

KATHEPSIN D A JEHO VZTAH K ONKOGENEZI

MARKÉTA KROULÍKOVÁ^a, MARTIN FUSEK^b
a TOMÁŠ RUML^{a,*}

^aÚstav biochemie a Centrum integrované genomiky, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6,
^bSigma-Aldrich s.r.o., Pobřežní 46, 186 21 Praha 8
e-mail: kroulikm@hotmail.com, tomas.ruml@vscht.cz,
Mfusek@eurnotes.sial.com

Došlo 17.4.02, přepracováno 25.4.02, přijato 3.9.02.

Klíčová slova: kathepsin D, aspartátová proteasa, aktivační peptid, nádor prsu, marker rakoviny

Obsah

1. Fyziologická úloha kathepsinu D
 - 1.1. Kathepsin D
 - 1.2. Transport prokathepsinu D v nenádorových buňkách
 - 1.3. Dva typy receptorů mannosu-6-fosfátu
 - 1.4. Primární struktura, aktivace a specifita prokathepsinu D
 - 1.5. Fyziologické funkce kathepsinu D
2. Role prokathepsinu D v onkogenezi
 - 2.1. Objev zvýšené koncentrace pCD a CD v nádorových buňkách prsu
 - 2.2. pCD jako prognostický marker rakoviny prsu
 - 2.3. Role estrogenů při expresi a sekreci pCD v nádorových buňkách prsu
 - 2.4. Interakce pCD s receptorem mannosu-6-fosfátu a transport CD nezávislý na tomto receptoru
 - 2.4.1. Transport pCD v B lymfoblastech vykazujících „I-cell“ onemocnění
 - 2.4.2. Asociace pCD s prosaposinem
 - 2.5. Hypotézy o funkci pCD při metastáze
 - 2.5.1. Nepřímé působení pCD na nádorové buňky – proteolytická aktivita
 - 2.5.2. Autokrinní mitogenní aktivita pCD
3. Role aktivačního peptidu pCD v onkogenezi
 - 3.1. Vliv aktivačního peptidu na proliferaci nádorových buněk prsu
 - 3.2. Interakce konjugátu pCD-FITC s nádorovými buňkami prsu
 - 3.3. Lokalizace vazebného místa aktivačního peptidu pro povrchový receptor
4. Závěr

* Autor pro korespondenci

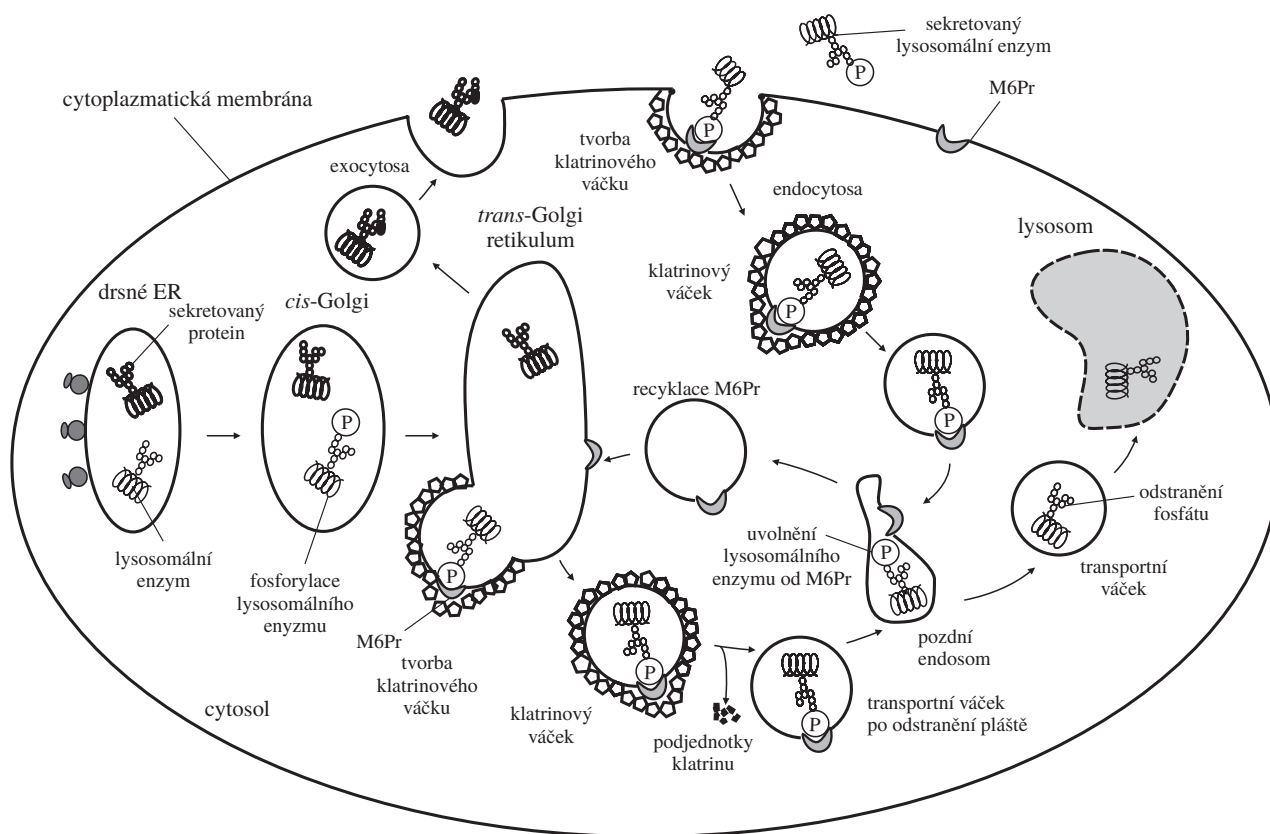
1. Fyziologická úloha kathepsinu D

1.1. Kathepsin D

Kathepsin D (CD, E.C. 3.4.23.5) je lysosomální aspartátová proteasa syntetizovaná téměř ve všech savčích buňkách. Jako kathepsiny poprvé označil R. Willstätter a E. Bamann kyselé proteasy, které byly nalezeny ve vodných extraktech různých tkání zvířat¹. První studie o proteasové aktivitě v extraktech se objevily v roce 1941 (cit.²). Na základě jejich specifity k různým syntetickým substrátům jim byla přidělena jména kathepsin A, B, C, D a E. Dnes za kathepsiny považujeme intracelulární enzymy, které rozkládají bílkoviny v prostředí o nízkém pH (optimální pH ~ 3,5–5). Kathepsiny jsou z velké části umístěny v lysosomálních frakcích, čímž se liší od jiných proteas v buňce (např. trypsin, chymotrypsin). Podle mechanismu účinku patří většina kathepsinů mezi cysteinové (thiolové) peptidasy. Kathepsin D je však zástupcem aspartátových peptidas. V lidském genomu je gen pro prokathepsin D (proenzym kathepsinu D, pCD) lokalizován na patnáctém lokusu 1 lp chromosomu, obsahuje devět exonů a velikost jeho primárního transkriptu je 2,2 kb (cit.⁴).

