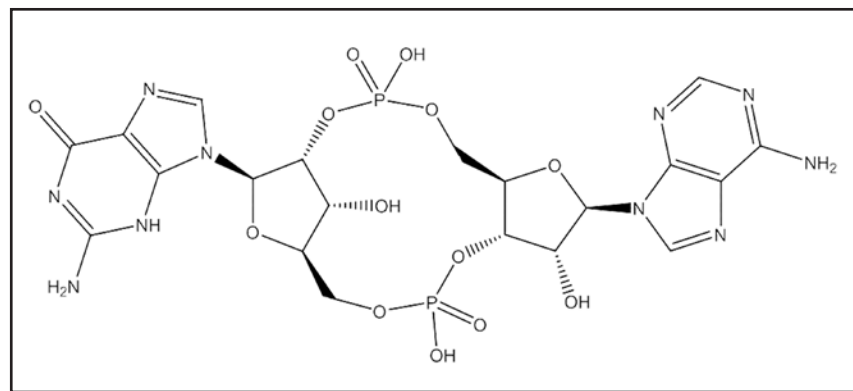
Součástí neadaptivního imunitního systému je soustava senzorů PRR (Pathogen-Recognition-Receptor) schopných detekovat běžné součásti patogenů, známých pod zkratkou PAMPs (Pathogen-Associated-Molecular-Patterns)^{3, 4}. Jedním z těchto senzorů je cytosolický protein s enzymovou aktivitou cGAS (cyklo GMP-AMP syntasa)^{1-3, 5-12}. Enzym cGAS rozpoznává dvouřetězcovou DNA a následně syntetizuje cyklický dinukleotid (CDN) 2'3'cGAMP (Obr. 1)². Tento CDN je rozeznáván receptorem STING (stimulator of interferon genes)^{2, 6}. STING je dimerní protein lokalizovaný na membráně endoplasmatického retikula⁵. Po navázání 2'3'cGAMP spouští tento receptor signalizační kaskádu (s pomocí kinas TBK1 a IKK) a aktivuje transkripční

faktory IRF3 a NF-κB, což vede k indukci exprese interferonů typu I (INF-α a INF-β) a dalších cytokinů. Signalizace je ukončena degradací STINGu^{9, 11}.

