

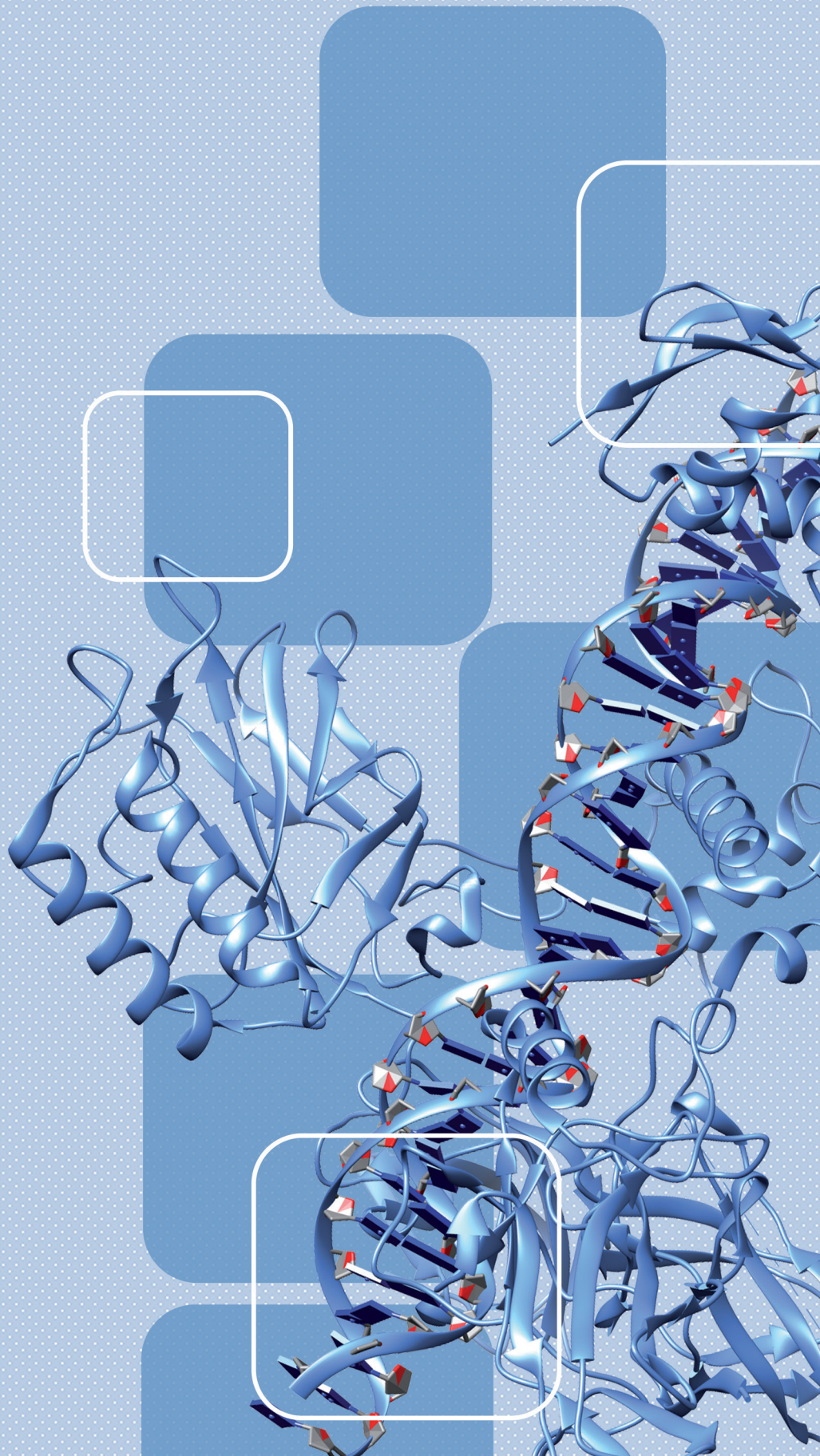
Bio

Ročník 29 • Číslo 4/2019

prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)
a
člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: University of Chemistry and Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

and

**member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efb-central.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
UCT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

čas velmi rychle ubíhá a za chvíli budeme mít konec roku. Od minulého čísla našeho Bioprospectu naše společnost tvrdě pracovala na přípravě největší akce opakující se v tříletých intervalech. Pokrok v přípravě můžete sledovat na webové stránce www.biotech2020.cz. Zatím se můžeme pochlubit významnými pozvanými přednášejícími s přednáškami o velice zajímavých a aktuálních tématech v biotechnologii. Byla též otevřena registrace, takže bychom Vás velmi rádi požádali, abyste využili této jedinečné příležitosti a přihlásili se k účasti. Rádi bychom Vás také požádali, abyste o našem mezinárodním symposiu informovali Vaše známé, přátele i autory Vám známých publikací a pozvali je k účasti. Rozhodně můžeme nabídnout nejen kvalitní vědecký program, ale i skvělou možnost navázání dalších kontaktů, nadstandartní prostředí i skvělý společenský program. Účast na symposiu nabízí i exkursi do světoznámého pivovaru Budvar v Českých Budějovicích, prohlídku zámku Hluboká a ovšem i kouzelnou atmosféru Prahy a jejího okolí. Nabízíme také možnost publikace přehledných článků souvisejících s tématem přednášky v *Biotechnology Advances* jako u minulých symposií, ale i možnost publikace přehledných článků nebo původních sdělení v časopisech *Antibiotics* a *Folia microbiologica*. Pokud budete mít zájem o poslání informativního zvacího dopisu, rádi Vám jej na požádání zašleme. Těšíme se, že nám pomůžete se získáváním zejména zahraničních účastníků. Vaši prokázanou aktivitu můžeme ocenit i slevou na vložném.

Jako vždy v našich úvodnicích i tentokrát si všimneme některých zajímavostí, které jsou předmětem zvýšené pozornosti.

Velký pokrok v nejrůznějších oblastech nabízejí nanotechnologie. Široký okruh aplikací zahrnuje i velkou oblast biotechnologií. Zde bychom Vám rádi doporučili přečíst si zajímavý přehled „Nanotechnology in Medicine – Nanoparticles in Medicine“ (<https://www.understandingnano.com/medicine.html>). V článku lze získat i další odkazy na různé aplikace, které byly na různých pracovištích vyzkoušeny. Mezi ně patří nejen doručení léčiv na potřebné místo zásahu jako jsou např. rakovinné buňky, ale také přenos srdečních kmenových buněk do poškozeného srdce. Velice perspektivní se jeví možnost včasné detekce rakovinných buněk v krevním řečišti pomocí protilátek imobilizovaných na uhlíkových nanočásticích. Je popisována řada dalších možností diagnostických technik pomocí nanotechnologií. Popisovány jsou možnosti různých antibakteriálních zásahů (sterilizace lékařských pomůcek či likvidace infekcí rezistentních proti antibiotikům). Zajímavým nápadem

je vývoj polymerních nanočástic, které simulují krevní destičky. Laboratorní testy údajně prokázaly, že jejich injekční aplikace účinně omezila poúrazové ztráty krve. Nanoroboti mohou být naprogramováni tak, aby opravili poškozené (nemocné) buňky (<http://jetpress.org>). Uvádí se, že chromatocyty mohou posloužit jako ideální genový vektor, který umožní úplné a trvalé vyléčení všech genetických onemocnění náhradou poškozených chromosomů v živých buňkách pomocí uměle připravených chromosomů, které jsou kopií původních chromosomů. Sépie se brání predátorům vypouštěním tekutiny připomínající inkoust. Čínští vědci zjistili, že tato tekutina velmi účinně potlačuje nádory u myši. Ukázalo se, že tento účinek vzniká působením nanočástic, které v kombinaci s ozařováním blízkým infračerveným zářením mohou téměř kompletně zastavit růst nádoru. Izraelští vědci vyvinuli nový typ nanovakcíny, kterou je možno zlikvidovat melanom, který představuje nejagresivnější nádor kůže. Léčba údajně je účinná jak proti primárnímu nádoru, tak i metastázám a funguje i jako prevence. Principem nanovakcíny jsou nanočástice z biologicky rozložitelného polymeru obsahujícího dva peptidy. Nanočástice stimulují imunitní systém příjemce vakcíny a imunitní buňky se naučí rozeznávat zmíněné peptidy, které jsou obsaženy v melanomu. Vědci jsou přesvědčeni, že obdobný model bude možné využít i při léčbě jiných typů nádorů.

Vážení přátelé, loučíme se s Vámi v tomto roce a těšíme se, že se nad stránkami našeho Bioprospectu budeme setkávat i v roce příštím. Přejeme Vám a Vaším blízkým klidné prožití vánočních svátků a po celý příští rok pevné zdraví, pohodu a mnoho úspěchů v soukromém i profesním životě.

Vaši

Jan Káš a Petra Lipovová



Biotech 2020
and 8th Czech-Swiss Symposium with Exhibition
June 17-20, 2020

Prague Czech Republic
www.biotech2020.cz

EXTRACELULÁRNÍ VÁČKY A JEJICH BIOMEDICÍNSKÝ POTENCIÁL

Peter Vanek, Helena Kupcová Skalníková

Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, Liběchov; skalnikova@iapg.cas.cz

Úvod

Extracelulární váčky (EV) jsou částice obalené dvojitou lipidovou membránou uvolňované z buněk do okolního prostředí. Tvorba extracelulárních váčků byla pozorována u nižších i vyšších organismů, včetně bakterií, prvoků, hub, rostlin a živočichů¹. U savců jsou téměř všechny typy buněk schopny uvolňovat EV a přítomnost EV byla prokázána ve většině tělních tekutin, jako jsou např. krev, moč, mozkomíšní mok, sliny, sperma, amniotická tekutina, mateřské mléko, tekutina z bronchoalveolární laváže a synoviální tekutina^{2,3}. Extracelulární váčky mají v savčím organismu různé funkce. Podílí se na zástavě krvácení, imunitních reakcích, podporují hojení ran, jsou nezbytné pro reprodukci a vývoj embrya a plodu, v nervovém systému hrají roli v přenosu signálů mezi neurony a udržování homeostázy centrálního nervového systému¹.

Historie

První náznak existence EV pochází z roku 1946, kdy byly popsány prokoagulační částice pocházející z krevních destiček izolovatelné centrifugací při přetížení 31 000 g⁴. Přítomnost „fragmentů plazmatické membrány“ v různých tělních tekutinách a supernatantu HeLa buněk byla podrobněji zdokumentována r. 1977⁵. Z těchto a dalších prací se usuzovalo, že váčky vznikají pučením z buněčné membrány. V 80. letech byl při studiu recyklace transferinového receptoru během zrání červených krvinek pozorován mnohem komplexnější vznik EV. Dvě výzkumné skupiny prokázaly, že malé váčky vznikají vchlípením membrány dovnitř nitrobuněčných endozomů, což vede ke vzniku multivezikulárních tělísek, která pak mohou fúzovat s plazma-

tickou membránou a uvolňovat vnitřní malé váčky do extracelulárního prostoru (Obr. 1)^{6,7}. Tyto váčky vznikající z endozomů byly nazvány exozomy⁸. Dalších 20 let se předpokládalo, že EV slouží pouze k odstranění buněčného odpadu a nebyla jim prakticky věnována pozornost. Převratný objev nastal v letech 2006 – 2007, kdy byla v EV zjištěna přítomnost RNA a možnost přenosu funkční RNA pomocí EV do recipientních buněk a ovlivnění jejich genové exprese^{9,10}. Tento objev způsobil obrovský zájem o EV jako zprostředkovatele přenosu informace mezi buňkami¹.