1.2. Transport prokathepsinu D v nenádorových buňkách

V nenádorových liniích je pCD syntetizován na endoplazmatickém retikulu (ER) jako prekurzor o molekulové hmotnosti 52 kDa, který ještě v endoplazmatickém retikulu podléhá N-glykosylaci nejčastěji dvěma oligosacharidovými řetězci, jež obsahují mannosu, která je fosforylována na mannosu-6-fosfát (M6P). Jedna molekula pCD tedy nese dva signály pro vazbu receptorů mannosu-6-fosfátu (M6Pr). Interakce s těmito receptory analogicky jako u ostatních lysosomálních enzymů zajišťuje transport pCD do lysosomů^{5,6}. Většina M6Pr je primárně lokalizována v *trans*-Golgiho retikulu (obr. 1), kde také dochází k jejich interakci s lysosomálními enzymy nesoucími M6P. Komplex těchto M6Pr s připojenými lysosomálními enzymy je soustředován na malém úseku membrány *trans*-Golgiho retikula^{7,8}, která je na straně cytosolu pokryta strukturální bílkovinou klatrinem. Působením klatrinu je tento úsek membrány oddělen a vytvářejí se speciální transportní váčky, z nichž je klatrin postupně odbouráván (obr. 1). Tyto holé transportní váčky fúzí s třídicími váčky, a tvoří tak organelu zvanou pozdní endosom, uvnitř které je pH okolo 5,5. Toto snížení pH způsobí uvolnění M6Pr z lysosomálních enzymů, protože vazba M6Pr s M6P je stabilní při pH 6,5–7. Z pozdních endosomů vznikají dva typy váček. Jeden typ váček obsahuje lysosomální enzymy (ve formě fosforylovaných glykoproteinů). V těchto váčkách, které fúzí s lysosomy, je od C6 mannosy fosfatasou odštěpen fosfát (obr. 1), což zabraňuje zpětnému navázání transportovaných proteinů na M6Pr. Druhý typ váček obsahuje M6Pr, který se navrací zpět do *trans*-Golgiho retikula (obr. 1).



Obr. 1. **Transport prokathesinu D v nenádorových buňkách.** Lysosomální enzymy migrují z drsného endoplazmatického retikula (ER – vlevo) do *cis*-Golgiho aparátu, kde dochází k fosforylaci M6P zbytků. V *trans*-Golgiho retikulu se lysosomální enzymy naváží na vysoce specifický membránový receptor M6Pr, který zajišťuje transport těchto enzymů do váčků pokrytých strukturální bílkovinou klatrinem. Klatrin depolymerizuje a vzniklé holé váčky fúzí s pozdními endosomy, v nichž se odděluje fosforylovaný enzym od M6Pr, což je způsobeno nízkým pH (5,5). M6Pr recykluje zpět do *trans*-Golgiho retikula a fosforylovaný enzym je inkorporován do odlišných transportních váčků, které pučí z pozdních endosomů. Zde probíhá defosforylace a váčky fúzí s lysosomy. M6Pr se také vyskytuje na cytoplasmatické membráně (vpravo nahoře). Sekretované lysosomální enzymy tak mohou být transportovány do lysosomů po endocytose zprostředkované M6Pr

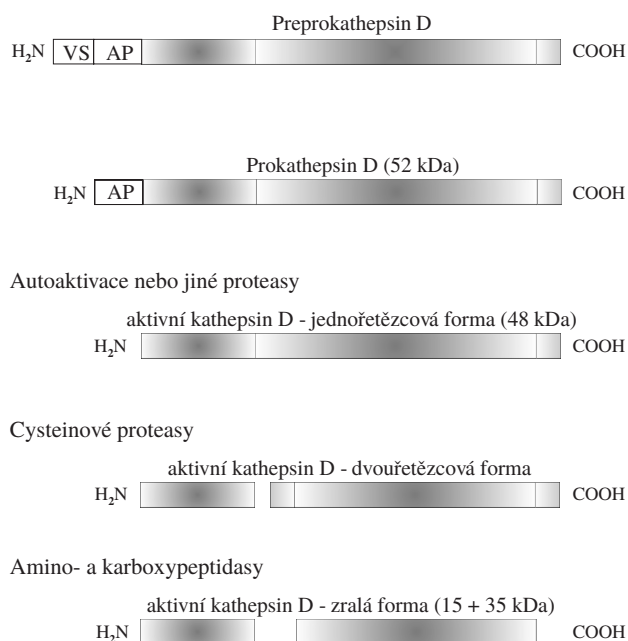
1.3. Dva typy receptorů mannosa-6-fosfátu

Jak bylo zmíněno výše, slouží interakce proteinů s M6Pr k transportu hydrolas z *trans*-Golgiho aparátu do lysosomů. Dosud jsou známy pouze dva druhy M6P receptorů interagujících s pCD. První z nich, M6P/IGF-II receptor, je transmembránový glykoprotein o molekulové hmotnosti 275 kDa, který specificky váže také IGF-II (insulin-like growth factor II) a zprostředkovává endocytosu sekretovaných lysosomálních enzymů a IGF-II. Druhý typ receptoru o molekulové hmotnosti 46 kDa se neúčastní endocytosu, je závislý na přítomnosti kationtů. Experimenty s buňkami postrádajícími jeden či druhý typ těchto receptorů ukázaly, že pCD je přednostně sekretován fibroblasty, kterým chybí M6P/IGF-II receptor⁹.