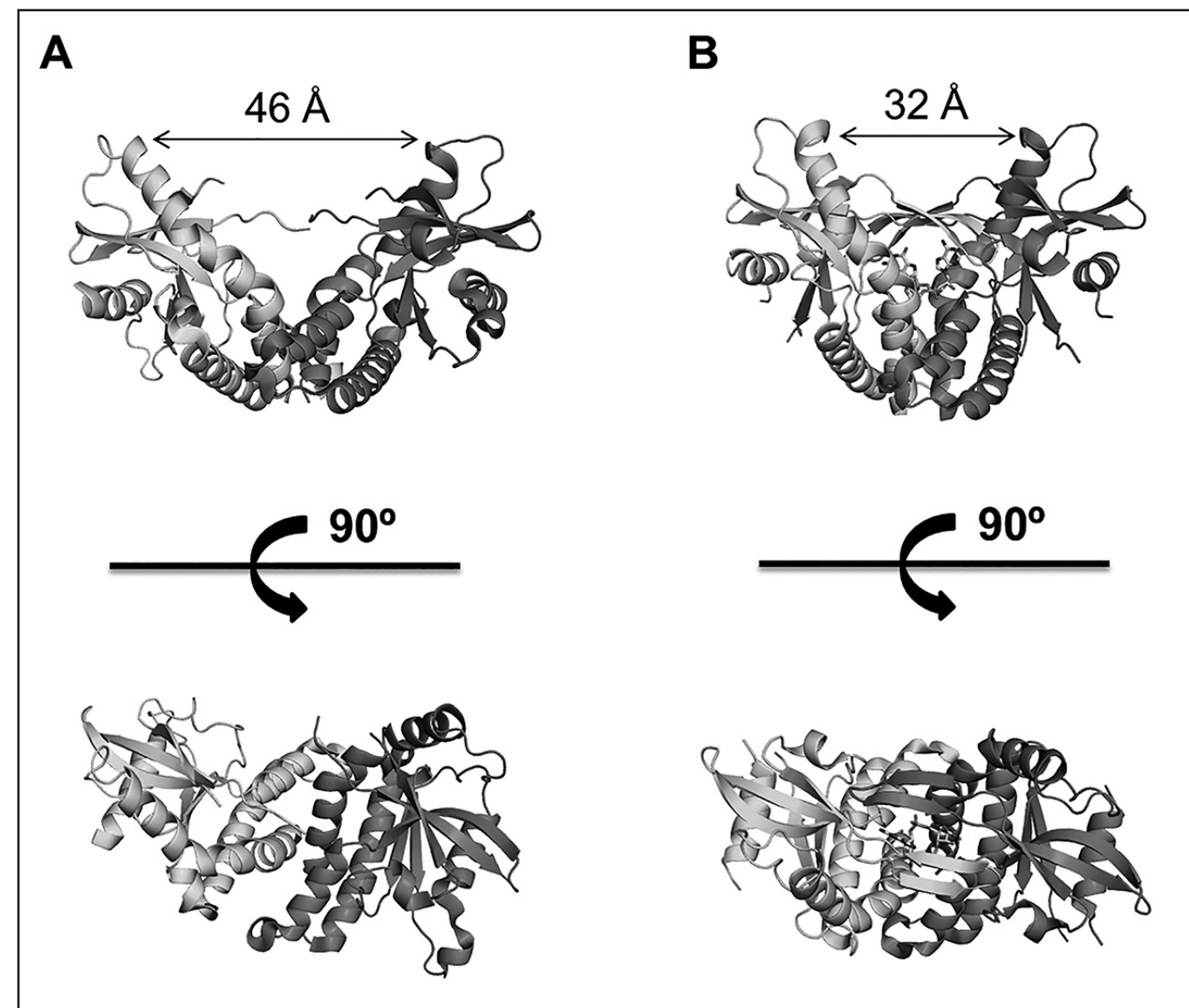
cGAS-cGAMP-STING signalizační cesta byla identifikována jako klíčová pro spuštění transkripce genů neadaptivního imunitního systému při infekci organismu DNA virem (např. HSV1, HBV, adenovirus, vakcinia virus) a retroviry, včetně HIV^{8, 9}. Tato signalizační cesta může být spuštěna i stimulací cyklickými dinukleotidy bakteriálního původu, například c-di-AMP *Listerie monocytogenes*⁹. Zároveň ale chronická stimulace receptoru STING vlastní DNA organismu vede k život ohrožujícím autoimunitním onemocněním⁸.

Aktivace receptoru STING

Při nahromadění dvouřetězcové DNA mikrobiálního nebo hostitelského původu v cytosolu dochází k aktivaci receptoru cGAS^{2, 11}. cGAS obsahuje nukleotidyl-transferasovou doménu a dvě DNA vazebné domény. Po navázání dvouřetězcové DNA vzniká komplex cGAS:DNA v poměru 2:2 a dochází ke konformační změně¹¹, jež vede k odhalení aktivního místa cGASu a syntéze 2'3'cGAMP z ATP a GTP^{6, 11}. cGAS rozpoznává DNA nespecificky (nezávisle na sekvenci) pouze přes cukerno-fosfátový řetězec a nerozpoznává žádnou z bazí¹¹. Nově vytvořený druhý posel 2'3'cGAMP je specificky rozpoznáván membránovým receptorem endoplasmatického retikula STING². Tento receptor s jednou cytosolickou a čtyřmi transmembránovými doménami tvoří v inaktivním stavu homodimer s otevřenou konformací (Obr. 2A)⁵. Asociace STINGu s CDN vede k uzavření konformace homodimeru (Obr. 2B) a sou-



Obr. 1: 2'3'-cGAMP (Cyklo [G(2',5')pA(3',5')p]).



Obr. 2: Porovnání struktury cytosolických domén receptoru STING v neaktivované a aktivované formě; A – neaktivní apoprotein bez zformovaného víčka (lid), B – aktivovaný protein s navázaným ligandem 2'3'cGAMP a víčkem tvořeným čtyřmi β-skládanými listy; C-konec není viditelný; zelenou a fialovou barvou jsou odlišeny monomery homodimeru receptoru; vzdálenosti jsou měřeny mezi ca TYR186.

