

# MODIFIKACE PROTEINŮ V PRŮBĚHU STÁRNUTÍ ORGANISMŮ

JIŘÍ SAJDOK<sup>a</sup>, ANNA KOZAK<sup>a</sup>,  
JARMILA ZÍDKOVÁ<sup>a</sup>, PAVEL KOTRBA<sup>a</sup>,  
ALEXANDER PILIN<sup>b</sup> a JAN KÁŠ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-  
-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup>Ústav soudního  
lékařství, VFN v Praze, Studničkova 4, 128 00 Praha 2

Došlo dne 21.I.2000

Klíčová slova: abnormální proteiny, D-aminokyseliny v bíl-  
kovinách

## Obsah

1. Úvod
2. Spontánní změny konformace proteinů
3. Oxidace aminokyselinových zbytků
4. Deamidace a izomerace asparaginyly a glutaminyly
5. Racemizace aminokyselinových zbytků proteinů
  - 5.1. Kyselina D-asparagová
  - 5.2. D-Serin a ostatní D-aminokyseliny

## 1. Úvod

K nejvýznamnějším modifikacím bílkovin během stárnutí v podmínkách živých systémů patří vedle spontánních změn konformace proteinů i oxidace aminokyselinových zbytků (především prolylu, arginyly, lysyly a histidinyly), deamidace aspariginylů, glutaminyly a izomerace asparagové a glutamové kyseliny.

Akumulace abnormálních forem enzymů a ostatních (např. strukturálních) proteinů v průběhu stárnutí buňky a potažmo celého (mnohobuněčného) organismu je dána snižující se aktivitou specifických proteas, které preferenčně degradují modifikované formy daného proteinu nebo skutečnost, že se jedná o peptid či protein, který není obměňován a nebo nemůže být degradován z důvodu konformačních a nebo jiných změn. Abnormálním (modifikovaným) je zde rozuměn protein, jehož struktura byla pozmeněna v průběhu stárnutí modifikacemi chemické struktury nebo u kterého došlo ke spontánní změně konformace nebo racemizaci v něm obsažených aminokyselin bez změny primární struktury. Takové modifikace mohou vést ke změnám, které se v důsledku projeví změnou citlivosti daného proteinu vůči proteolytické degradaci<sup>1</sup>.

Aktivita specifických proteas, které mají v průběhu života buňky, mimo jiné, za úlohu udržovat co možná nejnižší podíl abnormálních forem proteinu je ovlivněna komplexním mechanismem regulujícím proces stárnutí resp. buněčnou apoptózu. Obecně se předpokládá, že aktivita proteas zodpovědných za recyklaci proteinů klesá s věkem jedince<sup>1</sup>. Gracy

a kol.<sup>2,3</sup> ukázali, že hladina kathepsinu B v *ex vivo* kultuře lidských fibroblastů klesá mezi 51. a 80. rokem věku donora. Další podporu tomuto předpokladu poskytuje přímá korelace mezi akumulací abnormálních forem glutaminsynthasy a glukosa-6-fosfátdehydrogenasy v krysích hepatocytech a poklesem aktivity proteas s neutrálním pH optimum<sup>4</sup>.

## 2. Spontánní změny konformace proteinů

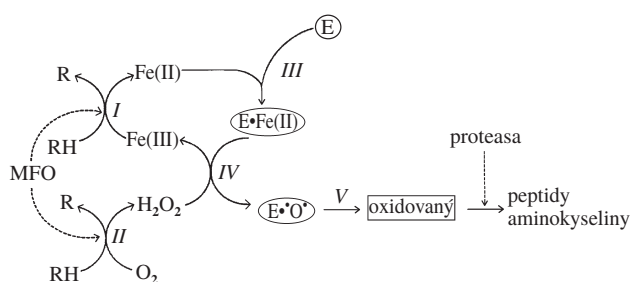
V některých případech bylo zjištěno, že enzymy, které nevykazovaly detegovatelnou změnu v primární struktuře se lišily např. v teplotní stabilitě, specifické katalytické aktivitě nebo kinetických parametrech. Tento rozdíl byl dán pouze stadiem ontogenetického vývoje organismu z něhož byl daný enzym izolován. Vzhledem k tomu, že během stárnutí organismu, je prodlužován biologický poločas rozpadu proteinů vlivem snížené „proteolytické aktivity“ buněk organismu, lze teoreticky očekávat zvýšenou pravděpodobnost výskytu samovolných změn v konformaci proteinů<sup>5</sup>.