1.4. Primární struktura, aktivace a specifita prokathesinu D

Primární strukturu prekurzoru pro lidský katepsin D tvoří řetězec 412 aminokyselinových zbytků a nazývá se preprokathesin D. Preprokathesin D myši obsahuje 410 aminokyse-

linových zbytků, u krysa je to 407 a u kuřat 398 se jedná o zbytků. Prekurzor vždy obsahuje N-vedoucí sekvenci (VS, obr. 1), která u lidí obsahuje 20 aminokyselinových zbytků a je odštěpena během translokace přes membránu endoplazmatického retikula. Vzniká tak inaktivní prokathesin D (392 aminokyselinových zbytků u lidí, což odpovídá molekulové hmotnosti 52 kDa). Jak vyplývá z podobnosti aminokyselinové sekvence prokathesinu D a pepsinogenu, prokathesin D může podléhat autokatalytickému štěpení za vzniku aktivního katepsinu D (CD) o molekulové hmotnosti 48 kDa (cit.⁸). Aktivace CD může být katalyzována také dalšími proteasami, které jsou přítomné v lysosomech¹⁰. Peptid o molekulové hmotnosti 4 kDa odštěpený během aktivace CD se nazývá aktivační peptid (AP, obr. 1). CD je dále štěpen na N-koncový lehký řetězec (15 kDa) a C-koncový těžký řetězec (30 kDa), které jsou spojeny nekovalentními interakcemi, a tvoří tak dvouřetězcovou formu CD. Většina lidského a prasečího CD existuje výhradně ve dvouřetězcové formě, zatímco výskyt CD skotu je téměř rovnoměrně rozdělen mezi jedno- a dvouřetězcové formy. Myši a krysy CD existuje prakticky pouze v jednořetězcové formě. Aktivní místo CD je tvořeno dvěma aspartáty, má tvar štěrbinu podobně jako u ostatních aspartát-



Obr. 2. **Maturace prokathepsinu D**; vedoucí sekvence (VS) pro interakci se signální rozpoznávací částicí, která se váže na membránový receptor endoplazmatického retikula, VS je následně odštěpena signální peptidasou

ových proteas a je podobné aktivnímu místu pepsinu. Štěpením B řetězce inzulínu jako substrátu bylo potvrzeno, že také specifita CD je pepsinu podobná a při štěpení jsou preferovány peptidové vazby za hydrofobními aminokyselinami³. Proteolytickou aktivitu lze podobně jako u ostatních aspartátových proteas inhibovat pepstatinem.

1.5. Fyziologické funkce kathepsinu D

CD je přítomen v lysosomech všech savčích buněk, kde přispívá hlavním podílem k degradaci proteinů ve spolupráci s ostatními proteasami¹¹. Jeho zastoupení se liší u různých tkání a je rovněž přítomen v endosomech určitých typů buněk jako např. makrofágů a hepatocytů. Nejčastěji se vyskytuje jako rozpustný protein, ale v endosomech může být až z 20 % vázán na membrány.

CD hraje důležitou roli také při proteolytické úpravě prekurzorů hormonů nebo antigenů pro jejich prezentaci^{12,13}. Glykoproteiny II. třídy MHC II (major histocompatibility complex) jsou za fyziologických podmínek přítomny jen na buňkách prezentujících antigen. V endoplazmatickém retikulu je vazebné místo na MHC II blokováno krátkým peptidem (tzv. invariantním řetězcem), takže se do něj nemohou navázat peptidové fragmenty vzniklé štěpením vlastních bílkovin. Komplex glykoproteinů MHC II s invariantním řetězcem je z endoplazmatického retikula transportován přes Golgiho aparát do sekrečních váček, které po oddělení od Golgiho aparátu fúzí s endosomy. Po fúzi endosomu se sekrečním váčkem degradují kathepsiny v endosomech invariantní řetězec a do uvolněného vazebného místa glykoproteinů MHC II se pak mohou navázat peptidové fragmenty endocytovaných

proteinů. Degradace pohlcených cizorodých proteinů v endosomech patří mezi další funkce kathepsinů. Byla publikována také data naznačující roli CD při obnově tkání¹⁴.

CD se účastní pravděpodobně také některých patologických procesů, jako jsou proliferace rakovinných buněk, uvolňování β -amyloidu z prekurzoru při Alzheimerově chorobě.

2. Role prokathepsinu D v onkogenezi

2.1. Objev zvýšené koncentrace pCD a CD v nádorových buňkách prsu

Zvýšená exprese prokathepsinu D (pCD) v nádorových buňkách prsu (dále NBP) byla zjištěna náhodou Henrim Rochefortem^{15–17} na počátku 80. let. H. Rochefort v té době zkoumal vliv estrogenů na NBP a snažil se izolovat proteiny, jejichž exprese byla estrogeny vyvolána. Domníval se, že by tyto proteiny mohly hrát důležitou roli při řízení růstu nádoru a jeho invaze a působit jako autokrinní či parakrinní faktory. Velkou pozornost vzbudil protein 52K, který byl ve velkém množství sekretován MCF7 buňkami (estrogen pozitivní NBP) a vykazoval mitogenní aktivitu¹⁸. Navíc byl indukován antiestrogenem tamoxifenem v několika antiestrogen-rezistentních buněčných liniích, zatímco tamoxifen inhiboval jeho produkci v divokém typu buněk MCF7 (cit.¹⁹). Kritickými kroky pro identifikaci 52K proteinu jako pCD bylo izolovat specifické monoklonální protilátky²⁰, vyčistit tento sekretovaný protein²¹ a studovat jeho ko- a posttranslační modifikace. Interakce neznámého proteinu s receptory mannosu-6-fosfátu vedly k hypotéze, že se jedná o lysosomální hydrolasu⁴. Čistý 52K byl později identifikován jako prokathepsin D (pCD) na základě jeho proteolytické aktivity v kyselé oblasti pH, inhibice pepstatinem, jeho interakce s protilátkami proti pCD a sekvence prvních patnácti aminokyselin²². Pořadí ostatních aminokyselin pCD bylo určeno sekvenováním cDNA získaných z lidských jater a sleziny. Srovnáním aminokyselinové sekvence pCD z MCF7 a ze zdravých ledvinových buněk bylo zjištěno pět záměn, z nichž jedna byla v AP části (Ala→Val). V buněčných liniích ZR-75-1 (estrogen negativní NBP) a dalších liniích byly sice prokázány další záměny aminokyselin, celkově je však sekvence pCD v NBP konzervativní.