časně k vytvoření víčka (lid) ze čtyř β-skládaných listů (po dvou od každého monomeru)⁵ a k aktivaci receptoru^{1-3, 5, 12}. Následně se STING jako součást preautofagosomu přesouvá do perinukleárního prostoru^{9, 11}.

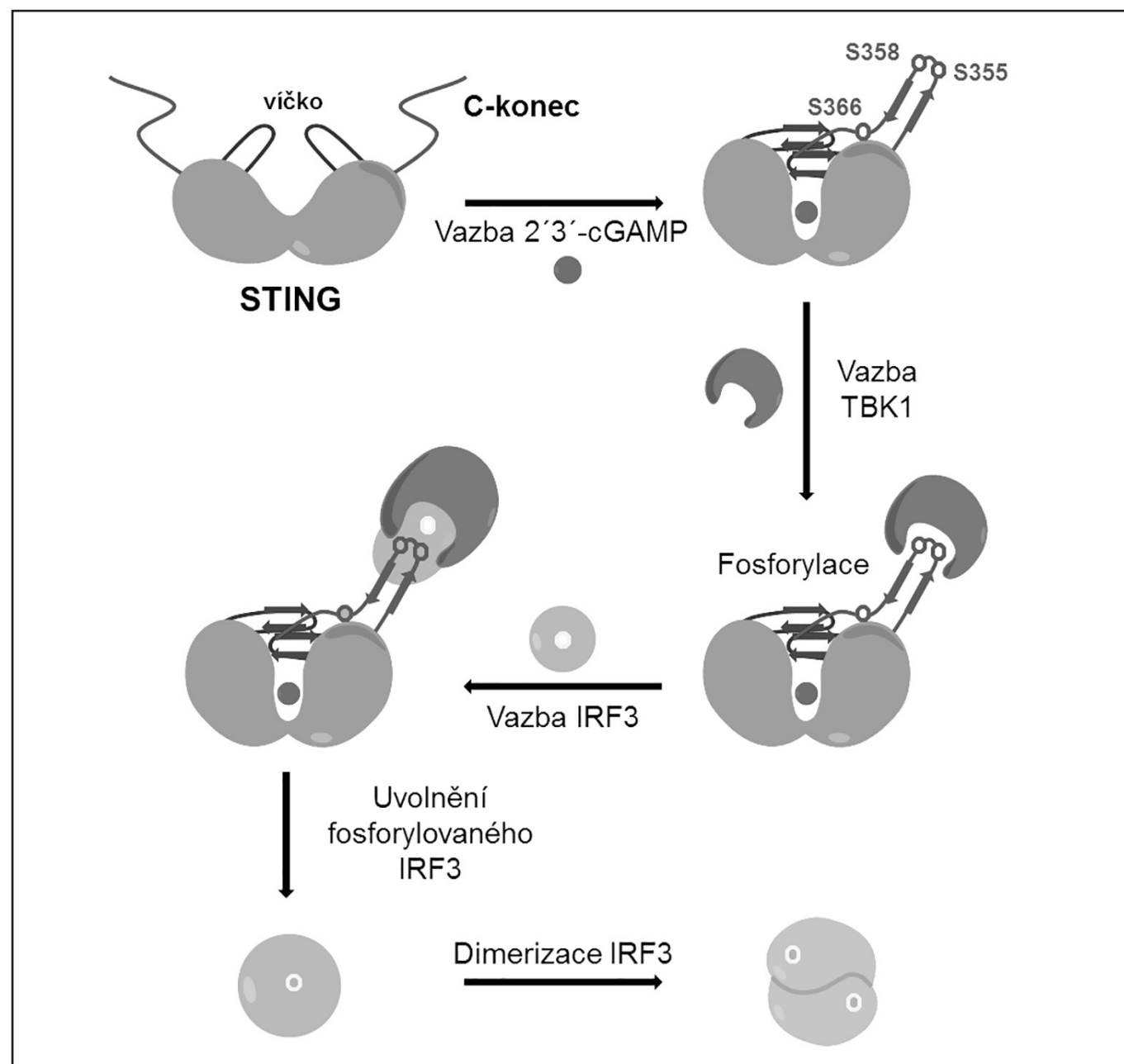
Od aktivace stimulatoru k expresi

Aktivovaný STING funguje jako adaptorový protein, jenž rekrutuje a dále aktivuje protein kinas TBK1 a IKK. Tyto kinas následně aktivují transkripční faktory IRF3 (TBK1) a NF-κB (IKK)¹². STING je po předání signálu degradován autofagosomálně^{9, 11}. Aktivace IRF3 a NF-κB v rámci této signalizační cesty byly dříve považovány za nezávislé⁶, poslední zjištění ale poukazuje na jejich silnou provázanost¹².

Předpokládanou konformační změnou aktivovaného STINGu je sbalení neuspořádaného C-konce a jeho následná interakce s víčkem uzavřeného homodimeru. Sbalením C-konce je umožněna interakce STINGu s TBK1 a následná fosforylace serinů C-konce (předpo-

kládají se S355, S358 a S366)¹⁰. Fosforylovaný C-konec je schopen vazby na transkripční faktor IRF3, čímž se IRF3 dostává do blízkosti TBK1 a dochází k jeho fosforylaci. Tato fosforylace má za následek vytvoření homodimeru IRF3 (Obr. 3)^{4, 10}. Homodimer IRF3 vstupuje z cytoplasmy do buněčného jádra a spouští transkripci genů pro interferony typu I a další cytokiny^{3, 4}.