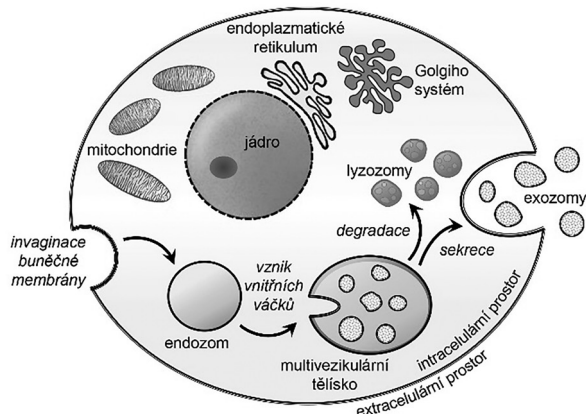
Typy extracelulárních váčků

V současnosti jsou rozlišovány tři hlavní podtypy EV, lišící se mechanismem vzniku, a to apoptotická tělíska, mikrovezikly a exozomy¹¹. Apoptotická tělíska vznikají při rozpadu buněk programovanou buněčnou smrtí, dosahují velikosti 50 – 5000 nm a obsahují fragmenty buněk včetně DNA a organel (např. mitochondrií). Mikrovezikly (nazývané též ektozomy) vznikají pučením buněčné membrány do vnějšího prostoru a dosahují velikosti 100 – 1000 nm. Oproti tomu exozomy vznikají výše popsaným mechanismem uvolnění vnitřních váčků multivezikulárních tělísek do extracelulárního prostoru, představují nejmenší kategorii EV (30 – 150 nm) a jsou pozorovatelné jen v elektronovém mikroskopu^{12–14}. Díky specifickému mechanismu vzniku a částečně cílenému zabudování určitých biomolekul (nukleové kyseliny, proteiny) během biogeneze, stojí exozomy v centru zájmu současného výzkumu jako zprostředkovatelé mezibuněčné komunikace či nositelé biomarkerů lidských nemocí. Exozomy zároveň patří mezi nejvíce studované a nejlépe zdokumentované EV.

Charakteristika exozomů

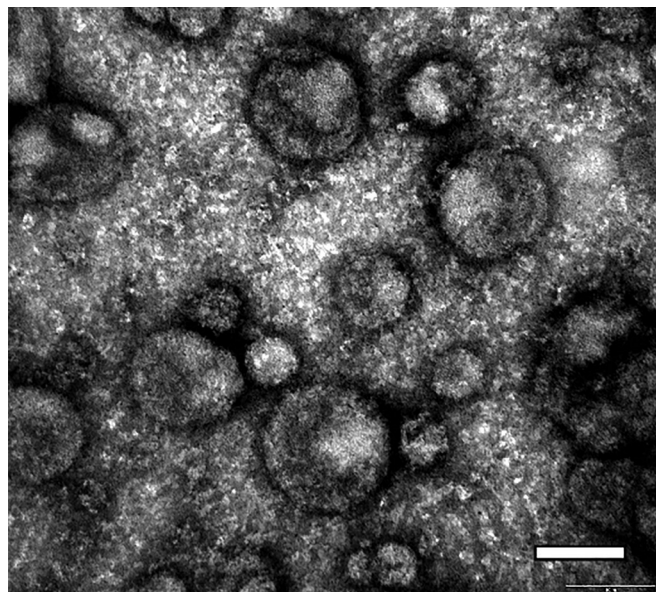
I když nejsou známy žádné specifické markery exozomů, tyto váčky jsou odlišitelné od ostatních typů EV kromě své velikosti a mechanismu vzniku také na základě fyzikálních vlastností a proteinového složení. Exozomy sedimentují při přetížení 100 000 g a při ultracentrifugaci v sacharózovém gradientu se vyskytují ve frakcích o hustotě 1,13 – 1,19 g/ml¹⁵. V transmisním elektronovém mikroskopu se jeví jako membránou obalené částice o velikosti 30 – 150 nm (Obr. 2).

Lipidová membrána exozomů je obohacena o cholesterol, sfingomyelin a ceramid a obsahuje detergent-rezistentní domény (lipidové rafty)^{15, 16}. Uvnitř exozomy obsahují RNA (v některých případech i DNA), proteiny a některé malé molekuly. Z molekul RNA byla v exozomech pozorována přítomnost mRNA (jako funkční molekuly schopné translace či jako fragmenty mRNA), dlouhé nekódující RNA, mikro RNA a v některých stu-



Obr. 1: Biogeneze exozomů. Invaginací buněčné membrány vzniká časný endozom. Dalším vchlípením membrány endozomu vznikají v jeho nitru malé váčky. Endozom tak přechází v multivezikulární tělíska. Obsah multivezikulárního tělíska může splýnout s lyzozomy (dojde k jeho degradaci) nebo může být vyloučen ve formě exozomů ven z buňky.

díř i ribosomální RNA. RNA je pravděpodobně do exozomů zabudována cíleně, protože obsah jednotlivých RNA se liší mezi exozomy a zdrojovými buňkami. Přesný mechanismus třídění RNA do exozomů však není známý¹.



Obr. 2: Exozomy v elektronovém mikroskopu. Exozomy po fixaci a kontrastování octanem uranyle, pozorované v transmisním elektronovém mikroskopu. Měřítka představuje 100 nm, zvětšení 200 000x.

Co se týká proteinového složení, díky svému endozomálnímu původu jsou exozomy obohaceny o proteiny endozomů, plazmatické membrány a cytoplazmy a zároveň obsahují velmi málo proteinů jiných nitrobuněčných organel (jádro, mitochondrie, Golgiho aparát)¹³. Proteiny často se vyskytující v exozomech bez ohledu na jejich buněčný původ se využívají jako markery pro detekci těchto váčků a zahrnují např. tetraspaniny (CD9, CD63, CD81), cytoplazmatické proteiny (např. proteiny teplotního šoku Hsp 60, Hsp 70 a Hsp 90), proteiny související s biogenezí exozomů (Alix, TSG101) a vezikulárním transportem (RAB proteiny, anexiny)^{1,14,17,18}. V závislosti na zdrojové buňce exozomy dále obsahují některé povrchové adhezivní molekuly (např. integriny, adhezivní molekuly epitelových buněk EpCAM, adhezivní molekuly nervových buněk N-CAM a L1-CAM), antigen prezentující molekuly hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), enzymy, signální proteiny a jiné¹². Exozomy pocházející z nádorů obsahují nádorové antigeny a některé imunopresivní proteiny, jako např. FasL, TRAIL, nebo TGF- β ^{1,19}. U neurodegenerativních nemocí mohou exozomy obsahovat chybně poskládané proteiny a podílet na jejich šíření mezi buňkami²⁰.

Biomedicínský význam exozomů

Význam exozomů v diagnostice

Specifické složení exozomů (RNA, proteiny, lipidy) může odrážet buněčný původ i fyziologický stav zdrojové buňky. Exozomy v tělních tekutinách mohou nést markery různých nemocí a to i biomolekuly, které jsou jinak obtížně detekovatelné a které díky obalení lipidovou membránou můžou být v exozomech chráněné

proti degradaci²¹. Molekuly nacházející se v exozomech mohou být využity pro diagnostické nebo prognostické účely, např. skriningové testy, diagnostiku k potvrzení onemocnění či pro sledování průběhu léčby.

Nádorové buňky produkují až 10x více exozomů než normální buňky a v krvi pacientů s nádorovými onemocněními je často pozorován vyšší absolutní počet exozomů než u zdravých osob^{22,23}. Nejen celkový počet exozomů, ale zejména přítomnost specifických biomolekul může poukazovat na určitá onemocnění.

Exozomy můžou nést některé proteinové či miRNA nádorové markery. Molekuly CD151, CD171 a tetraspanin 8 v exozomech plazmy byly navrženy jako biomarkery rakoviny plic. Exozomy nesoucí tetraspanin 8 jsou spojovány také s růstem a invazivitou rakoviny žaludku. Glypican-1 v krevních exozomech může být diagnostickým vodítkem časných stadií nádorů slinivky břišní. Obohacení exozomů o rodinu miRNA let-7 může naznačovat metastazování rakoviny žaludku^{23,24}. Profilování miRNA v exozomech jako potenciálních biomarkerů nádorových onemocnění je předmětem intenzivního výzkumu.

U neurodegenerativních nemocí bylo zjištěno, že obsah Tau proteinu fosforylovaného na serinu 396, treoninu 181 a hladina amyloidu beta A β 1-42 v krevních exozomech neurálního původu koreluje s progresí Alzheimerovy nemoci a umožňuje předpovědět nástup nemoci až 10 let před propuknutím klinických příznaků²⁵. Podobně u Parkinsonovy nemoci vyšší hladiny α -synukleinu v krevních exozomech odvozených od nervových buněk odlišují pacienty od zdravých osob²⁶.

U srdečně-cévních chorob exozomy působí jako zprostředkovatelé mezibuněčné komunikace mezi kardiomyocyty, fibroblasty, buňkami hladké svaloviny a endotelovými buňkami a účastní se regulace regenerace srdce, přestavby síní a angiogeneze. Jako biomarkery srdečně cévních nemocí detekovatelné v krevních exozomech lze zmínit zvýšený obsah miR-1 a miR-133a u pacientů s hypertrofií srdce a zvýšení hladiny miR-208 b, specifické pro srdeční svalovinu, v krevních exozomech u infarktu myokardu²⁷. Exozomy jsou intenzivně studovány i u mnoha dalších onemocnění.

Využití exozomů v terapiích

Terapeutický potenciál má samotná modulace produkce a uvolňování exozomů, i když je tato alternativa zatím jen ve stadiu výzkumu. Snížení produkce EV může zmírnit průběh onemocnění u pacientů s nádory²⁸, např. bránit růstu a metastazování nádoru prsu po blokaci uvolňování exozomů inhibicí RAB27a GTPázy²⁹. Naopak stimulace tvorby EV z aktivovaných dendritických buněk může vést ke zvýšené prezentaci nádorových antigenů v komplexu s MHC a indukovat reakci cytotoxických T-lymfocytů^{15,24}.

Velký potenciál mají EV v regenerativní medicíně. Za tímto účelem jsou zkoumány zejména EV uvolňované mezenchymovými kmenovými buňkami. Exozomy produkované těmito buňkami byly testovány u modelů různých onemocnění, např. nemocí dýchacích cest, srdečně-cévních, neurologických, svalových, jaterních, kožních, ale i onemocnění trávicího systému a ledvin. Exozomy mezenchymových kmenových buněk modu-

lují expresi zánětlivých cytokinů, tlumí nadměrný zánět a napomáhají regeneraci tkání a přestavbě extracelulární matrix. Podobné účinky mají exozomy sekretované i z dalších kmenových buněk, jako např. indukovaných pluripotentních kmenových buněk či embryonálních kmenových buněk³.

Extracelulární váčky samotné či různě upravené lze použít i k transportu různých molekul, které jsou jinak těžko přenositelné do cílových buněk³⁰. V minulosti byly pro zapouzdření a dopravu léčiv či genů vyvinuty i jiné technologie, jako např. lipozomy či nanočástice, ale tyto doprovázely problémy jako akumulace v játrech a slezině místo v cílovém orgánu a nižší absorpce buňkami. Exozomy jako tělu přirozené nanočástice jsou vhodné pro transport rozpustných molekul, jsou méně imunogenní a méně toxické než jiné transportní systémy, díky své velikosti unikají fagocytujícím mononukleárním buňkám, snadno prostupují cévní stěnou a chrání svůj obsah před degradací^{24,31}. Exozomy jsou navíc malé a mohou pasivně difundovat tkáněmi (např. nádorovým stromatem) či překonat hematoencefalickou bariéru^{14,30}. Díky jedinečným membránovým proteinům a lipidům umožňují exozomy transport molekul do specifických cílových buněk disponujících patřičnými receptory³². Takto byl do exozomů vložen např. kurkumin, který vykazuje protizánětlivou a protinádorovou aktivitu³³. V jiné studii byl v upravených exozomech podán kurkumin nebo aktivátor transkripce STAT3 a aplikován intranasálně s cílem snížit aktivitu mikroglií u myšího modelu encefalitidy³⁴. Byl zkoumán i transport protinádorových látek doxorubicinu³⁵ a paklitaxelu^{36–38} pomocí exozomů.

Exozomy je možné využít i k přenosu RNA, jako např. siRNA, miRNA a shRNA, za účelem modifikace

biologických aktivit recipientních buněk³⁹. Například ve studii přenosu malé hydrofobní interferující RNA (hsiRNA) exozomy zacílené na mRNA pro protein huntingtin došlo v myších primárních kortikálních neuronech ke snížení exprese mRNA i proteinu huntingtinu a toto snížení záviselo na podané dávce⁴⁰. Cílený přenos interferujících RNA a jiných molekul by mohl představovat důležitý krok směrem k vývoji nových terapií neurodegenerativních nemocí⁴⁰.