2.2. pCD jako prognostický marker rakoviny prsu

pCD je v NBP exprimován dva- až pětikrát více ve srovnání s jinými buňkami, jako jsou například fibroblasty nebo zdravé buňky prsních žláz²³. Metodami imunohistochemie, imunanalýzou cytosolické frakce, Northern a Western blot analýzami či *in situ* hybridizací bylo zjištěno, že se v NBP zvyšuje množství jak mRNA kódující pCD, tak koncentrace přepísaného proteinu²³. Ukazuje se, že nadprodukce pCD není způsobena amplifikací genu ani chromosomálním přeskupením²⁴. Proto se pCD dnes již úspěšně využívá jako nezávislý prognostický marker při diagnostice klinické metastázy rakoviny prsu. pCD není jakožto marker rakoviny prsu závislý na jiných parametrech, jako je například inhibitor urokinasy. Otázkou zůstává, zdali může být pCD použit jako marker pro jiné typy rakoviny např. v hepatomech, melanomech a rakovinných buňkách prostaty. V klinických laboratořích jsou ke

stanovování koncentrací pCD a CD používány standardní imunochemické metody založené na použití dvou monoklonálních protilátek²⁵. Podobné výsledky lze získat také stanovením proteolytické aktivity CD v cytosolu po jeho aktivaci snížením pH. Odlišné výsledky jsou často získávány různými imunochemickými metodami, což může být způsobeno použitím různých protilátek, různých metod fixace tkání či ztrátou sekretované formy pCD během fixace.

2.3. Role estrogenů při expresi a sekreci pCD v nádorových buňkách prsu

Ve zdravé savčí buňce, například v lidském fibroblastu, je většina syntetizovaného pCD cílena do lysosomů, kde rychle probíhá jeho štěpení na aktivní formu kathepsinu, a jen malé množství prokathesinu je akumulováno v jiných částech buňky nebo sekretováno²⁶. V několika liniích hormonálně závislých (MCF7, ZR-Z5-1) a nezávislých (MDA-MB-231, BT20) NBP byla zjištěna značně zvýšená sekrece pCD (nad 50 %) a akumulace 52 kDa a 48 kDa forem v buňkách. Změna transportu a sekrečního mechanismu pCD je pravděpodobně způsobena nadprodukcí pCD, který vysítí vazebná místa M6P receptorů. Nadprodukce pCD a dalších lysosomálních proteas je v hormonálně závislých NBP indukována estrogeny. Estrogeny v těchto buňkách navíc snižují expresi M6Pr. Bylo prokázáno, že snížení exprese může být regulováno na úrovni transkripce i translace²⁷. Sekreci lysosomálních enzymů z NBP tedy usnadňují estrogeny dvěma způsoby, neboť velké množství exprimovaného pCD má k dispozici snížený počet M6Pr. Princip indukce exprese pCD v hormonálně nezávislých NBP nebyl dosud pozorován.

2.4. Interakce pCD s receptorem manna-6-fosfátu a transport CD nezávislý na tomto receptoru

S cílem vysvětlit sekreci a transport pCD v nádorových buňkách byly studovány jeho interakce s M6Pr. Ukázalo se, že *in vitro* interaguje pCD s M6P/IGFIIr a jejich vzájemná afinita je srovnatelná s afinitou pCD a M6Pr v normálních buňkách^{28,29}. Při pokusech v NBP a sledování transportu pCD do lysosomů však bylo zjištěno, že M6P/IGFIIr vykazuje sníženou aktivitu. Gen pro M6P/IGFIIr je kódován na 6q chromosomu a patří mezi nádorově supresorové geny³⁰, které kódují proteiny, udržující normální somatické buňky v G0 fázi a potlačující proliferaci. K neregulované proliferaci buněk a vzniku nádoru dochází až v případech, že jsou tyto alely homozygotně mutovány. Takováto ztráta heterogenity na úseku 6q chromosomu kódujícím M6P/IGFIIr lokus byla popsána v hepatokarcinomech³⁰ a rovněž v NBP (cit.³¹).

Snížená afinita M6Pr k pCD (způsobená mutací genu pro M6Pr) či snížení koncentrace těchto receptorů působením estrogenů (viz předchozí kapitola) umožňuje vazbu pCD na jiné receptory než M6Pr. V NBP může být tedy pCD transportován nezávisle na M6Pr. Alternativní transport pCD se projevuje nízkou akumulací zralého enzymu v lysosomech a zvýšenou sekrecí proenzymu²⁶. V některých antiestrogen-resistentních liniích NBP byl nově syntetizovaný pCD sekretován až z 90 % (cit.^{19,32}). Transportu pCD pomocí M6Pr lze v různých buňkách zabránit jejich kultivací v přítomnosti NH₄Cl,

neboť tato slabá báze zvýšením pH v „třídících“ endosomech zabraňuje rozpadu pCD-M6P/IGFIIr a následné recyklaci receptoru do Golgiho aparátu³³. Po přidání NH₄Cl do růstových médií fibroblastů a zdravých buněk prsu se nově syntetizovaný pCD sekretuje ven z buněk namísto jeho transportu do lysosomů. Naopak v mnoha liniích NBP a nádorových buněk vaječníků dochází ke zvýšení intracelulární hladiny proenzymu po kultivaci s NH₄Cl. Zdá se, že tato rezistence k NH₄Cl je specifická pro pCD, protože komplexy M6Pr s jinými enzymy jako je β -hexosaminidasa, α -glukosidasa a arylsulfatasa se v prostředí NH₄Cl rozpadají³⁴.

2.4.1. Transport pCD v B lymfoblastech vykazujících „I-cell“ onemocnění

Transport lysosomálních enzymů nezávislý na M6P byl podrobně studován v B lymfoblastech vykazujících dědičné lidské onemocnění, při kterém neznámá mutace snižuje nebo eliminuje aktivitu *N*-acetylglukosamin-fosfotransferasy, tzv. I-cell onemocnění³⁵ (ICD). *N*-acetylglukosamin-fosfotransferasa katalyzuje první krok fosforylace mannosových zbytků obsažených v glykoproteinech lysosomálních enzymů (obr. 1), čímž napomáhá k interakci lysosomálních enzymů s M6Pr. V poškozených B-lymfoblastech tedy nedochází k tvorbě komplexu pCD-M6Pr. Normální hladina lysosomálních enzymů v B-lymfocytech těchto pacientů je pak důkazem, že jsou sledované enzymy transportovány jiným způsobem, než s využitím receptoru pro M6P (cit.³⁶). Další pokusy s B-lymfoblasty s neaktivní *N*-acetylglukosamin-fosfotransferasou pomohly identifikovat aminokyselinovou doménu pCD, která je zodpovědná za M6P-nezávislý transport do lysosomů. Zjištění, že neglykosylovaný pCD je dopravován do lysosomů stejně účinně jako glykosylovaný, je důkazem toho, že aminokyselinová sekvence pCD musí obsahovat specifický třídící signál³⁵. Analýzou několika chimerních proteinů pCD/glykopepsinogen bylo zjištěno, že za transport pCD do lysosomů je zodpovědný úsek pCD od 188 do 265 aminokyselin.