Preparáty enolasy izolované z „mladých“ a „starých“ buněk *Turbatrix acetii* se lišily v teplotní stabilitě, spektrálních charakteristikách, kinetických parametrech a imunochemických vlastnostech<sup>6</sup>. Oba preparáty byly denaturovány v guanidinu HCl a po renaturaci byly získány proteiny, které vykazovaly naprosto shodné charakteristiky nezávisle na stáří zdrojových buněk. Podobné výsledky byly získány při renaturaci fosfoglycerát kinas krysího svalu<sup>7</sup>. V obou případech vykazovaly renaturované proteiny vlastnosti odlišné od charakteristik původních preparátů „starých“ (tj. abnormálních) a „mladých“ nemodifikovaných enzymů.

V dalších studiích s 3-fosfoglyceraldehyddehydrogenasou bylo ukázáno, že změna konformace může být *in vitro* způsobena kovalentní modifikací (jodací) Cys-149 a po restauraci Cys získává 3-fosfoglyceraldehyddehydrogenasa abnormální konformaci identifikovanou *in vivo*, jako důsledek stárnutí enzymu<sup>8,9</sup>.

## 3. Oxidace aminokyselinových zbytků

Řada proteinů (enzymů), konkrétně aminokyselinových zbytků tvořících vazebná místa pro tranzitní kov nebo aminokyselin v jeho blízkosti, je snadno oxidována enzymově nebo neenzymově, což vede ke ztrátě katalytické aktivity. Modifikované tj. „označené“ – proteiny podléhají proteolytické degradaci. Mechanismus tohoto procesu označovaného zkratkou MFO (z anglického mixed-function oxidation), je schematicky znázorněn<sup>11</sup> na obr. 1. V přítomnosti vhodného donoru elektronů, O<sub>2</sub> a Fe<sup>3+</sup> MFO katalyzuje vznik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a Fe<sup>2+</sup> (reakce I a II). Po vazbě Fe<sup>2+</sup> na enzym nebo jiný protein (reakce III) je generován aktivní kyslík (reakce IV), který oxiduje specifické aminokyselinové zbytky (reakce V). Řada autorů ukázala, že prostřednictvím MFO jsou konvertovány histidylové zbytky na asparaginylové nebo aspartylové a prolylové nebo arginylové jsou přeměněny na glutamylové popř. glutamylse-



Obr. 1. Schematické znázornění reakcí zahrnutých do procesu „mixed-function oxidation“ (MFO); RH – donor elektronů (NADPH, askorbová kyselina apod.), R – oxidovaný donor elektronů, E – enzym (popř. jiný protein schopný vázat  $\text{Fe}^{2+}$ ),  $\text{O}^{\bullet}$  – aktivní kyslík. Pořadí (sekvenci) reakcí MFO je možno nalézt v textu. Adaptováno z cit.<sup>1</sup>

mialdehyd<sup>1,11</sup>. Účast v MFO procesu je připisována řadě flavoproteinů, především tzv. NAD(P)H oxidasam<sup>10,12</sup>, xantinoxidase, křenové peroxidase nebo glukosaoxidase<sup>13</sup>. Vedle enzymových jsou známy i neenzymové systémy MFO jako např. systém zahrnující spoluúčast merkaptanů,  $\text{O}_2$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (cit.<sup>15</sup>).

Olivier a kol.<sup>15</sup> ukázali, že v průběhu stárnutí lidských erythrocytů je zvyšován podíl oxidovaných proteinů stanovený jako množství karboxylových skupin proteinů<sup>15</sup>. Tito autoři zároveň potvrdili, že množství proteinů oxidovaných prostřednictvím MFO v tkáňových kulturách lidských fibroblastů roste takřka exponenciálně s věkem donorů.

Množství oxidovaných proteinů nezáviselo na počtu *ex vivo* subkulturací a bylo tedy ovlivněno pouze genetickými faktory stárnutí. Tento závěr navíc potvrzují koncentrace oxidovaných proteinů v extraktech z fibroblastů pacientů postižených chorobami předčasněho stárnutí jako jsou progerie nebo Wernerův syndrom<sup>15</sup>.