Závěr

Exozomy nesou nukleové kyseliny a proteiny buněk, ze kterých pochází a tím odráží stav těchto buněk. Díky tomu, že jsou přítomné ve snadno dostupných tělních tekutinách (například krvi a moči), představují cenný nástroj biomedicíny pro neinvazivní diagnostické přístupy nádorových, neurodegenerativních, kardiovaskulárních a dalších nemocí. Kromě toho lze exozomy využít jako léčebné prostředky k modulaci zánětu a podpoře regenerace tkáně či jako transportní systémy pro doručení léčebných molekul do cílových buněk. Nicméně pro medicínské aplikace je nezbytný další výzkum, a to zejména zajištění izolace čistých EV s minimem kontaminant, vypracování standardizace metod izolace váčků až po testování efektivnosti a bezpečnosti jejich podání.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektů Národního programu udržitelnosti I. LO1609, GAČR projektu 19-01747S a Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000785.

Literatura

1. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, et al.: *J. Extracell. Vesicles* 4, 27066 (2015).
2. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE: *Proteomics* 8, 4083 (2008).
3. Gurunathan S, Kang M-H, Jeyaraj M, et al.: *Cells* 8 (2019).
4. Chargaff E, West R: *J. Biol. Chem.* 166, 189 (1946).
5. De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, et al.: *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 81, 237 (1977).
6. Harding C, Heuser J, Stahl P: *J. Cell Biol.* 97, 329 (1983).
7. Pan BT, Teng K, Wu C, et al.: *J. Cell Biol.* 101, 942 (1985).
8. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al.: *J. Biol. Chem.* 262, 9412 (1987).
9. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al.: *Leukemia* 20, 847 (2006).
10. Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al.: *Nat. Cell Biol.* 9, 654 (2007).
11. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, et al.: *J. Extracell. Vesicles* 2 (2013).
12. Colombo M, Raposo G, Théry C: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255 (2014).
13. Kowal J, Tkach M, Théry C: *Curr. Opin. Cell Biol.* 29, 116 (2014).
14. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S: *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016).
15. Théry C, Ostrowski M, Segura E: *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581 (2009).
16. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, et al.: *Nat. Cell Biol.* 21, 9 (2019).
17. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S: *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569 (2002).
18. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al.: *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 940 (2012).
19. Yang C, Robbins PD: *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 842849 (2011).
20. Coleman BM, Hill AF: *Semin. Cell Dev. Biol.* 40, 89 (2015).
21. Raimondo F, Morosi L, Chinello C, et al.: *Proteomics* 11, 709 (2011).
22. Zhang X, Yuan X, Shi H, et al.: *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* 8, 83 (2015).
23. Li W, Li C, Zhou T, et al.: *Mol. Cancer* 16, 145 (2017).
24. Cordonnier M, Chanteloup G, Isambert N, et al.: *Cell Adhes. Migr.* 11, 151 (2017).
25. Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, et al.: *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 11, 600 (2015).
26. Shi M, Liu C, Cook TJ, et al.: *Acta Neuropathol. (Berl.)* 128, 639 (2014).

27. Bei Y, Chen T, Banciu DD, et al.: *Adv. Exp. Med. Biol.* 998, 255 (2017).
28. Jaiswal R, Sedger LM: *Front. Oncol.* 9, 125 (2019).
29. Bobrie A, Krumeich S, Reyal F, et al.: *Cancer Res.* 72, 4920 (2012).
30. Lässer C, Jang SC, Lötvall J: *Mol. Aspects Med.* 60, 1 (2018).
31. Yang X-X, Sun C, Wang L, et al.: *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 308, 119 (2019).
32. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, et al.: *Nat. Biotechnol.* 29, 341 (2011).
33. Sun D, Zhuang X, Xiang X, et al.: *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 1606 (2010).
34. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, et al.: *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 1769 (2011).
35. Tian Y, Li S, Song J, et al.: *Biomaterials* 35, 2383 (2014).
36. Pascucci L, Coccè V, Bonomi A, et al.: *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 192, 262 (2014).
37. Yang T, Martin P, Fogarty B, et al.: *Pharm. Res.* 32, 2003 (2015).
38. Saari H, Lázaro-Ibáñez E, Viitala T, et al.: *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 220, 727 (2015).
39. Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al.: *Cell Biosci.* 9, 19 (2019).
40. Didiot M-C, Hall LM, Coles AH, et al.: *Mol. Ther.* 24, 1836 (2016).

Souhrn

Vanek P, Kupcová Skalníková H.: Extracelulární váčky a jejich biomedicínský potenciál

Extracelulární váčky (EV) jsou částice obalené dvojvrstvou lipidovou membránou uvolňované z buněk do okolního prostředí. Mezi hlavní typy EV patří apoptotická tělíska, mikrovezikly a exozomy. Exozomy jsou z EV nejlépe prozkoumané. Do exozomů jsou cíleně zabudovány proteiny a RNA zdrojových buněk. Díky přítomnosti v tělních tekutinách mohou být exozomy a zejména proteiny a RNA nesené těmito váčky využity ke sledování vzdálených či nedostupných buněk. Kromě tohoto potenciálu v diagnostice mohou být exozomy využity i v léčbě např. k podpoře hojení, modulaci zánětu či k dopravě léčivých přípravků do cílových míst v organismu. Z těchto důvodů se exozomy těší intenzivnímu zájmu v biomedicínském výzkumu.

Klíčová slova: Extracelulární váčky, exozomy, diagnostika, léčba, biomedicína

Summary

Vanek P, Kupcová Skalníková H.: Extracellular vesicles and their biomedical potential Extracellular vesicles (EVs) are lipid bilayer membrane enveloped particles released by cells to extracellular space. Major EV types are represented by apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. Exosomes are the best characterized EVs. Certain proteins and RNAs may be directly incorporated into exosomes during their biogenesis. Due to their availability in body fluids, exosomes may be used to monitor distant or inaccessible organs. Beside this diagnostic potential, exosomes can be used in therapeutic applications to support healing, modulate inflammation or as carriers of therapeutic agents to target sites in an organism. From these reasons, exosomes are in center of current biomedical research.

Keywords: Extracellular vesicles, exosomes, diagnosis, therapy, biomedicine

GÉNOVÁ TERAPIA HUNTINGTONOVEJ CHOROBY (HCH) USKUTOČNENÁ NA TgHD MINIPRASATÁCH V LIBĚCHOVE S HOLANDSKOU FIRMOU UníQure – PREDKLINICKÉ ŠTÚDIE

Božena Levinská (Bohuslavová)

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR; bohuslavova@iapg.cas.cz

Úvod

Huntingtonova choroba (HCH) patří k nevyliciteľným ochoreniam s fatálnym koncom. Zaradujeme ju k monogénnym neurodegeneratívnym ochoreniam. Podľa počtu opakovaní CAG repetícií v géne kódujúcom huntingtín, nástup ochorenia môže byť v detskom veku (5%), strednom veku – najčastejšie (90%) a vyššom veku (5%)¹. Začiatok choroby sa prejaví zmenami v správaní, ku ktorým sa pridružia problémy s koordináciou a pohybom. Neskôr dochádza k psychickým zmenám. Ochorenie končí smrťou. V dnešnej dobe zatiaľ nie je vyvinutá účinná liečba. Doktorovi momentálne len príznaky farmakologicky utlmujú, ale nelieči sa príčina choroby.

Na vyvinutie správnej liečby pre ľudí trpiacich HCH je potrebné porozumieť nielen prejavom choroby, ale aj mechanizmom, ktoré túto chorobu spôsobili. Aby sme tieto mechanizmy mohli študovať, je potrebné vytvoriť

zvieracie modely, ktoré budú mať fenotyp odpovedajúci HCH. Na našom ústave v Liběchove sme v roku 2009 vytvorili model transgénneho miniprasaťa nesúceho N – terminálnu časť ľudského mutovaného huntingtínu (mHTT). Tento transgénny model (TgHD) nesie časť sekvencie kódujúcu ľudský mutovaný huntingtín a bol vytvorený mikroinjekciou lentivirusového vektoru, ktorý obsahoval promótorovu sekvenciu pre ľudský huntingtín a N-terminálnu sekvenciu (548 AMK) s 145CAG/CAA repetíciami do embryí miniprasiat v štádiu prvogadiet. Insert je lokalizovaný na chromozóme 1. V júli (5. 7.) 2009 sa narodila prasnička Adélka, nesúca mHTT, ktorá sa následne stala zakladateľkou línie transgénnych miniprasiat. Exprimuje N-terminálny fragment mutovaného huntingtínu so 124 CAG/CAA repetíciami². Dostatok potomkov a veľká príbuznosť fyziológie a morfológie medzi prasaťom (*Sus scrofa*) a človekom (*Homo sapiens*) nám dáva dostatok možnosti nielen na študova-

nie zmien v orgánoch, periférnych tkanivách a behavi-orálnych zmien, ale aj na testovanie nových génových terapií.

Génovou terapiou nazývame liečebný postup, pri ktorom je do genómu pacienta vložená sekvencia DNA, pričom táto sekvencia kóduje chýbajúci alebo nefungujúci proteín, poprípade môže potlačiť mutovaný proteín. Podľa toho či terapia nahradí gény vo všetkých telových bunkách okrem pohlavných, alebo nahradí gény v gamétach delíme terapiu na somatickú a game-tickú.



Obr. 1: Prvý vrh prasiat vzniknutých z injektovaných embryí, medzi prasiatkami TG prasnička Adélka.

Predklinické štúdie génovej terapie v Liběchove

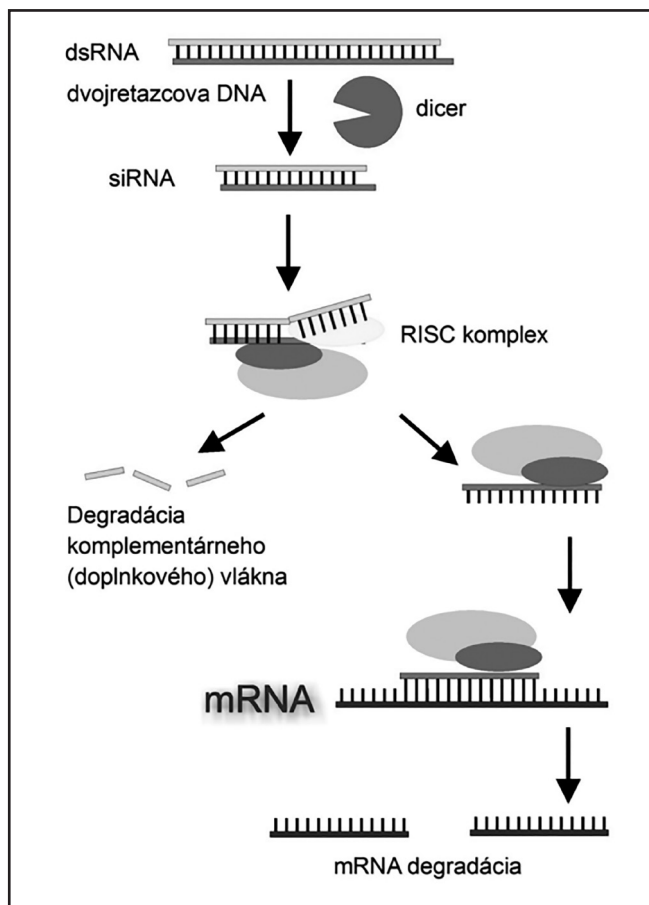
Prvá predklinická štúdia prebehla v roku 2016. V tejto štúdii sme určili účinnosť vektoru. Druhá predklinická štúdia prebieha na našom ústave od leta 2017. Touto štúdiu skúmame dĺžku účinnosti vektoru. Obe štúdie sú založené na RNA interferencii (RNAi).

RNA interferencia (RNAi)

Spôsob umlčania génovej expresie. Rozlišujeme siRNA a mikroRNA. Termín RNAi bol vytvorený pre sekvenčnú degradáciu mRNA z dlhej dvojreťazcovej dsRNA³ (Obr. 2). RNAi môžeme rozdeliť do troch krokov. V prvom kroku dôjde k štiepeniu dlhej dvojvláknovej dsRNA pomocou DICER, v druhom kroku dochádza naviazaniu malých RNA na efektorový komplex nazývaný RISC a v treťom kroku dochádza k rozpoznávaniu a štiepeniu RNA pomocou RISC (RNA-induced silencing complex).

siRNA

Do bunky je zavedená z terapeutických dôvodov. Má schopnosť špecificky štiepiť cieľnú mRNA nielen v cytoplazme, ale jej aktivita bola zistená aj v jadre⁴. Molekuly siRNA vznikajú pomocou enzýmu DICER (približne 200 kDa veľká RNáza III), ktorý štiepi dlhú dvojreťazcovú dsRNA⁵. Po rozštiepení a rozpletení je odstránené proti zmyslové vlákno, a vytvorí sa umlčovací komplex indukovaný RNA (RISC)⁶. Ten v cytoplazme vyhľadáva cieľovú mRNA a dokonale sa s ňou spáruje. Po spárovaní je RISC uvoľnený.