Cesta nezávislá na M6Pr je méně účinná než transport lysosomálních enzymů v normálních lymfoblastech, který je na M6Pr závislý. V poslední době se objevily údaje o tom, že tento M6P nezávislý transport je tkáňově specifický, neboť přestože byl zjištěn např. v hepatocytech a thymocytech, nedochází k němu ve fibroblastech³⁵. Tyto alternativní receptory by se mohly uplatňovat nejen v transportu, ale i při indukcii mitogenní aktivity prokathesinu D.

2.4.2. Asociace pCD s prosaposinem

Saposiny A, B, C a D jsou malé termostabilní glykoproteiny, vznikající ze společného prekurzoru prosaposinu v lysosomech. Tyto proteiny aktivují různé lysosomální hydrolasy, které se účastní metabolismu sfingolipidů. Kromě své lysosomální funkce je prosaposin také přítomen jako integrální membránový protein a jako neštěpený hraje různé role v různých tělních tekutinách, např. v seminální plazmě, lidském mléce a cerebrospinálním moku. Bylo navrženo, že právě molekula prosaposinu by mohla být odpovědná za tento alternativní transport pCD (cit.³⁷). Komplex pCD s prosaposinem se vytváří hned po syntéze pCD na endoplazmatickém retikulu. Vzniklý komplex asociuje s membránou až v Golgiho aparátu. Metodami buněčné frakcionace bylo prokázáno, že komplex

pCD s prosaposinem disociuje od membrány a rozpadá se až v kyselém prostředí lysosomů.

2.5. Hypotézy o funkci pCD při metastáze

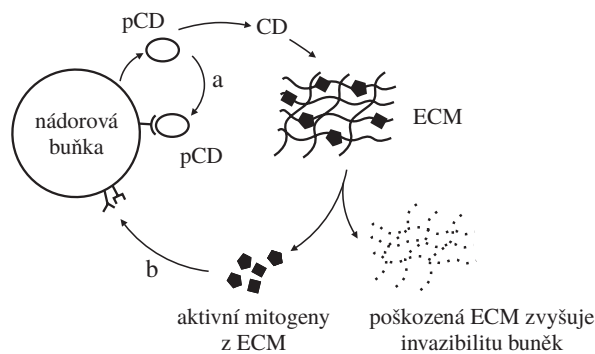
Výsledky několika nezávislých pokusů ukazují, že pCD je nejen dobrým markerem metastázy NBP, ale pravděpodobně se na proliferaci NBP také podílí. Na počátku 90. let byl získán přímý důkaz toho, že nadměrná exprese pCD může podporovat některé kroky metastázy³⁸. Do krysích nádorových buněk linie 3Y1-Ad12 byl vnesen vektor pro expresi lidského pCD. Stabilní buněčné linie produkující a sekretující vysoké hladiny lidského pCD rostly mnohem rychleji v médiu s nízkým obsahem séra než kmeny s kontrolními vektory. Také jejich schopnost způsobovat metastázy po intravenózní injekci do athymických myší byla mnohem významnější ve srovnání s kontrolou.

Mechanismy působení pCD na proliferaci rakovinných buněk jsou nyní intenzivně zkoumány. Z dosavadních výsledků vyplývá, že pCD může při stimulaci růstu NBP uplatňovat dva na sobě nezávislé způsoby. Jak naznačuje uvedené schéma (obr. 3), pCD může na NBP působit přímo, to znamená, že uplatňuje nějaký vlastní strukturní motiv a interaguje například jako růstový faktor s povrchovým receptorem buňky či působí jako inhibitor kontrolních mechanismů při dělení buňky (obr. 3a). Při nepřímém mitogenním působení může pCD uplatnit svoji proteolytickou aktivitu. Z extracelulární matrix může například uvolňovat molekuly, které mohou podporovat růst nádorových buněk (obr. 3b). Struktura extracelulární matrix je tímto způsobem narušena, čímž je usnadněna invaze nádorových buněk. Jiným důsledkem proteolytické aktivity CD je specifická proteolytická inaktivace komplexu sekretovaného růstového inhibitoru IGF-I s vazebným proteinem 3 (IGF-I-VP 3) (obr. 4) (cit.³⁹). Uvolněný IGF-I tak může stimulovat svůj receptor (IGF-Ir), a tím i růst rakovinných buněk. Zrání pCD a následné inaktivaci IGF-I – vazebného proteinu 3 kathepsinem lze zabránit neutralizací kyselých váčků chlořidem amonným. Aktivní CD může napomáhat také degradaci bazální membrány, což je jeden z kroků vedoucích k metastáze rakovinných buněk.

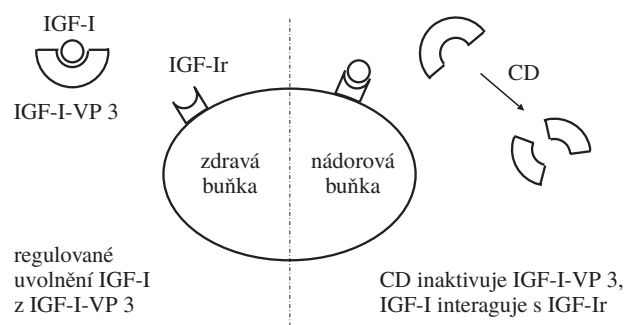
2.5.1. Nepřímé působení pCD na nádorové buňky – proteolytická aktivita

Jak již bylo řečeno, proteolytická aktivita CD se uplatňuje při degradaci extracelulární matrix a bazální membrány obklopující primární nádor. Na otázku, jakým způsobem mohou být kyselé proteasy v extracelulárním prostředí aktivovány, odpovídá skutečnost, že nádorové buňky si v organismu často vytvářejí mikroprostředí o nižším pH, než je pH fyziologické. Na rozdíl od zdravých tkání mohou NBP snižovat pH extracelulárního prostředí produkcí kyseliny mléčné a pomocí H^+ /ATPasové pumpy, která zevnitř buňky transportuje protony přes cytoplazmatickou membránu. pH může být takto sníženo až na hodnotu 5,5, což je postačující pro aktivaci pCD. Jakým způsobem mohou být kathepsiny nádorovými buňkami sekretovány, není zatím zcela objasněno.