#### 4. Deamidace a izomerizace asparaginyly a glutaminyly

Podobně jako oxidace prostřednictvím mechanismu MFO tak i deaminace asparaginyly a glutaminyly vede ke změně nábojových vlastností proteinu vyvolávajících řadu změn vlastností proteinu jako je termostabilita, senzitivita k proteasám, u enzymů pak afinita k substrátu nebo allosterickým efektům<sup>3</sup>. Pravděpodobný mechanismus deaminace Asn, zahrnující vznik L-sukcinimidu, jež je následně hydrolyzován za vzniku L-aspartylu<sup>1,16</sup>, je znázorněn na obr. 2. Poločas deamidace proteinů je závislý na aminokyselinové sekvenci, v níž se daný zbytek Asn nebo Gln nachází. To bylo prokázáno sledováním spontánní deamidace 70 pentapeptidů s Asn nebo Gln lokalizovaných v centrální pozici<sup>17</sup>. Poločas spontánní deaminace byl podle sekvence pentapeptidu 6 dní až 9 let (!), což naznačuje, že permissivita deaminace může hrát roli biologických hodin pro obrat proteinů. Nízký biologický poločas skutečně koreluje s počtem Asn a Gln v primární struktuře řady proteinů<sup>17</sup>.

Názor, že deamidace může hrát roli ve zvyšování množství abnormálních proteinů v průběhu stárnutí podporuje zvýšený výskyt deaminované formy triosafosfátisomerasy v extraktech tkáňových kultur fibroblastů u pacientů trpících Wernerovým syndromem a progerií<sup>2</sup>. Vznik kyselejší a labilnější formy

triosafosfátisomerasy, jejíž akumulace je závislá na stárnutí jedince, je dán postupnou deamidací dvou asparaginylových zbytků (Asn 71 a následně Asn 15).