Obr. 2: Mechanizmus pôsobenia RNA interferencie (upravené podľa Johna Schmidta)

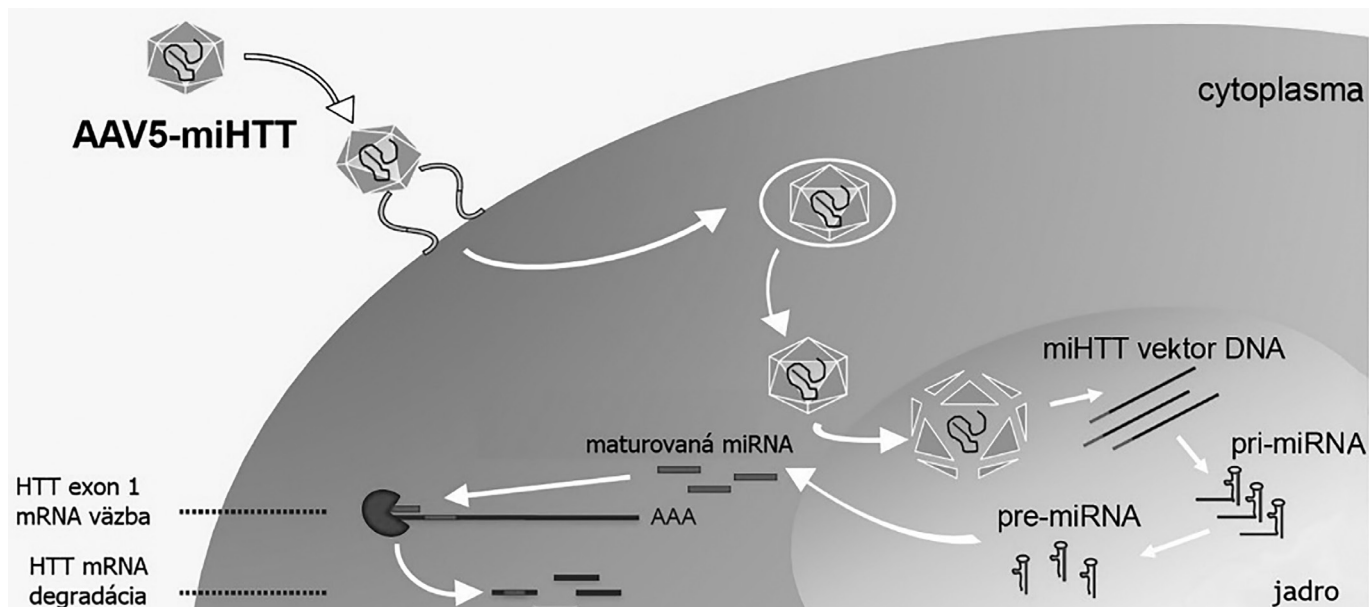
miRNA - mikroRNA

Ide o nekódujúcu RNA, bežne sa vyskytujúcu v bunke, ktorá hraje dôležitú úlohu v regulácii bunkových funkcií. Porucha regulácie miRNA má vplyv na veľký počet ľudských ochorení⁷. V jadre bunky sa najprv miRNA prepíše RNA polymerázou do pri-miRNA, ktorá sa skladá do vlásenky^{8,9}. Tá vstúpi do komplexu s endonukleázou Drosha a vzniká prekurzor miRNA (pre-miRNA)¹⁰. V cytoplazme je pre-miRNA štiepená pomocou enzýmu DICER na 21 nukleotidový duplex miRNA. Po odstránení zmyslového vlákna sa vytvorí RISC. Pretože RISC sa páruje nedokonale, tak nedochádza k degradácii mRNA, ale len k inhibícii proteosyntézy. V našich pokusoch sme používali synteticky pripravenú miRNA, ktorú pripravila firma UniQure (Obr. 3).

Predklinická štúdia z roku 2016 v Liběchove

Ešte pred začatím pokusu, sme museli z potenciálnych pokusných zvierat odobrať krv a zistiť titer protilátok proti Adenoasociovaným vírusom (AAV) (ide o neobalené, ssDNA vírusy, ktoré patria do čeľade *Parvoviridae*, sú malé (20µm), replikačne defektné), aby sme určili, ktoré zviera môže byť použité, a ktoré sa do pokusu nehodí. Titer protilátok bol stanovený vo firme UniQure. S výsledkov sme určili 24 vhodných zvierat (12 TgHD a 12WT). Tie sme napokon rozdelili do 8 skupín podľa tabuľky (Tab. 1).

V intervaloch v dňoch -14, -7, pred aplikáciou, deň 0 – čas aplikácie vírusu, 7, 14, 28, 56 a 84 dní po apli-



Obr. 3: Umelo pripravený vektor firmou Uniqure a jeho pôsobenie (upravené podľa Evers et al.2018)

kácii sme zvieratám odoberali krv a cerebrospinálna tekutina –CSF. Z krvi sme robili hematologické vyšetrenie, aby sa zistilo, či v tele neprebíha zápal. Taktiež sme krv spracovávali na plazmu a sérum. Z nich sa potom zisťovala koncentrácia cytokíninóv a mHTt.

Priebeh operácie

Deň 0 – aplikácia vírusu. Najprv sme zviera uspali pomocou pripravenej uspávacej zmesi TKX (Tiletamin 4 mg/kg, Zolazepam 4 mg/kg (Zoletil 100, Virbac), Ketamin 5 mg/kg (Narketan 10, Chassot) and Xylazin 1 mg/kg (Rometar 2%, Spofa)). Následne sme im odoberali krv a CSF. Potom sme zviera zaintubovali, zaviedli intravenóznou kanylou a pripojili ho na anesteziálny stroj. Ako anestetikum bol použitý Isofluran. Hlava zvieraťa bola fixovaná pomocou stereotaxického zariadenia. Po obnažení lebky sme vyhľadali bregmu (miesto, kde sa na lebke stretávajú šípový (lat. *sutura sagittalis*) a vencový šev (lat. *sutura coronalis*)), podľa ktorej sa potom určili koordináty putamenu a thalamu. Kraniotómia sa vykonala pomocou oscilačnej píly, neurochirurgického kladivka a dlátka. AAV5 vektory ako aj PBS/Sucrosa boli aplikované s 500 µl Hamilton striekačkou s 34G NanoFil ihlou (World Precision In-

struments; NF34BV) za pomoci injekčného robota (Neurostar, Germany) (Obr. 4). Kraniotómia bola uzatvorená kostným štepom a cementom a následným zašitím kože. Boli podané peroperačné, ako aj pooperačné antibiotiká (Cefazolin) a analgetikum (Flunixin). Na 84 deň po aplikácii vektoru a odoberaní vzoriek krvi a CSF sa zviera uspalo pomocou zmesi TKX, následne zabilo a prepláchnulo pomocou 20 l PBS vychladeného na 4 °C. Z prepláchnutého zvieraťa sa zobrali vzorky obličiek, nadobličiek, sleziny (5x5x5mm), mozgu z ktorého boli konkrétne odoberaté punche striata, cortexu a thalamu.



Obr. 4: Aplikácia vektoru pomocou 500 µl Hamilton striekačkou s 34G NanoFil ihlou (World Precision Instruments; NF34BV) za pomoci injekčného robota (Neurostar, Germany).

Tabuľka I: Rozdelenie zvierat do skupín

Group	N	AAV	Delivery route	Dose	Genotype
I	3	AAV5-CAG-GFP	CED/P+T	1e13 gc total	HCH
II	3	AAV5-CAG-GFP	CED/P+T	1e13 gc total	zdravý
III	3	AAV5-CAG-miHTT	CED/P+T	3e13 gc total	HCH
IV	3	AAV5-CAG-miHTT	CED/P+T	3e13 gc total	zdravý
V	3	AAV5-CAG-miHTT	CED/P+T	1e13 gc total	HCH
VI	3	AAV5-CAG-miHTT	CED/P+T	1e13 gc total	zdravý
VII	3	PBS/Sucrose	CED/P+T	–	HCH
VIII	3	PBS/Sucrose	CED/P+T	–	zdravý

CED, convection enhanced diffusion; P – putamen; T, thalamus

Výsledky

Intrastriálna a intrathalamická bilaterálna aplikácia konštruktu AAV5-CAG-miHtt (3×10^{13} / 1×10^{13} gc total) ako aj konštruktu AAV5-CAG-GFP a PBS/sucrosa (54 μ l/216 μ l) nespôsobila neurologický deficit u TgHD zvierat ani u ich WT súrodencoch. Telesná hmotnosť po 84 dňoch od aplikácie sa nijak výrazne nezmenila, dokonca u väčšiny zvierat mierne zrástla, pri normálnej spotrebe krmiva. Pri hematologických vyšetreniach v čase pred aplikáciou konštruktu a PBS/SACHAROSY nebol zistený výrazný rozdiel v percentuálnom zastúpení neutrofilov a lymfocytov medzi TgHD a WT zvieratami. Po expresii vektorovej DNA a miHTT sa následne demonštrovalo zníženie ľudského mutantného HTT. Obe koncentrácie AAV5-miHTT viedli k významnému zníženiu expresie mutantnej HTT mRNA v nucleus caudatus a thalame. Navyše vysoká koncentrácia 3×10^{15} gc AAV5-miHTT viedla k významnej redukcii mutantnej HTT mRNA a mutantného proteínu Htt v putamene a v kôre¹¹.

Predklinická štúdia z roku 2017 v Liběchove

Ešte pred začatím pokusu, sme museli z potenciálnych pokusných zvierat odobrať krv a zistili titer protilátok proti AAV vírusom, aby sme určili, ktoré zviera môže byť použité, a ktoré sa do pokusu nehodí. Titer protilátok bol stanovený vo firme UniQure. S výsledkov sme určili 16 TgHD zvierat. V intervaloch v dňoch -14, pred aplikáciou, deň 0 – čas aplikácie vírusu 14, 28, 84 dní, 1/2 roka, 3/4 roka, 1 rok, 1 1/4 roka, 1 1/2 roka, 1 3/4 roka po aplikácii sme zvieratám odoberali krv a CSF a naďalej každý štvrtok odoberáme až do času 5 rokov po aplikácii. Z krvi sme robili hematologické vyšetrenie, aby sa zistilo, či v tele neprebíha zápal. Taktiež sme krv spracovávali na plazmu a sérum. Z nich sa potom zisťovala koncentrácia cytokinínov a mHTT.