Fakt, že pCD může být zodpovědný za degradaci extracelulární matrix, potvrdily pokusy, při kterých se pCD obsažený v médiu po kultivaci MCF7 buněk s estrogeny ponechal *in*



Obr. 3. Mechanismy působení pCD na nádorové buňky; a: mitogenem je přímo molekula pCD, b: – nepřímo – prostřednictvím proteolytických produktů



Obr. 4. Role CD při inaktivaci růstového inhibitoru – IGF-I – vazebného proteinu 3; IGF-I – inzulinu podobný růstový faktor I (insuline-like growth factor I), IGF-I-VP 3 – vazebný protein pro IGF-I, IGF-Ir – receptor pro IGF-I na povrchu buňky

vitro působit na extracelulární matrix připravenou z hovězích rohovkových endotheliálních buněk. Rozklad extracelulární matrix proteasami, které byly přítomny v médiu NBP, byl způsoben především CD, což dokazuje kompletní inhibice tohoto procesu inhibitory aspartátových proteas pepstatinem, ne však inhibitory dalších proteas. Nejvyšší stupeň degradace extracelulární matrix byl v obou případech naměřen při pH v kyselé oblasti (4–5) (cit.⁴⁰).

Teoreticky může CD štěpit extracelulární matrix vně buňky, tedy po jeho sekreci a aktivaci. Nádorové buňky jsou schopné také endocytózy či fagocytózy extracelulární matrix. V NBP byly objeveny intracelulární objemné kyselé váčky (LAVs, large intracellular acidic vesicles) odlišné od lysosomů, o průměru větším než 5 μm . LAVs se vyskytují mnohem častěji u NBP než u zdravých buněk a obsahují jak fagocytovanou extracelulární matrix, tak velké množství CD, ale nikoliv pCD. K rychlému štěpení extracelulární matrix v LAVs je potřeba velké koncentrace kathepsinů, což by mohlo být jedním z vysvětlení, proč jsou rakovinné buňky produkující velká množství pCD úspěšnější v rozvíjející se metastáze²⁵.

Proteolytická aktivita CD může mít roli také při degradaci nebo aktivaci řady molekul, které mohou hrát důležitou roli při metastáze. Na extracelulární matrix je v inaktivní formě vázáno několik růstových faktorů a cytokinů. Příkladem jsou prekurzory TGF β (tumor growth factor) nebo FGF (fibroblast

growth factor), které mohou po uvolnění z ECM spustit invazi tumoru. MCF7 buňky pěstované na extracelulární matrix obsahující prekursor ^{125}I -bFGF (bovine fetal growth factor) štěpí extracelulární matrix a uvolňují z něj biologicky aktivní ^{125}I -bFGF, který následně stimuluje rozvoj MCF7 buněk. Uvolnění aktivního bFGF lze inhibovat pepstatinem A, což je opět důkazem, že aspartátové proteasy degradují extracelulární matrix.

2.5.2. Autokrinní mitogenní aktivita pCD

Jak již bylo uvedeno, existuje ještě další vysvětlení, proč po transientní expresi pCD v krysích nádorových buňkách dochází k pomnožení těchto buněk. pCD by při proliferaci nádorových buněk mohl uplatnit nějaký motiv své struktury a působit přímo jako růstový faktor či inhibitor kontrolních mechanismů pro dělení buňky. Tato aktivita pCD se nazývá autokrinní mitogenní a byla testována inkubací buněk s pCD a s IGF-II faktorem jako pozitivní kontrolou⁴¹. Proliferační aktivita pCD i IGF-II je závislá na jejich výsledné koncentraci v mediu, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při koncentracích $20 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ pro pCD i IGF-II (cit.⁴²). pCD byl pro tyto pokusy izolován z medií po inkubaci buněk linie ZR-75-1 s estrogeny a přečištěn pomocí imunoafinitní chromatografie⁴¹. Nádorové buňky rostly v přítomnosti pCD stejně dobře jako při inkubaci v přítomnosti IGF-II. Buňky, které nebyly od nádorových buněk odvozeny, rostly mnohem pomaleji v přítomnosti pCD než IGF-II. Tyto výsledky potvrdily již známý fakt, že pCD podporuje růst nádorových buněk jako autokrinní mitogen.

S cílem blíže objasnit mechanismus mitogenní aktivity pCD byly stejné pokusy provedeny v přítomnosti pepstatinu, mannosu-6-fosfátu a různých protilátek. Výsledky jsou shrnuty v tabulce (tab. I). Přidání pepstatinu A jakožto účinného inhibitoru proteolytické aktivity CD nemělo vliv na růst nádorových buněk, což naznačuje, že kromě proteolytické aktivity způsobuje proliferaci NBP i mitogenní funkce pCD.

Tabulka I

Vliv pCD, CD, aktivačního peptidu a IGF-II na růst buněk⁴¹: – během 7 denní kultivace nebyl zaznamenán významný nárůst buněk, + během 7 denní kultivace byl zaznamenán významný nárůst buněk, PL protilátka, IGF-II inzulinu podobný růstový faktor I (insuline-like growth factor II), AP aktivační peptid

Testovaná látka	Buňky	
	nenádorové	nádorové
pCD	–	+
IGF-II	+	+
pCD + pepstatin A	–	+
pCD + M6P	–	+
Deglykosylovaný pCD	–	+
pCD + PL proti CD	–	+
pCD + PL proti pCD	–	–
IGF-II + PL proti pCD	+	+
CD	–	–
AP	–	+
AP + PL proti CD	–	+
AP + PL proti pCD	–	–

rových buněk, což naznačuje, že kromě proteolytické aktivity způsobuje proliferaci NBP i mitogenní funkce pCD.