Kinasa IKK je aktivována skrze svoji podjednotku IKKγ, známou též pod jménem NEMO (NFκB essential modulator). Aby mohla být aktivace uskutečněna, musí být NEMO ubiquitinylován, přičemž tato ubiquitinylace je podmíněna aktivací proteinu STING. Aktivní STING váže E3 ligasy TRIM56 a TRIM32 schopné katalyzovat syntézu a připojení K63 vázaného ubiquitinového řetězce k NEMO. Po aktivaci podjednotky NEMO dochází k autofosforylaci zbylých podjednotek IKKα a IKKβ, z nichž IKKα má pro další signalizaci v této cestě zanedbatelný význam¹². Aktivovaná podjednotka IKKβ dále fosforyluje IκB, inhibitor NF-κB, a označuje ho tak pro



Obr. 3: Model fosforylace C-konce receptoru STING a aktivace transkripčního faktoru IRF3; Navázání 2'3'- cGAMP na receptor iniciuje formování víčka, interakci C-konce s víčkem a uspořádání dvou β -skládaných listů v rámci C-konce. Zformování β -skládaných listů vede k vystavení serinů C-konce působení TBK1 a jejich fosforylaci. Vazebná doména IRF3 se váže na fosforylovaný C-konec a tím se dostává do blízkosti TBK1, což vede k fosforylaci samotného IRF3. Fosforylovaný IRF3 je uvolněno z vazby na C-konec a asociuje s dalším fosforylovaným IRF3 do homodimeru.

proteosomální degradaci¹³. NF- κ B po odstranění inhibitoru vstupuje do buněčného jádra a spouští expresi genů pro interferony typu I a další cytokiny¹².

Cesty STING-TBK1-IRF3 a STING-TRIM32/56-IKK-NF- κ B jsou silně provázány. Při testech na tkáňových kulturách bylo prokázáno, že v nepřítomnosti funkční cesty NEMO-IKK je schopnost TBK1 fosforylovat IRF3 velmi nízká. Stejně tak schopnost IKK fosforylovat I κ B je značně omezena v nepřítomnosti TBK1. Předpokládá se vzájemná fosforylace TBK1 a IKK β vedoucí k jejich plné aktivitě¹².