Priebeh operácie

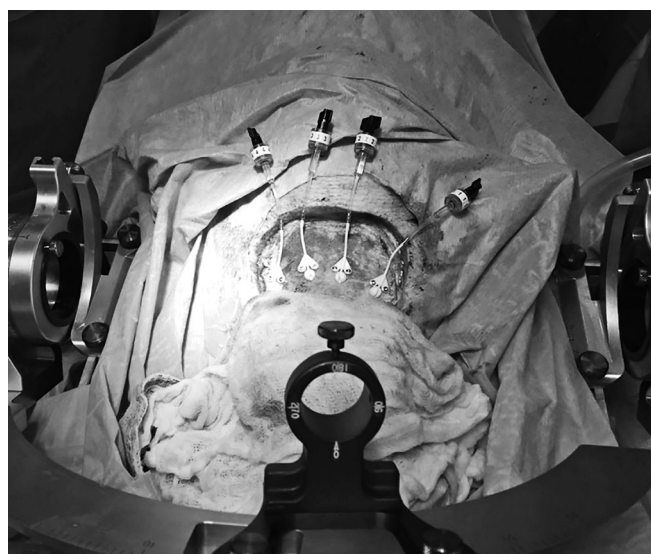
Deň 0 – aplikácia vírusu. Najprv sme zviera uspali pomocou pripravenej uspávacej zmesi TKX (Tiletamin 4 mg/kg, Zolazepam 4 mg/kg (Zoletil 100, Virbac), Keta-



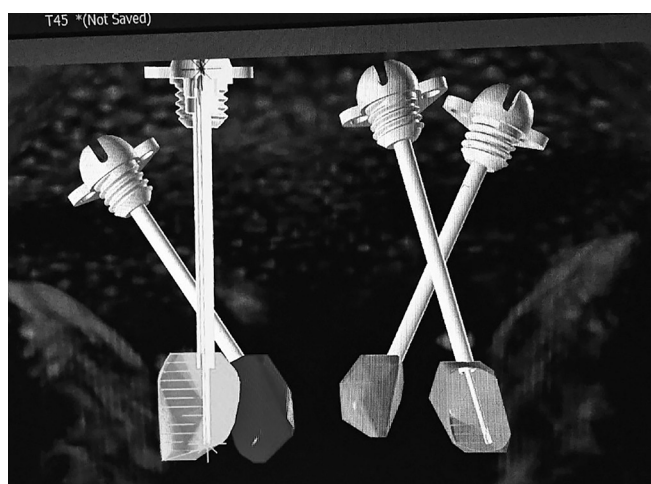
Obr. 5: Aplikácia vektoru pod kontrolou MRI



Obr. 6: Navrtanie dier a zavedenie kanálov podľa presne určených koordinátov



Obr. 7: Zavedené kanály tesne pred aplikáciou vektoru



Obr. 8: Počítačové vyobrazenie koordinátov so zavedením kanálov na aplikáciu

min 5 mg/kg (Narketan 10, Chassot) and Xylazin 1 mg/kg (Rometar 2 %, Spofa)). Potom sme zviera zaintubovali, zaviedli intravenóznou kanylou. Následne sme zviera zafixovali do stereotaxického zariadenia poskytnutého Anglickou firmou Renishaw a pripojili ho na anesteziáč-

ný stroj. Ako anestetikum bol použitý Isofluran. Zviera so zafixovanou hlavou putovalo do magnetickej rezonancie (MRI zariadenia), kde sa určili presné koordináty Nucleus Caudatus a Putamenu. Na operačnom sále boli podľa súradníc vyvrtané diery do týchto štruktúr a zavedené kanály na depozíciu vektoru. Všetkým zvieratám bol podaný rovnaký vektor s rovnakou koncentráciou AMT 130 1,2 e 13 gc tototal. Aplikácia vektoru prebiehala pod neustálou kontrolou MRI (Obr. 5 – 9).



Obr. 9: Prasatá po prebudení z anestéziie po operácie – čulé, bez žiadnych pooperačných problémov

Táto štúdia ma zistiť ako dlho účinkuje vektor. Prvá várka zvierat bola zabitá v 1/2018 po pol roku od aplikácie. Druhá várka zvierat bola zabitá v 7/2018 – zabíja-

nie po roku od aplikácie. Posledná várka bude zabitá približne po 5 rokoch od aplikácie vektoru.

Výsledky

Bilaterálna aplikácia konštruktu AMT 130 1,2 e 13 gc tototal do nucleus caudatus a putamenu nespôsobila neurologický deficit u TgHD zvierat. Prasatá, keďže boli operované v nízkom veku pri pravidelnom vážení stále nabierajú na váhe. Krvné výsledky nepoukazujú na žiadne zápalové procesy. Hematologické ako aj biochemické výsledky krvi sú v norme. Hneď po troch mesiacoch je demonštrované zníženie ľudského mutantného HTT, ktoré pretrváva aj po roku, a následne sa bude zisťovať jeho pretrvávanie v ďalších časových úsekoch.

Záver

Tento článok popisuje predklinické testy terapie Huntingtonovej choroby u TgHD miniprasiat v Liběchove. Na základe tejto predklinickej štúdie formulovala firma UniQure žiadosť k Food and Drug Administration, ktorá bola pozitívne odsúhlasená pre prvú a druhú fázu klinickej štúdie. Táto efektívna spolupráca Centra PIGMOD a holandskou firmou Uniqure prináša novú nádej na ciele liečenie závažného neurodegeneratívneho ochorenia – Huntingtonovej choroby

Podakovanie

Táto práca vznikla za finančnej podpory Národného programu udržiteľnosti MŠMT LO 1609.

Literatura

1. Available at: http://www.csn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/huntingtonova-nemoc-33804?confirm_rules=1. Accessed April 16, 2019.
2. Baxa M, Hruska-Plochan M, Juhas S, et al.: *J. Huntingtons., DiS.* 2, 47 (2013).
3. Nejepinska J, Flemr M, Svoboda P: In: *Regulatory RNAs*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 111–149.
4. Robb GB, Brown KM, Khurana J, et al.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 133 (2005).
5. Jaskiewicz L, Filipowicz W: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 320, 77 (2008).
6. Carthew RW, Sontheimer EJ: *Cell* 136, 642 (2009).
7. Lu M, Zhang Q, Deng M, et al.: *PLoS One* 3, e3420 (2008).
8. Lee Y, Kim M, Han J, et al.: *EMBO J.* 23, 4051 (2004).
9. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR: *RNA* 10, 1957 (2004).
10. Lee Y, Ahn C, Han J, et al.: *Nature* 425, 415 (2003).
11. Evers MM, Miniarikova J, Juhas S, et al.: *Mol Ther.* 26(9), 2163 (2018).

Súhrn

Levinská B.: Génová terapia Huntingtonovej choroby (HCH) uskutočnená na TgHD miniprasatách v Liběchove s Holandskou firmou UniQure – predklinické štúdie

Prevalencia HCH u ľudí je približne 5 chorých na 100000. Táto choroba stále patrí k nevyliciteľným chorobám a pacienti netrpezlivo očakávajú každú novú správu o napredovaní novej liečby. Veľká nádej sa vkladá do génovej terapie. Výsledky našej štúdie dávajú pozitívne správy. Na základe týchto výsledkov Holandská firma UniQure podala návrh klinickej štúdie na FDA (food and drug administration) a táto organizácia jej klinickú štúdiu schválila.

Kľúčové slová: Huntingtonova choroba HCH, génová terapia, RNAinterferencia

Summary

Levinská B.: Gene Therapy of Huntington's Disease (HCH) conducted at TgHD minipigs in Libechov with the Dutch company UniQure – preclinical studies

The prevalence of Huntington's disease (HD) is approximately 5 patients per 100,000 people. HD is still an incurable disease and patients are eagerly awaiting for any new treatment progress reports. Great hope is put into gene therapy. Our preclinical study of AAV5-miHTT lowering using transgenic minipigs for HD brought positive results. Based on these results, the Dutch company UniQure submitted a clinical study proposal to the FDA (Food and Drug Administration), which was positively proved for the first and second phase of the clinical trial.

Keywords: Huntington's disease HCH, gene therapy, RNAinterference

PŘIROZENÉ PROTEINOVÉ INHIBITORY PROTEOLYTICKÝCH ENZYMŮ

Michal Buša

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

Úvod

Proteasy, enzymy katalyzující hydrolytické štěpení peptidové vazby, jsou přítomny ve všech organismech a tvoří 2 až 4 % všech přepisovaných genů. Tato skupina hydrolytických enzymů zahrnuje jak enzymy nespecifické s širokou substrátovou specifitou (podílející se např. na odbourávání proteinů či trávení), tak enzymy vysoce specifické štěpící pouze jeden konkrétní protein (např. enzymy zajišťující aktivaci proteinových prekurzorů či srážení krve). Proteasy lze rozdělit do tříd podle katalytického mechanismu (proteasy cysteinové, serinové, threoninové, aspartátové, glutamátové a metaloproteasy), dle umístění štěpené peptidové vazby (endoproteasy, exoproteasy) nebo do rodin a klanů dle struktury a sekvenční homologie, jak je klasifikuje databáze MEROPS 1. Rodiny obsahují proteasy, které vykazují evoluční a sekvenční příbuznost. Klany jsou skupiny proteas, které mají podobné terciární struktury. V současné době je v databázi evidováno 1137158 sekvencí proteas, rozříděných do 64 klanů a 273 rodin. Hydrolyza peptidové vazby je děj prakticky nevratný a činnost proteas je v organismech velmi přísně regulována prostřednictvím teploty, pH, buněčné kompartmentace a produkce proteas ve formě neaktivních zymogenů. Další formu regulace proteolýzy představují inhibitory, ty mohou být buď nízkomolekulární (AEBSF, EDTA), peptidové (E-64, pepstatin) nebo proteinové. Přirozeně se vyskytující inhibitory jsou především peptidové a proteinové povahy, těmi se bude zabývat tento příspěvek. Proteinové proteasové inhibitory (PI) jsou využívány všemi živými organismy jako regulátory biologických procesů nebo jako ochranné proteiny. Mezi jimi kontrolované děje patří kupříkladu buněčný cyklus, apoptóza, či koagulace krve. Selhání regulace těchto procesů je příčinou mnoha patologií, např. rozedma plic, Nethertonův syndrom, dědičný angioedém či poruchy srážení krve²⁻⁴. Ochranná role PI spočívá v inaktivaci proteas uniklých ze svých přirozených rezervoárů nebo proteas patogenů, které jsou využívány k migraci tkáněmi hostitele či pro trávení hostitelských proteinů. U rostlin je produkce PI jako odpověď na poranění škůdce nebo patogenem jedním z nejdůležitějších obranných mechanismů^{5,6}.

Tento přehledový článek je zaměřen na popis rozličných biologických funkcí, které PI plní v různých organismech a okrajově i na jejich roli v lidské medicíně. Dále je prostor věnován popisu různých mechanismů interakce PI s proteasami, jejich klasifikaci a evoluci.

Klasifikace proteinových inhibitorů proteas

Poměrnému zastoupení proteas proporcionálně odpovídá počet jejich inhibitorů. Nejvíce je tedy inhibitorů nejrozšířenějších tříd proteas, kterými jsou proteasy serinové a cysteinové, a nejméně inhibitorů je známo pro aspartátové proteasy a metaloproteasy. V součas-

né době nejsou známy přirozené PI threoninových a glutamátových proteas. PI lze rozdělit dle mechanismu využívaného k inaktivaci cílových proteas na kovalentní a nekovalentní nebo, podobně jako proteasy v databázi MEROPS, dle homologie aminokyselinové sekvence. Databáze MEROPS vznikla roku 1993 s cílem klasifikovat proteasy, v roce 2004 byla rozšířena o klasifikaci proteinových inhibitorů. V současné době databáze eviduje 129703 sekvencí katalogizovaných do 38 klanů a 83 rodin. Stejně jako u proteas je základní jednotkou rodina, tedy skupina proteinů s příbuznou primární aminokyselinovou sekvencí. V případě výrazné divergence aminokyselinové sekvence uvnitř jedné rodiny se používá nižší jednotka – podrodina. Je evidentní, že mnoho rodin sdílí společné předky s dalšími rodinami, nicméně jednotlivé rodiny divergovaly tak, že jejich příbuznost již nemůže být prokázána pomocí homologie primární sekvence. Tyto skupiny rodin, které sdílí jediný ancestrální protein, se nazývají klany a vytvářejí se především na základě analýzy terciární struktury proteinů⁷.

Biologické funkce vybraných rodin proteasových inhibitorů

Prvotní úlohou PI je především regulovat proteolytické děje v organismu a chránit před nekontrolovanou aktivitou jak vlastních proteas, tak exogenních proteas jiných organismů. Během evoluce ovšem PI získaly i mnoho dalších funkcí. Následuje přehled nejvýznamnějších rodin PI s příklady jejich biologických funkcí nebo medicínského využití. Stručnou charakteristiku popisovaných rodin PI najdete v Tab. I.

Rodiny inhibitorů jsou uvedeny podle kódu a názvu, který je v některých případech odvozen ze jména typického zástupce; zkratky inhibitorů: BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor), CTLA (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein), PI3 (pepsin inhibitor 3), AI3 (protease A inhibitor 3), TIMP (tissue inhibitor of metalloproteases), α 2M (α -2-macroglobulin). Rodiny inhibovaných cílových proteas jsou uvedeny kódem inhibované rodiny proteas dle databáze MEROPS (např. S1 – serinové proteasy rodiny chymotrypsinu; C1 – cysteinové proteasy rodiny papainu); hvězdička označuje hlavní inhibované rodiny proteas. NK – nekovalentní inhibitory, K – kovalentní inhibitory, AS – aktivní místo, ES – exomísto. Molekulová hmotnost je uvedena pro typickou inhibiční doménu; některé rodiny obsahují také multidoménné inhibitory složené z několika domén, které vznikly genovou duplikací a v tabulce jsou označeny zkratkou MDI.