2.5.2.1. Vyloučení teorie o vlivu mannosu-6-fosfátu

Možnost účasti M6Pr na mitogenní aktivitě pCD byla zkoumána testováním vlivu přídatku M6P, který ve vyšších koncentracích (10 mM) inhibuje interakci pCD s M6Pr na povrchu buněk a blokuje internalizaci pCD (cit.⁴³). Kdyby byla mitogenní aktivita pCD zprostředkována pomocí interakce pCD s M6Pr, inhiboval by ji nadbytek volných M6P, neboť by M6Pr na povrchu byly vysyceny mannosu-6-fosfáty. Přidání M6P však nemělo žádný vliv na mitogenní aktivitu pCD. Odštěpením cukerné složky od pCD N-glykanasou se mitogenní aktivita pCD jen mírně snížila, což může být způsobeno tím, že při deglykosylaci enzymů dochází často k narušení původní struktury. Souhrnné výsledky však svědčí o tom, že samotný M6P není pro mitogenní aktivitu pCD rozhodující.

3. Role aktivačního peptidu pCD v onkogenezi

3.1. Vliv aktivačního peptidu na proliferaci nádorových buněk prsu

Zajímavé výsledky byly získány při kultivaci buněk s různými protilátkami⁴⁴. Protilátky, které rozpoznávají epitop uvnitř aktivačního peptidu (dále AP) prokathepsinu D, silně inhibovaly mitogenní funkci pCD, zatímco protilátky proti kathepsinu, které neinteragují se samotným AP, neměly na růst buněk žádný vliv. AP by proto mohl hrát důležitou roli v mitogenní aktivitě pCD.

Pro další výzkum účasti AP v mitogenní funkci pCD byl AP připraven synteticky. Při kultivaci různých typů buněk s takto připraveným AP byly naměřeny podobné proliferační aktivity jako v případě pCD (viz tabulka I). Buněčné linie odvozené z rakovinných buněk odpovídaly na přítomnost AP v mediu jen o málo intenzivněji než na přírůstek pCD a naopak u linií, které na pCD nereagovaly, nebyla naměřena žádná odpověď ani pro AP. Nepatrné snížení mitogenní aktivity AP oproti pCD lze vysvětlit větší konformační flexibilitou volného AP. AP jako součást molekuly mění hůře konformaci, která je vhodná pro mitogenní receptor. Pro srovnání byly měřeny také interakce s pepsinogenem. Zralý pepsin má s CD podobnou prostorovou strukturu, avšak primární struktury aktivačních peptidů se liší^{43,3}. Rovněž přítomnost protilátek proti AP či proti samotnému CD měla srovnatelný vliv na růst buněk.

3.2. Interakce konjugátu pCD-FITC s nádorovými buňkami prsu

Za účelem potvrdit další hypotézu, že na povrchu nádorových buněk existuje receptor, na který se váže AP, byl připraven konjugát pCD-FITC (FITC – fluoresceinisothiokyanát) (cit.⁴¹). Po interakci konjugátu pCD-FITC s buněčným povrchem NBP byla průtokovou cytometrií měřena intenzita fluorescence jednotlivých buněk. Pokles fluorescence v důsledku preinkubace NBP s aktivačním peptidem naznačuje, že na povrchu buněk jsou receptory společné jak pro aktivační peptid, tak pro pCD. Obdobně bylo blokování povrchových re-

ceptorů pozorováno také u buněk, inkubovaných nejprve s nezačleněným pCD. Interakcím konjugátu pCD-FITC s povrchem nádorových buněk lze zamezit přidáním protilátek proti pCD.

3.3. Lokalizace vazebného místa aktivačního peptidu pro povrchový receptor

Zatím zůstává nejasné, která část AP je za interakci s receptorem zodpovědná. Na základě znalostí prostorové struktury aktivního CD (cit.³) a modelu struktury pCD (cit.^{45,46}) byly připraveny dva syntetické peptidy, které obsahovaly prvních 26 (1–26) a dalších 18 (27–44) aminokyselin aktivačního peptidu pCD. Srovnáním jejich mitogenních aktivit bylo zjištěno, že vazebné místo pro povrchový receptor na NBP je lokalizováno někde mezi aminokyselinami 27–44 (cit.⁴⁷).

4. Závěr

Je zřejmé, že CD nebo jeho AP hrají roli v onkogenezi, a to zejména při vzniku rakoviny prsu. Podílí se jak na zvýšení buněčného růstu, tak na snížení inhibice růstu mezibuněčným kontaktem. Mechanismus působení CD v onkogenním procesu není zatím dostatečně objasněn. Je však známo, že v prsních nádorových buňkách dochází k jeho nadměrné sekreci a stává se hlavním sekretovaným proteinem. Z publikovaných dat vyplývá, že důvodem jeho onkogenního působení může být jak jeho proteolytická aktivita spojená s degradací určitého tumorového supresoru, tak aktivace receptorů, ať již přímou interakcí s nebo proteolytickým rozrušením komplexu IGF-I – vazebný protein. Uvolněný IGF-I se pak může vázat na vlastní receptor a aktivovat buněčnou proliferaci. Některá experimentální data ukazují, že za mitogenní aktivitu je zodpovědný AP, který je z prokathepsinu odštěpen při jeho aktivaci.

Existují však také výsledky naznačující, že CD sekretovaný nádorovými buňkami lidské prostaty ovlivňuje tvorbu angiostatinu, tj. inhibitoru vývoje krevních cév, čímž zabraňuje výživě rostoucího nádoru a rozvoji metastáz. Tato funkce CD je významně snížena v případech pCD sekretovaného nádorovými buňkami prsu, což je dááno do souvislosti s rozdílnou glykosylací těchto forem CD.