#### 5. Racemizace aminokyselinových zbytků proteinů

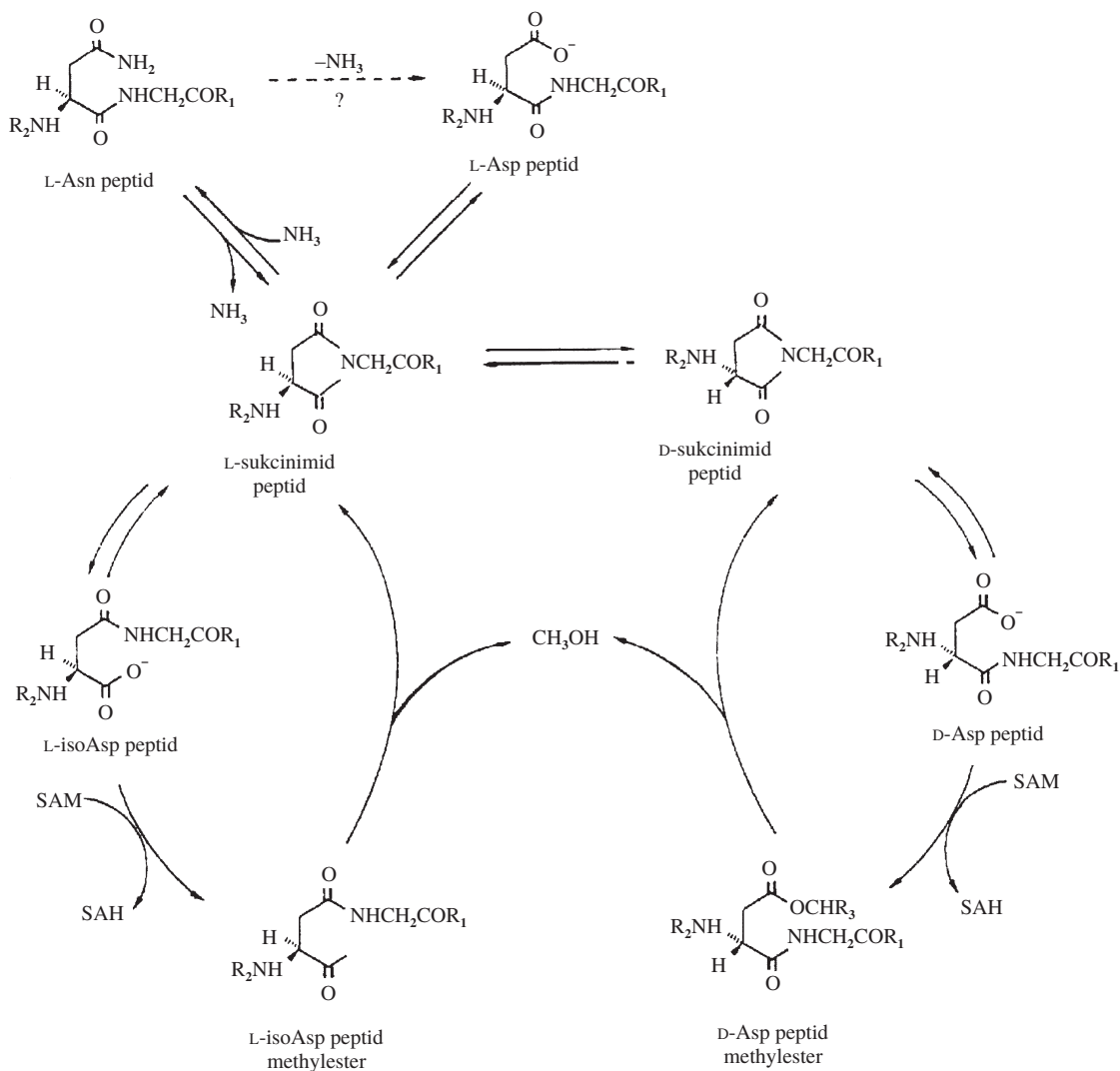
Skutečnosti, že biomolekuly a jejich komponenty mají chirální vlastnosti naznačil poprvé Louis Pasteur v roce 1858 a Emil Fisher roku 1891 předpověděl, že biologické makromolekuly jsou složeny z L-aminokyselin a D-cukrů<sup>18</sup>. Přírodní proteiny jsou skutečně složeny výhradně z L-aminokyselin. D-Enantiomery aminokyselin jsou součástí buněčných stěn gramnegativních bakterií<sup>19</sup>, celé řady antibiotik a jedů povahy oligopeptidů<sup>20</sup>. Skutečnost, že jsou proteiny tvořeny exkluzivně z L-enantiomerů, tedy podle přísného geometrického pravidla, pak předurčuje i jejich specifitu v protein-proteinových interakcích, vazbě substrátu do vazebného místa enzymu, stereospecifitu katalyzované reakce a řadu dalších vlastností.

Takováto geometricky determinovaná selektivita mohla být demonstrována díky rozvoji chemické syntézy peptidů. Dunn a kol.<sup>21</sup> ukázali, že retrovirální proteasa HIV-1 (99 aminokyselinových zbytků) syntetizovaná z D-enantiomerů aminokyselin byla schopna hydrolyzovat pouze substrát o D-konformaci, nikoliv L-substrát (přirozená HIV-1 proteasa tj. L-enantiomer, vykazuje opačnou substrátovou specifitu). Spontánní konverze L-enantiomeru na D v molekule proteinu a akumulace abnormálních forem proteinu v průběhu stárnutí organismu může vést ke ztrátě nebo negativní alteraci funkce daného proteinu. Na druhou stranu, některé literární údaje<sup>22</sup> naznačují, že přítomnost některých D-aminokyselin v molekulách proteinů se zdá být nutná právě pro funkčnost proteinu, opět s ohledem na geometrické vlastnosti<sup>22</sup>.

##### 5.1. Kyselina D-asparagová

Zvýšený výskyt kyseliny D-asparagové byl zaznamenán u kryš v některých částech mozku, v periferních orgánech jako nadledvinky, varlata a ledviny, ve frontálním kortexu lidského mozku, mozkomíšním moku, a kuřecím zárodku<sup>23–27</sup>. Množství D-Asp v jednotlivých tkáních je v těchto případech spjato s vývojovým stadiem jedince. Např. v kryším mozku představuje D-aspartyl 8,4 % asparagové kyseliny, ale tato hodnota klesá na 0,4 % 10 dní po narození<sup>23</sup>. V sítnici kryš stoupá zastoupení D-Asp z 10 % na 29 % 7 dní po narození, ale klesá na úroveň 1 % u jedinců starých 15 dní<sup>22</sup>.