Rodina Kazal (I1) obsahuje multidoménné inhibitory serinových proteas, rozšířené ve všech organismech kromě hub a virů, sloužících především jako ochrana tkání proti předčasné aktivaci trávicích proteas. Např. lidský inhibitor SPINK1 (serine protease inhibitor Kazal-type 1) slouží jako ochrana tkání slinivky před předčasnou aktivací trypsinogenu, váže se ale i na receptor pro epidermální růstový faktor a hraje

roli v některých druzích rakoviny⁸. Obecně jsou Kazal PI využívány jako antikoagulanty, regulátory autofagie, jako ochrana proti hostitelským proteasám či proteasám patogenů, nicméně většina těchto PI nebyla dosud detailně studována⁹.

Kunitz-BPTI (I2) jsou inhibitory serinových proteas. Pojmenovány jsou podle BPTI (basic pancreatic trypsin inhibitor) potentního inhibitoru koagulačních proteas, který dále inhibuje NO-syntasy a draslíkové iontové kanály¹⁰. Jedná se o velmi stabilní protein, jeho 3D struktura byla vyřešena jako jedna z prvních již v roce 1974¹¹ a tvoří templát pro navrhování nových umělých inhibitorů¹². Primární fyziologickou úlohou je opět ochrana tkání slinivky. Tento protein je klinicky používán jako antifibrinolytikum při operacích s očekávanou velkou ztrátou krve¹³. Ostatní PI z této rodiny hrají roli v regulaci buněčného cyklu či apoptóze a jsou zkoumány jako potenciální protirakovinná léčiva¹⁴. Díky schopnosti inhibovat trypsin, chymotrypsin a iontové kanály tvoří aktivní složku mnoha hadích jedů^{15, 16}.

Rodina Kunitz-P (I3) zahrnuje rostlinné jedno- a dvouhlavé inhibitory původně serinových proteas. V průběhu evoluce byla inhibiční specifita těchto PI rozšířena i na proteasy aspartátové a cysteinové. Jejich biologickou funkcí je především blokování trávicích proteas herbivorního hmyzu a patogenů. Proteiny rodiny Kunitz-P dále hrají roli v různých rostlinných signálních kaskádách, v odpovědi na stres nebo mají zásobní funkci v semenech a v hlízách¹⁷. Značná pozornost je věnována využití v transgenních rostlinách (zvýšení odolnosti rostlin vůči škůdcům) či v lidské medicíně, kde byla prokázána protinádorová aktivita *in vitro*^{18, 19}.

Rodina ekotinů (I11) je tvořena nepříliš studovanými PI s jedinečným mechanismem. Jsou tvořeny beta-barelem a dvěma krátkými helixy a nacházejí se výhradně v periplazmě bakterií. Jedná se o velmi silné inhibitory serinových proteas z rodiny S1, které slouží

nejspíše jako obranné proteiny proti serinovým hostitelským proteasám, nejdůležitější inhibovanou proteasou je neutrofilní elastasa produkovaná neutrofilními granulocyty^{20, 21}.

Rodina Bowman-Birk (I12) je podobně jako rodina Kunitz-P tvořena jednohlavými a dvouhlavými inhibitory serinových proteas. I jejich funkce je shodná, tedy fungují jako ochranné proteiny rostlin blokující trávicí proteasy hmyzu a patogenů. Jejich základní struktura, tři antiparalelní řetězce spojené pěti disulfidy, je velmi rigidní a slouží jako templát pro racionální navrhování nových inhibitorů. Bylo prokázáno, že pouhá záměna jedné aminokyseliny je zodpovědná za ztrátu schopnosti inhibovat trypsin a získání schopnosti inhibovat chymotrypsin²². V současnosti se věnuje pozornost jejich využití v transgenních rostlinách a v lidské medicíně, kde je několik inhibitorů v onkologických klinických studiích^{23, 24}.

Nejúčinnějšími inhibitory (s parametrem $K_i = 10^{-11}$ M pro thrombin) serinových proteas jsou malé PI z rodiny hirudinů (I14). Jsou tvořeny N-koncovou globulární doménou, zpevněnou třemi disulfidickými můstky a nestrukturovanou C-koncovou doménou. Výjimečná potence hirudinů je důsledek kombinace interakcí N-domény hirudinů s AS proteasy a C-domény hirudinů s ES proteasy. Hirudin je pojmenován dle pijavky lékařské (*Hirudo medicinalis*), které slouží jako silný antikoagulant zabraňující vytvoření krevní sraženiny a umožňuje jí dlouhodobější sání krve. V klinické praxi se využívá jak samotný hirudin, tak jeho fragmenty (hirugen, bivalirudin)²⁵⁻²⁷.

Nejrozšířenějšími inhibitory cysteinových proteas jsou cystatiny (I25), které inhibují především proteasy z rodiny papainu, vzácněji i z rodiny legumainu. Cystatiny lze rozdělit na tři podrodiny – stefiny, pravé cystatiny a kininogeny, přičemž všechny mají v organismech ochrannou funkci⁷. Intracelulární stefiny chrání buňky před katepsinovými proteasami uniklými ze svých přirozených

Tab. I: Vybrané rodiny proteasových inhibitorů proteinového charakteru

Rodina PI	Cílové proteázy	Mechanismus	Mol. Hmotnost	Výskyt						
				Houby	Viry	Archea	Bakterie	Prvoci	Rostliny	Živočichové
I1 Kazal	S1*, S8*	NK, vazba do AS	6 kDa, MDI			X	X	X	X	X
I2 Kunitz-BPTI	S1*, C1, M14	NK, vazba do AS	11 kDa, MDI		X		X	X	X	X
I3 Kunitz-P	S1*, S8, A1, C1	NK, vazba do AS	18–22 kDa				X		X	
I4 serpin	S1*, S8, C1, C14	K, distorze AS	35-50 kDa	X	X	X	X	X	X	X
I11 ekotin	S1*	NK, vazba do AS a ES	16 kDa				X	X		X
I12 Bowman-Birk	S1*, S3	NK, vazba do AS	8 kDa, MDI						X	X
I14 hirudin	S1*	NK, vazba do AS a ES	7 kDa							X
I25 cystatin	C1*, C2, C13, S8, M12	NK, vazba do AS	11-13 kDa, MDI		X		X	X	X	X
I27 kalpastatin	C2*	NK, vazba do AS a ES	17-85 kDa, MDI						X	X
I29 CTLA	C1*	NK, vazba do AS	10 kDa		X		X	X	X	X
I33 PI3	A1*	NK, vazba do AS	17 kDa							X
I34 IA3	A1*	NK, vazba do AS	8 kDa	X						
I35 TIMP	M10*, M12	NK, vazba do AS	21-28 kDa, MDI			X				X
I39 α2M	nespecifické	K, molekulární klec	360 kDa			X	X		X	X

reservoárů lyzozomů. Extracelulární cystatiny a kininogeny inhibují cysteinové proteasy v tělních tekutinách. V medicíně je nejvýznamnějším zástupcem cystatin C, který je využíván jako marker pro činnost ledvin a jeho mutovaná varianta dimerizuje v nerozpustné amyloidní plaky a způsobuje amyloidovou angiopatii islandského typu²⁸. Při rakovinném bujení dochází ke změně hladin jednotlivých cystatinů v tělních tekutinách, uvažuje se tak o jejich možném využití jako rakovinových markerů či jako účinných látek v biologické léčbě nádorů²⁹. Parazité využívají cystatiny k omezení krevního srážení, k modulaci imunitního systému hostitele či k ochraně před hostitelskými proteasami^{30, 31}. U rostlin hrají cystatiny důležitou roli v biotickém a abiotickém stresu, v klíčení semen a v ochraně před proteasami patogenů³².

Kalpstatiny (I27) jsou inhibitory cysteinových proteas z rodiny kalpainu. Jde o vícehlavé inhibitory bez sekundární struktury, kterou získávají až po navázání na proteasu. Jsou tvořeny čtyřmi krátkými alfa-helixy spojenými dlouhými nestrukturovanými úseky. Dva alfa-helixy blokují aktivní místo (AS), další interagují s exomístem (ES) na opačném konci proteasy kalpainu (viz obr. 1, panel F)³³. Mezi procesy regulovanými kalpstatiny patří například růst nervových buněk, udržování homeostáze či apoptóza³⁴.

Inhibitory z rodiny CTLA (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein, I29) jsou příbuzné propeptidům cysteinových proteas z rodiny papainu. Propeptidy jsou součástí neaktivních zymogenů proteas, kde blokují jejich AS a regulují tak jejich aktivitu. Proteasy jsou aktivovány odštěpením propeptidu, k čemuž dochází nejčastěji vlivem kyselého pH nebo působením jiné proteasy³⁵. Inhibitory rodiny CTLA vznikly nejspíše genovou duplikací a jsou účinnými inhibitory cysteinových katepsinů. Jejich úloha v organismu není zcela jasná, zřejmě se účastní embryonálního vývoje, apoptózy či buněčné signalizace³⁶.

Inhibitorů metaloproteas se vyvinulo pouze několik málo rodin, nejvýznamnější jsou TIMP – tkáňové inhibitory metaloproteas (I35). Tyto jednohlavé inhibitory kontrolují činnost metaloproteas obsažených v extracelulární matrix, důležitých především při remodelaci tkáně a hojení ran³⁷. Jsou pojmenovány podle prvního charakterizovaného zástupce TIMP-1, s inhibiční N-koncovou doménou a C-koncovou doménou zodpovědnou za vazbu na různé proteiny a receptory (např. CD63, LRP1, CD82). Biologická úloha TIMP-1 inhibitorů je díky velkému množství inhibovaných metaloproteas a interakčních proteinů velmi složitá, nicméně jejich role v rakovinném bujení a proliferaci je nezpochybnitelná a je intenzivně studována³⁸⁻⁴⁰.

Inhibitory aspartátových proteas jsou v přírodě vzácné, známé jsou pouze dvě rodiny těchto inhibitorů označované IA3 (I34) a PI3 (I33). PI z rodiny IA3 jsou jednodoménové a vyskytují se pouze u hub. Inhibují kvasinkovou proteasu A - nejdůležitější enzym vakuolárního degradačního systému. Proteiny rodiny IA3 jsou podobně jako kalpstatiny nestrukturované, do alfa-helixy se skládají až při interakci s AS proteasy^{41, 42}. Jednodoménové inhibitory z rodiny PI3 nazývané aspiny se vyskytují pouze u živočichů. Nejznámějším je PI ze škrkavky dětské, který inhibuje trávicí aspartátové proteasy (např. pepsin, gastricin), a tím nejspíše zajišťuje vajíčkům parazita bezpečný průchod žaludkem

hostitele. Jsou velmi silnými alergeny a jejich další funkce zůstávají neznámé⁴³.

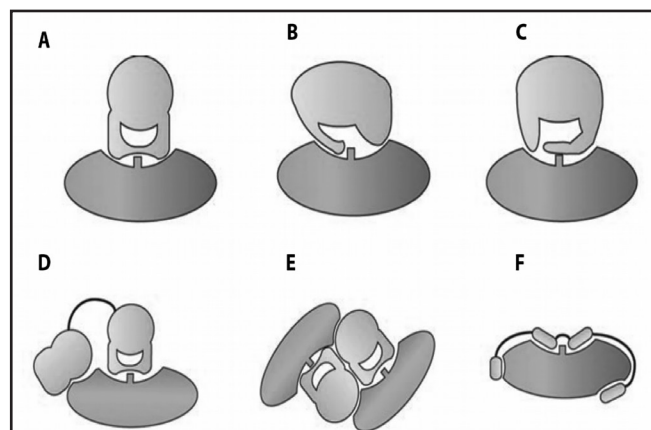
Velmi rozšířenými inhibitory jsou zástupci rodiny I39 – α 2-makroglobuliny (α 2M), které u člověka tvoří až 3 % veškerých plazmatických proteinů. Jsou to širokospektré PI fungující ve formě monomerů i dimerů; inhibují proteasy všech katalytických typů s výjimkou proteas příliš velkých či příliš specifických⁴⁴. Jejich unikátní mechanismus je detailněji popsán v následující kapitole. Fyziologicky slouží především jako inhibitory trombinu, kallikreinu a plasminu. Molekuly α 2M jsou po zachycení proteas rozpoznány receptory a odstraněny z plazmy. U lidského α 2M byla popsána i interakce s různými růstovými faktory a spekuluje se o roli v degenerativních onemocněních. Díky sekvenční homologii s proteiny komplementu a široké specifitě existují teorie, že α 2M představují součást prvotního imunitního systému^{45, 46}.