LITERATURA

- Willstätter R., Bamann E.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 180, 127 (1929).
- Fruton J. S., Irwing J., Bergmann M.: J. Biol. Chem. 141, 763 (1941).
- Metcalf P., Fusek M.: EMBO J. 12, 1293 (1993).
- Redecker B., Heckendorf B., Grosch H. W.: DNA Cell Biol. 10, 423 (1991).
- Griffiths G.: Cell 52, 329 (1988).
- Kornfeld S.: Annu. Rev. Biochem. 61, 307 (1992).
- Griffiths G., Gruenberg J.: Trends Cell Biol. 1, 5 (1991).
- von Figura K., Hasilik A.: Annu. Rev. Biochem. 55, 167 (1986).
- Ludwig T., Munier-Lehmann H., Bauer U.: EMBO J. 13, 3430 (1994).
- Hasilik A.: Experientia 48, 130 (1992).
- Barrett A. J.: Biochem. J. 117, 601 (1970).
- Watts C.: Curr. Opin. Immunol. 13, 26 (2001).
- Riese J. R., Chapman H. A.: Curr. Opin. Immunol. 12, 107 (2000).
- Safting P., Hetman M., Schmah W.: EMBO J. 14, 3599 (1995).
- Rocheffort H., Coezy E., Joly E., Westley B., Vignon F.: Horm. Cancer 1980.
- Lippman M. E., Dickson R. B., Bates S., Knabbe C., Huff K., Swain S., McManaway M., Bronzert D., Kasid A., Gelmann E. P.: Breast Cancer Res. Treat. 7, 59 (1986).
- Westly B., Rocheffort H.: Cell 20, 352 (1980).
- Vignon F., Capony F., Chambon M., Freiss G., Garcia M., Rocheffort H.: Endocrinology 118, 1537 (1986).
- Westley B., May F. E. B., Brown A. M. C., Krust A., Chambon P., Lippman M. E., Rocheffort H.: J. Biol. Chem. 259, 10030 (1984).
- Garcia M., Capony F., Derocq D., Simon D., Pau B., Rocheffort H.: Cancer Res. 45, 709 (1985).
- Capony F., Garcia M., Capdevielle J., Rougeot C., Ferrara P., Rocheffort H.: Eur. J. Biochem. 161, 505 (1986).
- Morisset M., Capony F., Rocheffort H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 102 (1986).
- Capony F., Rougeot C., Montcourrier P.: Cancer Res. 49, 3904 (1989).
- Roger P., Montcourrier P., Maudelonde T.: Hum. Pathol. 25, 868 (1994).
- Rocheffort H.: Eur. J. Cancer 28A, 1780 (1992).
- Capony F., Rougeot C., Montcourrier P., Cavailles V., Salazar G., Rocheffort H.: Cancer Res. 49, 3904 (1989).
- Geisinger S. R., Berens M. E., Duckett Y.: Cancer (Philadelphia) 65, 1055 (1990).
- Capony F., Morisset M., Berrett A. J., Capony J. P., Broquet P., Vignon F., Chambon M., Luisot P., Rocheffort H.: J. Cell. Biol. 104, 253 (1987).
- Isidoro C., Baccino F. B., Hasilik A.: Int. J. Cancer 70, 561 (1997).
- De Souza A. T., Hankins G. R., Washington M. K., Orton T. C., Jirtle J. L.: Oncogene 10, 1725 (1995).
- Chappell S. A., Walsh T., Walker R. A., Shaw J. A.: Brit. J. Cancer 75, 1324 (1997).
- Coopman P., Garcia M., Brunner N.: Int. J. Cancer 56, 265 (1994).
- Diment S., Leech M. S., Stahl P. D.: J. Biol. Chem. 263, 6901 (1988).
- Capony F., Braukle T., Rougeot C., Roux S., Montcourrier P., Rocheffort H.: Exp. Cell Res. 215, 154 (1994).
- Jonathan N. G., Stuart K.: J. Cell Biol. 123, 99 (1993).
- Hasilik A., Waheed A., Figura K.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 761 (1981).
- Yunxiang Z., Conner E. G.: J. Biol. Chem. 269, 3846 (1994).
- Garcia M., Derocq D., Pujol P., Rocheffort H.: Oncogene 125, 145 (1990).
- Garcia M., Platet N., Liaudet E., Laurent V., Derocq D., Brouillet J. P., Rocheffort H.: Stem Cells (Dayton) 14, 642 (1996).
- Nakopoulou L., Giannopolou I., Gakiopolou H., Liapis H., Tzonou A., Davaris P. S.: Hum. Pathol. 30, 436 (1999).
- Fusek M., Větvicka V.: Biochem. J. 303, 775 (1994).

42. Větvička V., Větvičková J., Fusek M.: *Cancer Lett.* 79, 131 (1994).
43. Creek K. E., Sly W. E.: *Lysosomes Biol. Pathol.* 1984, 63.
44. Větvička V., Wagner J., Baudys M., Tang J., Foundling I. S., Fusek M.: *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30, 921 (1993).
45. Větvička V., Větvičková J., Fusek M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 322, 295 (1995).
46. Metcalf P., Větvička V., Fusek M.: *New York Plenum* 1995, 273.
47. Větvička V., Větvičková J., Hilgert I., Vobůrka Z., Fusek M.: *Int. Cancer* 73, 403 (1997).

M. Kroulíková^a, M. Fusek^b, and T. Ruml^a (^a*Department of Biochemistry and Microbiology and Center for Integrated Genomics, Faculty of Chemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*Sigma-Aldrich Ltd., Prague*): **Cathepsin D and its Role in Oncogenesis**

Cathepsin D (CD) is involved in oncogenesis particularly in the formation of breast tumors. The mechanism of its

contribution to the process remains to be elucidated. Expression of cathepsin D is stimulated by estrogen in mammary cancer cells. It is also known that CD is very actively secreted from the breast tumor cells. It has been suggested that its oncogenic role might be related to its proteolytic activity and degradation of a certain tumor suppressor or to proteolytic destruction of a complex of the growth factor with its binding protein. The released growth factor may subsequently interact with its own receptor and activate cell proliferation. Some experimental data show that the activation peptide, proteolytically released from procathepsin during its activation, may be responsible for the mitogenic activity of procathepsin D (pCD). On the contrary, some data suggest that CD secreted by prostate cancer cells stimulates the formation of angiostatin and thus prevents nutrition of the growing tumor. Such function of CD is severely decreased in the case of pCD that is secreted by breast cancer cells probably due to different glycosylation of the CD forms. This review evaluates the current opinion on the role of pCD and the activation peptide in the carcinogenesis.

Autorem obrázků v tomto čísle je Ing. Jan Budka, odborný asistent Ústavu organické chemie na VŠCHT Praha. Ing. Budka ilustroval již několik skript, naposledy Paleček, Hampl: Farmakochemie, VŠCHT Praha 2002, plakát k přednáškám Novartis Lecture a jeho kresby byly použity na několika konferencích, a v doktorských dizertačních pracích. V listopadu loňského roku uspořádal první výstavu svých kreseb v klubu Carbon na VŠCHT v Praze.