Je zřejmé, že tyto přechodné výkyvy v zastoupení D-enantiomeru kyseliny asparagové souvisí s morfologickým a funkčním vývojem orgánů<sup>22</sup>. Nepředpokládá se však, že D-enantiomery jsou inkorporovány do nově syntetizovaného proteinového řetězce<sup>28</sup>, ačkoliv některé D-aminoacyl-tRNA mohou být syntetizovány<sup>29</sup>. Předpokládá se posttraslační konverze L-aspartylu na D-enantiomer a naopak. Specifická racemasa konvertující L-aminokyseliny na D-aminokyseliny však již byla nalezena u bezobratlých<sup>30</sup>. Nutnost enzymové konverze mezi jednotlivými enantiomery kyseliny asparagové podtrhuje relativně nízká rychlost ( $0,1 \text{ \% rok}^{-1}$ ) spontánní racemizace asparagylu popř. asparaginyly (mechanismus viz obr. 2) identifikovaná například u  $\beta$ -kryštalínu v lidských očních čočkách<sup>31</sup>.



Obr. 2. Role tvorby sukcinimidu a karboxymethylace při deamidaci, racemizaci a izomeraci aspartylu a asparaginyly; SAM – S-adenosylmethionin (aktivní methyl), SAH – S-adenosylhomocystein. Adaptováno z cit.<sup>1</sup>

D-Aspartyl byl také identifikován v membránových proteinech erythrocytů<sup>32</sup> a myelinu<sup>33,34</sup>, v peptidech a proteinech tvořících kosti a zuby.

## 5.2. D-Serin a ostatní D-aminokyseliny

D-Serin byl identifikován v lidském, krysím a prasečím myelinu<sup>34,35</sup>. Z fyziologického hlediska jsou zajímavější volné D-enantiomery aminokyseliny jako D-Ser nebo D-Ala, které zřejmě hrají roli allosterického efektoru N-methyl-D-aspartát receptoru. Dále je známo, že množství D-enantiomerů různých aminokyselin roste vlivem různých onemocnění jako jsou např. Alzheimerova choroba nebo ledvinová nedostatečnost (pro přehled<sup>22</sup>). Řízený vznik a fyziologická role D-enantiomerů aminokyselin v organismu zůstává však stále neobjasněna. Na konci roku 1999 byl oznámen objev specifické serinisomerasy, která izomeruje L-serin na D-serin. Tento nový objev může posunout úvahy o vzniku D forem aminokyselin v savčích tkáních<sup>36</sup>.

## LITERATURA

1. Stadtman E. R.: J. Gerontol. Biol. Sci. 43, B112 (1988).
2. Gracy R. W., Yuksel K. U., Chapman M. L., Cini J. K., Jahani M., Lu H. S., Oray B., Talent J. M., v knize: *Modification of Proteins During Aging* (Aldeman R. D., Dekker E. E., ed.), str. 427. Alan R. Liss, New York 1985.
3. Gracy R. W., Chapman M. L., Cini J. K., Jahani M., Tollefsbol T. O., Yuksel K. U., v knize: *Molecular Biology of Aging* (Woodhead A. D., Blackett A. D., Holleender A., ed.), str. 1. Plenum Press, New York 1985.
4. Starke-Reed P. E., Oliver C. N., v knize: *Oxygen Radicals in Biology and Medicine* (Simic M. G., Ward J. F., Taylor K. A., ed.), str. 137. Plenum Press, New York 1988.
5. Rothstein M., v knize: *Molecular Biology of Aging* (Aldeman R. D., Dekker E. E., ed.), str. 193. Alan R. Liss, New York 1985.
6. Sharma H. K., Rothstein M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5865 (1980).