Principy inhibice proteas proteinovými inhibitory

Jak již bylo uvedeno výše, PI lze na základě jejich inhibičního mechanismu dělit do dvou skupin – inhibitory kovalentní a nekovalentní. Kovalentní inhibitory reagují s katalytickým zbytkem proteasy za vzniku ireversibilního, velmi pevného, kovalentního komplexu. Druhým, mnohem častějším mechanismem, je tvorba nekovalentního komplexu s proteasou pouze pomocí nekovalentních interakcí. Za stabilitu inhibičních komplexů je v tomto případě odpovědný velký počet slabších interakcí, které skládají komplexní prostorovou síť.

Mechanismy interakce nekovalentních proteasových inhibitorů

Nekovalentní PI tvoří s cílovou proteasou komplex pomocí sady interakcí nekovalentního charakteru zahrnující elektrostatické interakce, vodíkové můstky a hydrofobní interakce⁴⁷. Společným rysem nekovalentních proteinových inhibitorů je vazba do AS proteasy. Schematické náčrty nejrozšířenějších mechanismů nekovalentních inhibitorů jsou znázorněny na obr. č. 1. Proteasy mají v rámci jedné rodiny AS uspořádané podobně, inhibitory blokující AS jsou tedy obvykle schopny inhibovat několik příbuzných proteas. Vyšší specifitu PI získávají díky vazbě do dalšího interakčního regionu na molekule proteasy – tzv. exomísta⁴⁸.



Obr. 1: Mechanismy inhibice proteas nekovalentními inhibitory

Schematické znázornění stavby hlavních typů komplexů proteas s inhibitory. Proteasa jako modrá globulární doména obsahuje aktivní místo (prohlubeň s vyčnívajícím katalytickým zbytkem) a případně také exomísto (prohlubeň bez katalytického zbytku). Inhibitor je znázorněn žlutou globulární doménou (nebo více doménami, které jsou spojeny černou flexibilní spojkou). A – inhibice serinové proteasy inhibitory z rodin Kazal, Kunitz a Birk-Bowman, B – inhibice cysteinové proteasy cystatinem, C – inhibice metaloproteasy inhibitorem TIMP, D – inhibice serinové proteasy hirudinem, E – inhibice serinové proteasy ekotinem, F – inhibice cysteinové proteasy kalpastatinem, upraveno dle⁴⁷.

Prvním popsáním mechanismem nekovalentních inhibitorů byl mechanismus rodin Kazal, Kunitz a Birk-Bowman a je označován jako standardní (kanonický či Laskovského⁴⁹). Tyto PI disponují interakční smyčkou, která je svou strukturou komplementární k AS proteasy, do něhož se váže, viz obr. 1, panel A. Jelikož aminokyselinový řetězec smyčky inhibitoru se v AS nachází ve stejné orientaci jako řetězec substrátu, může docházet k velmi pomalému štěpení peptidové vazby v inhibitoru stejně jako v případě substrátu. Ovšem komplex PI-proteasa se po rozštěpení vazby nerozpadá, ale je dále držen pevnými nekovalentními interakcemi. Jsou publikovány práce dokazující i opětovnou ligaci rozštěpené peptidové vazby, která je katalyzovaná cílovou proteasou^{47, 50}.

Odlisný mechanismus využívají cystatiny, které do AS proteasy vkládají tři oddělené segmenty, N-konec inhibitoru a dvě smyčky, viz obr. 1, panel B. Tyto segmenty zajišťují cystatinům dostatečný počet interakcí pro specifickou inhibici cysteinových proteas. Navíc v blízkém okolí katalytického cysteinu není umístěna žádná peptidová vazba inhibitoru, tedy nedochází ke štěpení cystatinů jejich cílovými proteasami⁵¹. Velmi podobný princip využívá i rodina TIMP (viz obr. 1, panel C), kdy inhibitory této rodiny vkládají N-konec a jednu reaktivní smyčku do AS metaloproteasy, kde zároveň koordinují katalytický ion Zn^{2+} a vytlačují molekuly vody z jeho blízkosti, čímž efektivně proteasu inhibují³⁷.

Mnoho proteas využívá mimo vazby do AS i vazbu do vzdáleného ES umístěného na povrchu proteasy. Vazba do ES zvětšuje interakční povrch a zvyšuje počet protein-proteinových interakcí s výrazným efektem na specifitu a afinitu inhibitoru⁴⁷. Například hirudin z pijavice lékařské je nejsilnějším a nejspecifičtějším známým inhibitorem trombinu. Jeho malá N-koncová globulární doména se váže do AS trombinu, zatímco rozvolněný C-konec interaguje s ES proteasy vzdáleném 35 Å daleko na opačné straně molekuly (viz obr. 1, panel D). Výjimečná stabilita komplexu je zajištěna celkem 10 iontovými páry a 23 vodíkovými vazbami^{48,27}.

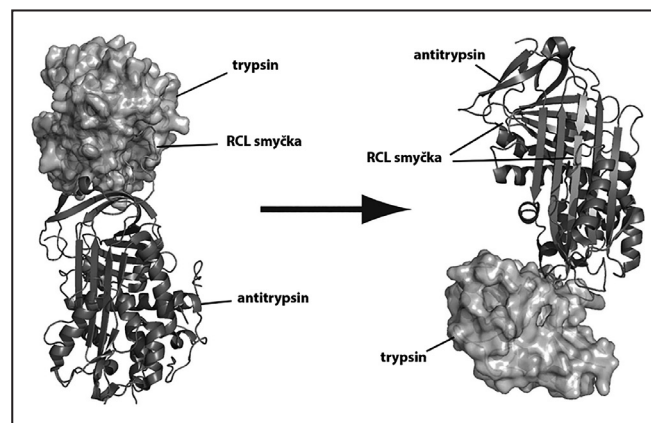
Další unikátní mechanismus využívá rodina ekotinu. Tyto PI vytvářejí dimer, jehož reaktivní smyčky jsou na protilehlých koncích dimeru a který je schopný vázat dvě molekuly proteasy současně (viz obr. 1, panel E). Každá molekula ekotinu přitom najednou interaguje s AS jedné molekuly proteasy a s ES druhé molekuly proteasy.⁵²

Mechanismy interakce kovalentních proteasových inhibitorů

Mezi inhibitory vytvářející s cílovou proteasou kovalentní komplex patří zástupci pouze tří rodin nazývané

serpiny, $\alpha 2$ -makroglobuliny a inhibitory kaspas z rodiny p35.

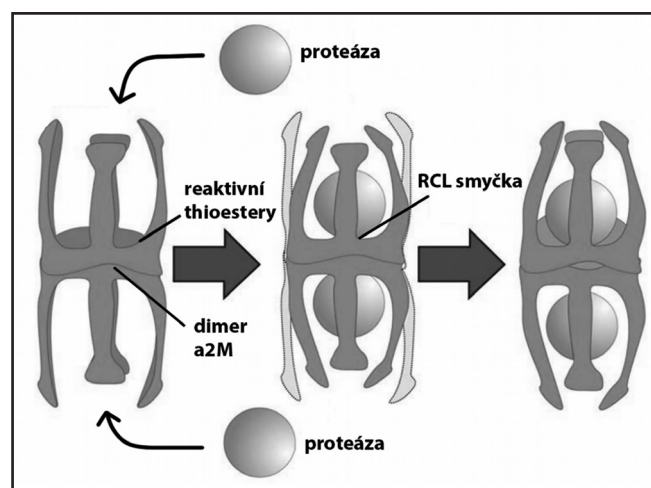
Princip inhibice serpinů, tzv. „sebevražedných inhibitorů“, je podobný pasti na myši. Serpiny obsahují reaktivní centrální smyčku RCL (reactive center loop), která je prezentována protease jako substrát. Po rozštěpení peptidové vazby katalyzovaném proteasou je N-terminální část RCL inkorporována do centrálního beta-skládaného listu v molekule inhibitoru. To je doprovázeno výraznou konformační změnou, při které je proteasa přemístěna na opačnou stranu molekuly inhibitoru a díky sterické kolizi s rigidní stavbou serpinu dochází k deformaci AS proteasy (Obr. 2). Kovalentní komplex serpin-proteasa je stabilní a katalyticky neaktivní⁴⁷.



Obr. 2: Inhibiční mechanismus serpinů

Schematické znázornění inhibice serinové proteasy (trypsin, zobrazen jako šedý povrch) inhibitorem z rodiny serpinů (antitrypsin, zobrazen jako fialový stužkový model). Vlevo: situace před rozštěpením RCL smyčky (zeleně) serpinu; vpravo: po rozštěpení se RCL smyčka stala součástí struktury beta-skládaného listu v molekule serpinu, přičemž kovalentně navázaná proteasa se přesunula na opačnou stranu inhibitoru, AS proteasy je deformováno a proteasa je neaktivní; upraveno dle⁴⁷.

Inhibitory z rodiny $\alpha 2$ -makroglobulinů ($\alpha 2M$) jsou velké proteiny schopné uvěznit ve své vnitřní kavitě další proteiny. Podobně jako serpiny i $\alpha 2M$ obsahují reaktivní smyčku jako „návnadu“, jejíž rozštěpení spouští výraznou změnu architektury inhibitoru (Obr. 3). Přitom



Obr. 3: Inhibiční mechanismus alfa-2-makroglobulinů

dochází k odhalení reaktivních thioesterů z hydrofobního jádra inhibitoru, které kovalentně vážou lysinové zbytky na povrchu proteasy. Zároveň je molekula $\alpha 2M$ přestavěna tak, že uvězní proteasu ve vnitřní kavitě inhibitoru. Proteasa zůstává aktivní a je i nadále schopna interagovat s malými substráty a inhibitory, které dokážou proniknout dovnitř klece, nikoli však s proteinovými ligandy^{44, 53}.

Schematické znázornění inhibiční interakce $\alpha 2M$ (modře) s cílovou proteasou (oranžově). Po rozštěpení senzitivní smyčky inhibitoru, která slouží jako „návnada“, je proteasa uvězněna uvnitř $\alpha 2M$ a kovalentně k němu připoutána pomocí reaktivních thioesterů; upraveno dle⁵⁴.

Mechanismus inhibice inhibitorů kaspas z rodiny p35 je velmi podobný serpinům. I zde rozštěpení reaktivní smyčky inhibitoru zahajuje sekvenci velmi rychlých konformačních změn, které zabraňují hydrolýze acyl-enzymového komplexu eliminací vody z AS proteasy. Komplex je dále stabilizován nekovalentními interakcemi v okolí AS proteasy⁵⁵.

Principy evolučního zdokonalování proteasových inhibitorů

Evolučně jsou jednotlivé rodiny PI specializované pouze na jednu třídu proteas (serinové, cysteinové, aspartátové nebo metaloproteasy), či na jednu rodinu proteas dané třídy. U několika rodin PI (např. Kunitz-P, Kunitz-BPTI, serpiny, cystatiny) však došlo během evoluce k výrazné strukturní a funkční divergenci a tyto rodiny obsahují členy schopné inhibovat i proteasy z jiných tříd. Kupříkladu PI z rodiny Kunitz-P jsou typicky cíleny proti serinovým proteasám, ale několik zástupců této rodiny vykazuje unikátní inhibiční aspartátových proteas nebo cysteinových proteas (např. PDI z lilku brambor resp. BbCI z bauhinie pestré)^{56, 57}. Podobně v rodině cystatinů nalezneme PI specializované na „nepůvodní“ cílové proteasy, jako je lidský CRES a hadí BJ46, které ztratily schopnost inhibovat cysteinové proteasy, ale inhibují proteasy serinové, popřípadě metaloproteasy^{58, 59}.