Závěr

Skupiny DNA virů a retrovirů zahrnují původce v současné době špatně léčitelných a neléčitelných nemocí,

ať už se jedná o žloutenku typu B či infekci HIV a s ním spojeným syndromem získané imunitní nedostatečnosti (AIDS). Stejným problémem světového zdraví jsou autoimunitní choroby jako roztroušená skleróza nebo systémový lupus erythematosus, kde byl u pacientů postižených těmito chorobami zjištěn zvýšený výskyt protilátek proti nukleovým kyselinám. Pro oba tyto problémy se zdá být klíčové studium cGAS-cGAMP-STING signální cesty a vývoj léčiv s regulačním účinkem na tuto cestu.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu InterBioMed LO1302 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Literatura

1. Cai X, Chiu YH, et al.: *Mol. Cell* 54(2), 289 (2014).
2. Diner EJ, Burdette DL, et al.: *Cell Rep.* 3(5), 1355 (2013).
3. Liu SQ, Cai X, et al.: *Science* 347(6227), 1217 (2015).
4. Tanaka Y and Chen ZJ: *Sci. Signal.* 5(214), 11 (2012).
5. Gao P, Ascano M, et al.: *Cell* 154(4), 748 (2013).
6. Zhang X, Shi HP, et al.: *Mol. Cell* 51(2), 226 (2013).
7. Mankan AK, Schmidt T, et al.: *EMBO J.* 33(24), 2937 (2014).
8. Konno H and Barber GN: *Microbes Infect.* 16(12), 998 (2014).
9. Barber GN: *Nat.Rev. Immunol.* 15(12), 760 (2015).
10. Tsuchiya Y, Jounai N, et al.: *EBioMedicine* 9(87) (2016).
11. Chen Q, Sun LJ, et al.: *Nat. Immunol.* 17(10), 1142 (2016).
12. Fang R, Wang CG, et al.: *J. Immunol.* 199(9), 3222 (2017).
13. Galluzzi L, Vanpouille-Box C, et al.: *Cell* 173(1), 1 (2018).

Souhrn

Smola M., Bouřa E.: cGAS-cGAMP-STING: signální cesta neadaptivního imunitního systému

Neadaptivní imunitní systém je první obranou organismu při jeho napadení patogenem. Signální cesta cGAS-cGAMP-STING je součástí tohoto systému a je zcela klíčová při obraně proti DNA virům a retrovirům. Zároveň je chronické vybuzení této kaskády pravděpodobnou příčinou některých autoimunitních onemocnění. Studium této signální cesty je klíčové pro vývoj terapeutik virových a autoimunitních onemocnění.

Klíčová slova: cyklo GMP-AMP syntasa (cGAS), 2'3'-cGAMP, STING, neadaptivní imunitní systém, signální kaskáda

Summary

Smola M., Bouřa E.: cGAS-cGAMP-STING: signaling pathway of innate immune system

The innate immune system is the first line of defence of organism against pathogens. As a part of innate immune system, cGAS-cGAMP-STING signaling pathway takes a crucial part in immune response to DNA viruses and retroviruses. In contrast, chronic activation of this pathway is probably cause of some autoimmune diseases. Studium of this signaling pathway is crucial for new antiviral and immunosuppressive drugs development.

Keywords: cyclo GMP-AMP synthase (cGAS), 2'3'-cGAMP, STING, innate immune system, signaling pathway

OBSAH

Úvod	25
Rumlová M.: Mikroskopy odhalující 3D-struktury proteinů v téměř atomárním rozlišení Science fiction nebo realita?	26
Pluskalová M.: Pohled do nitra živých buněk bez invazivní chemie pomocí holo-tomografie	31
Ulrychová L.: Serínové proteasy helmintů napadajících člověka	33
Barchánková L., Mertlíková-Kaiserová H., Hájek M.: Mitochondriální toxicita indukovaná léčiv	40
Smola M., Bouřa E.: cGAS-cGAMP-STING: signalizační cesta neadaptivního imunitního systému	48

CONTENT

Editorial	25
Rumlová M.: Microscope reveals the 3D structure of proteins in almost atomic resolution: Science fiction or reality?	26
Pluskalová M.: Look inside live cells without invasive chemistry using holo-tomography	31
Ulrychová L.: Serine proteases of human helminths	33
Barchánková L., Mertlíková-Kaiserová H., Hájek M.: Drug-induced mitochondrial dysfunctions	40
Smola M., Bouřa E.: cGAS-cGAMP-STING: signaling pathway of innate immune system	48