7. Yuh K.-C., Gafni A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7458 (1987).
8. Gafni A., Noy N.: Mol. Cell. Biochem. 59, 113 (1984).
9. Gafni A.: *Modification of Proteins During Aging* (Alde-  
man R. D., Dekker E. E., ed.), str. 19. Alan R. Liss, New  
York 1985.
10. Fucci L., Oliver C. N., Coon M. J., Stadtman E. R.: Proc.  
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 1521 (1983).
11. Cooper B., Creeth J. M., Donald S. R.: Biochem. J. 228,  
615 (1985).
12. Nakamura K., Oliver C., Stadtman E. R.: Arch. Biochem.  
Biophys. 240, 319 (1985).
13. Stadtman E. R., Wittenberger M. E.: Arch. Biochem.  
Biophys. 239, 379 (1985).
14. Kim K., Rhee S. G., Stadtman E. R.: J. Biol. Chem. 260,  
15394 (1985).
15. Oliver C. N., Levine R. L., Stadtman E. R.: J. Am. Geriatr.  
Soc. 35, 947 (1987).
16. Geiger T., Clarke S.: J. Biol. Chem. 262, 785 (1987).
17. Robinson A. B., Rudd C. J.: Curr. Top. Cell Regul. 8, 247  
(1974).
18. Lamzin V. S., Dauter Z., Wilson K. S.: Curr. Opin. Struct.  
Biol. 5, 830 (1995).
19. Červinka O., v knize: *Chemie organických sloučenin I*  
(Červinka O., ed.), str. 78. SNTL/Alfa, Praha 1985.
20. Karlson P.: *Základy biochemie*, str. 53. Academia, Praha 1981.
21. Dunn B. M., Gustchina A., Wlodawar A., Kay J.: Meth-  
ods Enzymol. 241, 255 (1994).
22. Imai K., Fukushima T., Santa T., Homma H., Hamase K.,  
Sakai K., Kato M.: Biomed. Chromatogr. 10, 303 (1996).
23. Neidle A., Dunlop D. S.: Life Sci. 46, 1517 (1990).
24. Hashimoto A., Kumashiro S., Nishikawa T., Oka T.,  
Takahashi K., Mito T., Takashima S., Doi N., Mizutani  
Y., Yamazaki T., Kaenko T., Ootomo E.: J. Neurochem.  
61, 348 (1993).
25. Hashimoto A., Oka T., Nishikawa T.: Eur. J. Neurosci. 7,  
1657 (1995).
26. Fisher G. H., Petrucelli L., Gardner C., Emory C., Frey  
W. H. II, Amaduci L., Sorbi S., Sorrentino G., Borghi M.,  
D'Aniello A.: Mol. Chem. Neuropathol. 23, 115 (1994).
27. Imai K., Fukushima T., Hagiwara K., Santa T.: Anal.  
Chim. Acta 290, 3 (1995).
28. Mor A., Amiche M., Nicolas P.: Trends Biochem. Sci.  
17, 481 (1992).
29. Calendar R., Berg P. J.: Mol. Biol. 26, 39 (1967).
30. Shikata Y., Watanabe T., Teramoto T., Inouhe A., Kawa-  
kami Y., Nishizawa Y., Katayama K., Kuwaka M.: J.  
Biol. Chem. 270, 16719 (1995).
31. Masters P. M., Bada J. L., Zigler J. S., Jr.: Nature 268, 71  
(1977).
32. McFaden P. N., Clarke S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.  
79, 2460 (1982).
33. Fisher G. H., Garcia N. M., Payan I. L., Cadilla-Perezrios  
R., Sheremata W. A., Man E. H.: Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 135, 683 (1986).
34. Shapira R., JenChou C. H.: Biochem. Biophys. Res.  
Commun. 146, 1342 (1987).
35. Shapira R., Austin G. E., Mirra S. S.: J. Neurochem. 50,  
69 (1988).
36. Brennan M.: Chem. Eng. News (November 15).

*Práce je podporována grantem IGA MZ ČR č. 64753-3.*

**J. Sajdok<sup>a</sup>, A. Kozak<sup>a</sup>, J. Zídková<sup>a</sup>, P. Kotrba<sup>a</sup>, A. Pil-  
in<sup>b</sup>, and J. Káš<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Microbio-  
logy, Institute of Chemical Technology, Prague, <sup>b</sup>Department  
of Forensic Medicine, University Hospital, Prague*): **Protein  
Modification During Aging of Organism**

In the course of aging of organisms, various modifications of side chains of amino acid residues in proteins affect their biological stability and turnover. The main alterations in protein structure are: changes in conformation of proteins, oxidation of amino acid residues (mixed-function oxidation) and racemization of L-amino acids (glutamic and aspartic acids and serine) to corresponding D-forms. D-amino acids were found in bones, teeth, brain and eye lenses. It is generally accepted that the content of D-amino acids slowly increases with age due to a lower metabolic turnover. The discovery of specific D-serine racemase brings a new view of this topic.