Původní PI disponují pouze jedním interakčním místem (tzv. reaktivním centrem) na jedné molekule inhibitoru a jsou označovány jako jednohlavé. Evolučně pokročilejší PI, nesoucí dvě nebo tři interakční místa,

jsou označovány jako dvouhlavé resp. trojhlavé. Tato inhibiční reaktivní centra mohou být specifická vůči jedné protease, proteasám stejné rodiny s různou specifitou či dokonce proteasám různých katalytických typů. Jako příklad mohou sloužit rostlinné proteiny API-A z šípky strelolisté a PDI z lilku brambor (oba z rodiny Kunitz-P; I3), schopné vázat dvě molekuly trypsinu resp. jednu serinovou a jednu aspartátovou proteasu současně^{57, 60}. Další velmi častou evoluční strategií pro zvýšení potence, specializaci či vznik nových funkcí je duplikace genů kódující jednotlivé inhibiční domény. Dochází tak ke vzniku multidoménových inhibitorů obsahujících řetězec sériově spojených inhibičních domén; nejvíce duplikací proběhlo u rodin Kazal (až 15 domén), Kunitz-BPTI (12 domén), Bowman-Birk (6 domén) a cystatinů (8 domén)⁷. Jednotlivé domény si mohou ponechávat původní inhibiční specifitu, ztrácet ji nebo získávat jinou. Neobvyklá není ani úplná ztráta interakce s proteasami a získání nových funkcí, jako je např. vazba na receptory či ovlivňování buněčné signalizace^{61, 62}.

Závěr

Proteasy zajišťují mnoho životně důležitých fyziologických funkcí a je proto nezbytná přirozená regulace jejich aktivity. K tomuto účelu jsou v genomech všech organismů kódovány PI jako specifické a citlivé proteinové nástroje. Již více než dvě desetiletí jsou PI předmětem intenzivního výzkumu vzhledem k řadě možností praktického využití. V biomedicině jsou atraktivní aplikace v oblastech souvisejících s imunitním systémem, nádorovým bujením, zánětlivými onemocněními a apoptózou^{38, 63-66}. Důležitým impulsem byla identifikace PI u významných patogenů a parazitů, kde se účastní interakce s hostitelem, a proto představují nadějně cílové molekuly pro vývoj vakcín, a také templáty pro modifikovaná farmaka⁶⁷. V oblasti rostlinných biotechnologií se výzkum PI zaměřuje na jejich využití v konstrukci transgenních rostlin odolných proti škůdcům^{24, 68}.

Poděkování

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

Literatura

1. Rawlings ND, Alan J, et al.: *Nucleic Acids Res* 46(D1), D624 (2018).
2. Chavanas S, Bodemer C, et al.: *Nat Genet* 25(2), 141 (2000).
3. Abboud RT and Vimalanathan S: *Int J Tuberc Lung Dis* 12(4), 361 (2008).
4. Kaiserman D, Whisstock JC, et al.: *Expert Rev Mol Med* 8(31), 1 (2006).
5. Misas-Villamil JC and Van Der Hoorn RaL: *Curr Opin Plant Biol* 11(4), 380 (2008).
6. Sajid M and Mckerrow JH: *Mol Biochem Parasitol* 120(1), 1 (2002).
7. Rawlings ND, Tolle DP, et al.: *Biochem J* 378(Pt 3), 705 (2004).
8. Ohmuraya M and Yamamura K: *Exp Anim* 60(5), 433 (2011).
9. Rimphanitchayakit V and Tassanakajon A: *Dev Comp Immunol* 34(4), 377 (2010).
10. Ascenzi P, Bocedi A, et al.: *Curr Protein Pept Sc* 4(3), 231 (2003).
11. Berman HM: *Acta Crystallogr A* 64, 88 (2008).
12. Cohen I, Coban M, et al.: *J Biol Chem* 294(13), 5105 (2019).
13. Chivasso P, Bruno VD, et al.: *J Cardiothor Vasc An* 32(1), 170 (2018).
14. Ranasinghe SL, Boyle GM, et al.: *Plos One* 13(8), (2018).
15. Zupunski V and Kordis D: *Sci Rep-Uk* 6, (2016).
16. Zupunski V, Kordis D, et al.: *Febs Letters* 547(1-3), 131 (2003).
17. Boex-Fontvieille E, Rustgi S, et al.: *P Natl Acad Sci USA* 112(23), 7303 (2015).
18. Islam A, Leung S, et al.: *Front Plant Sci* 8, (2017).
19. Qian CJ, Qi YX, et al.: *Oncol Lett* 16(1), 1237 (2018).
20. Eggers CT, Murray IA, et al.: *Biochem J* 379(Pt 1), 107 (2004).

21. Shin DH, Song HK, et al.: *Protein Sci* 5(11), 2236 (1996).
22. Miao Y, Chen G, et al.: *Biomolecules* 9(7), (2019).
23. Qi RF, Song ZW, et al.: *Acta Biochim Biophys Sin* 37(5), 283 (2005).
24. Srikanth S and Chen Z: *Front Pharmacol* 7,470 (2016).
25. Lee CJ and Ansell JE: *Br J Clin Pharmacol* 72(4), 581 (2011).
26. Rydel TJ, Tulinsky A, et al.: *J Mol Biol* 221(2), 583 (1991).
27. Chang JY: *FEBS Lett* 164(2), 307 (1983).
28. Palsdottir A, Snorraddottir AO, et al.: *Brain Pathol* 16(1), 55 (2006).
29. Shamsi A and Bano B: *Int J Biol Macromol* 102,674 (2017).
30. Coronado S, Barrios L, et al.: *Parasite Immunol* 39(4), (2017).
31. Schwarz A, Valdes JJ, et al.: *Ticks Tick-Borne Dis* 3(3), 117 (2012).
32. Koiwa H, Shade RE, et al.: *Febs Letters* 471(1), 67 (2000).
33. Todd B, Moore D, et al.: *J Mol Biol* 328(1), 131 (2003).
34. Hanna RA, Campbell RL, et al.: *Nature* 456(7220), 409 (2008).
35. Wiederanders B, Kaulmann G, et al.: *Curr Protein Pept Sc* 4(5), 309 (2003).
36. Zhang L, Yun H, et al.: *Cell Signal* 23(10), 1611 (2011).
37. Brew K, Dinakarpanidian D, et al.: *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2), 267 (2000).
38. Grunwald B, Schoeps B, et al.: *Trends Cell Biol* (2018).
39. Su CW, Lin CW, et al.: *Ther Adv Med Oncol* 11, 1758 (2019).
40. Drankowska J, Kos M, et al.: *Life Sci* 229,149 (2019).
41. Green TB, Ganesh O, et al.: *Biochemistry* 43(14), 4071 (2004).
42. Phylip LH, Lees WE, et al.: *J Biol Chem* 276(3), 2023 (2001).
43. Ng KK, Petersen JF, et al.: *Nat Struct Biol* 7(8), 653 (2000).
44. Kolodziej SJ, Wagenknecht T, et al.: *J Biol Chem* 277(31), 28031 (2002).
45. Ishii M, Osada T, et al.: *Brain Res* 737(1-2), 269 (1996).
46. Athauda SB, Nishigai M, et al.: *J Enzyme Inhib Med Chem* 18(3), 219 (2003).
47. Farady CJ and Craik CS: *ChemBiochem* 11(17), 2341 (2010).
48. Jw Fenton GV, Fa Oforu, Jm Maraganore. *Haemostasis* 21(1), 27 (1991).
49. Laskowski MJ: *Adv Exp Med Biol.* 1 (1986).
50. Elena Zakharova MPH, David P. Goldenberg: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(27), 11034 (2009).
51. Stubbs MT, Laber B, et al.: *EMBO J* 9(6), 1939 (1990).
52. Yang SQ, Wang CI, et al.: *J Mol Biol* 279(4), 945 (1998).
53. Ikai A, Ookata K, et al.: *Cytotechnology* 31(1-2), 53 (1999).
54. Pizzo SV: *Journal of Nature and Science* 18(7), 1 (2015).
55. G. Xu MC, Y. Huang, R. L. Rich, and D. G. Myszka HW: *Nature* 410,494 (2001).
56. Guo J, Erskine PT, et al.: *J Struct Biol* 192(3), 554 (2015).
57. Hansen D, Macedo-Ribeiro S, et al.: *Biochem Biophys Res Commun* 360(4), 735 (2007).
58. Cornwall GA, Cameron A, et al.: *Endocrinology* 144(3), 901 (2003).
59. Valente RH, Dragulev B, et al.: *Eur J Biochem* 268(10), 3042 (2001).
60. Bao R, Zhou CZ, et al.: *J Biol Chem* 284(39), 26676 (2009).
61. Magert HJ, Standker L, et al.: *J Biol Chem* 274(31), 21499 (1999).
62. Hawdon JM, Datu B, et al.: *J Parasitol* 89(2), 402 (2003).
63. Shamsi TN, Parveen R, et al.: *Int J Biol Macromol* 91,1120 (2016).
64. Umehara S, Fujiwara H, et al.: *Int J Oncol* 41(1), 61 (2012).
65. Bhagavan NV, Ha C-E, et al.: (2015).
66. Safavi F and Rostami A: *Exp Mol Pathol* 93(3), 428 (2012).
67. Ranasinghe SL, Duke M, et al.: *Int J Infect Dis* 66, 26 (2018).
68. Gatehouse JA: *Curr Protein Pept Sc* 12(5), 409 (2011).

Souhrn

Buša M: Makromolekulární inhibitory proteolytických enzymů

Proteasy, nedílná součást proteomu všech organismů, jsou velmi přísně regulovány pomocí několika mechanismů. Nejsložitější formu kontroly umožňuje 83 rodin proteinových inhibitorů, specificky cílených na skupiny určitých proteas či pouze jednotlivé proteasy. Kromě regulace endogenních proteas daného organismu mohou zastávat i další funkce, zejména ochranou před působením exogenních proteas patogenů a parazitů. Tento přehledový článek se zaměřuje na interakční mechanismy inhibitorů s proteasami, na evoluční zdokonalování inhibitorů a biologické funkce významných rodin proteasových inhibitorů. Stále vzrůstající zájem o proteasové inhibitory je motivován jejich potenciálním praktickým využitím v řadě oblastí, zejména v medicíně jako biofarmaka, vakcinační antigeny a templáty pro vývoj chemoterapeutik, a dále v rostlinných biotechnologiích při konstrukci transgenních plodin odolných proti škůdcům.

Klíčová slova: proteolytické enzymy, proteasové inhibitory, inhibice enzymů, protein-proteinové interakce

Summary

Buša M: Macromolecular inhibitors of proteolytic enzymes

Proteases, an integral part of the proteome of all organisms, are strictly regulated by several mechanisms. The most sophisticated form of control is provided by 83 protein inhibitor families, specifically targeting groups of proteases or just a single protease. In addition to the regulation of endogenous proteases, the inhibitors can have other functions, especially as protection against exogenous proteases of pathogens and parasites. This review focuses on interaction mechanisms between inhibitors and proteases, evolutionary improvement of inhibitors and on biological functions of important protease inhibitor families. The growing interest in protease inhibitors is driven by their potential applications in several areas, especially in medicine as biopharmaceuticals, vaccine antigens, and templates for the development of chemotherapeutics, and in plant biotechnology for the construction of transgenic pest-resistant crops.

Keywords: proteolytic enzymes, protease inhibitors, enzyme inhibition, protein-protein interaction

OBSAH

Úvodem	81
Vanek P, Kupcová Skalníková H.: Extracelulární váčky a jejich biomedicínský potenciál	82
Levinská B.: Génová terapie Huntingtonovej choroby (HCH) uskutočnená na TgHD miniprasatách v Liběchove s Holandskou firmou UniQure – predklinické štúdie	85
Buša M.: Makromolekulární inhibitory proteolytických enzymů	90

CONTENT

Editorial	81
Vanek P, Kupcová Skalníková H.: Extracellular vesicles and their biomedical potential	82
Levinská B.: Gene Therapy of Huntington's Disease (HCH) conducted at TgHD minipigs in Libechov with the Dutch company UniQure – preclinical studies	85
Buša M.: Macromolecular inhibitors of proteolytic enzymes	90

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albrechtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers. In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z.: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nevkládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z.: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737 (Print)
ISSN 2570-8910 (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).