

Budoucnost zinkových metaloproteinů v laboratorní medicíně

Kukačka J.¹, Kizek R.², Průša R.¹

¹Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2. LF a FN v Motole, Praha

²Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno

SOUHRN

Zinkové proteiny jsou nejpočetnější skupinou metaloproteinů lidského genomu. Jejich struktura je tak rozličná, jak pestré jsou funkce, které v organismu plní – od biokatalyzátorů, přes transportéry, detoxikanty až po transkripční faktory. Proteiny spojené se zinkem je možno formálně rozdělit na zinkové enzymy a zinkové neenzymové proteiny. Mezi nejpočetnější skupinu zinkových enzymů patří zinek dependentní metaloproteinázy. Zástupci této skupiny enzymů se účastní procesů, jako je embryonální vývoj, formace kostí, reprodukce, artritida nebo nádorové procesy. Pro přehlednost a zařazování proteináz byly vytvořeny různé klasifikační systémy. V této práci je použit systém MEROPS, který rozděluje proteinázy na základě strukturních podobností. V přehledu biologických funkcí vybraných zinkových metaloproteináz u člověka jsou uvedeny významné skupiny enzymů, jakými jsou aminopeptidáza N, neprilysin, karboxypeptidázy, ADAM enzymy a zvláště matrixiny. Mezi zinkové neenzymové proteiny patří proteiny pro distribuci zinku, proteiny se zinkovými prsty a metalothioneiny. V současnosti jsou známy dvě rodiny proteinů zodpovědných za transport zinku, ZnT proteiny a Zip proteiny. Jakákoliv porucha regulace transportu zinku prostřednictvím jejich specifických transportérů je většinou spojena se specifickým onemocněním. Také ve skupině proteinů se zinkovými prsty, které většinou fungují jako transkripční faktory, byla prokázána přímá souvislost mezi proteinem a určitým onemocněním. Příkladem je Wilmsův nádor nebo některé neurodegenerativní poruchy. Metalothioneiny, superrodina neenzymatických peptidů s malou molekulovou hmotností a s unikátní aminokyselinovou sekvencí, mají mnoho biologických funkcí. Mezi hlavní patří funkce imunoregulační, neuroprotektivní, metaloregulační a detoxikační. Zájem o tyto molekuly vzrůstá díky tomu, že jsou to nadějně tumorové markery a že jsou příčinou chemorezistence v léčbě nádorových onemocnění. Také o jiných zinkových metaloproteinech se uvažuje jako o perspektivních diagnostických markerech. V laboratorní medicíně se tak otevírají nové možnosti diagnostického využití zinkových metaloproteinů.

Klíčová slova: metaloproteiny, zinek, metaloproteinázy, zinkové prsty, metalothionein.

SUMMARY

Kukačka J., Kizek R., Průša R.: Future of zinc metalloproteins in laboratory medicine

Zinc proteins are the most numerous group of metalloproteins in the human genome. Their structure is as diverse as their function in organism, which ranges from biocatalysts, transporters, detoxicants to transcription factors. It is common to divide zinc proteins formally into group of zinc enzymes and group of zinc non-enzymatic proteins. The most abundant zinc enzymes are zinc-dependent metalloproteinases. Members of this group of enzymes are implicated in processes including embryonic development, bone formation, reproduction and arthritis or tumor growth. For lucidity and proteinases organising were created various one-term systems. In this work we used the system MEROPS, where proteinases are assigned to families on the basis of structure similarities. In this overview of biological functions of selected human zinc metalloproteinases are listed important enzyme groups such as aminopeptidase N, neprilysin, carboxypeptidases, ADAM enzymes, and especially matrixins. Proteins for zinc transport, zinc fingers proteins, and metallothioneins belong between zinc non-enzymatic proteins. Two protein families have now been implicated in zinc transport, ZnT proteins and Zip proteins. Any dysregulation in zinc transport via the specific protein transporters have been linked to specific diseases. Direct connection between protein and specific disease was proofed also in the group of zinc fingers proteins functioned as transcription factors. The examples are Wilm's tumour or some neurodegenerative disorders. Metallothioneins, the superfamily of non-enzymatic peptides with low molecular mass and with unique sequence of amino acids, play many important biological roles, including immunoregulation, neuroprotection, metalloreulation, and detoxification. The interest in these molecules has been increased because they were found as promising tumour markers. They are also responsible for platinum cytostatic chemoresistence in treatment of tumour diseases. Also other zinc metalloproteins are hoped to be perspective diagnostic markers. There is a new promising field of their diagnostic use in laboratory medicine.

Key words: metalloproteins, zinc, metalloproteinases, zinc fingers, metallothionein.

Úvod

Důležité reakce v celé biosféře, jako je např. produkce energie při fotosyntéze nebo oxidativní fosforylace, jsou katalyzovány bílkovinnými látkami obsahujícími ve své struktuře jeden nebo více kovových prvků – **metaloproteiny**. Používání kovových prvků živými systémy je překvapující svým pozoruhodným funkčním rozsahem. Zahrnuje základní chemické reakce, jako je transport elektronů, přenos a aktivace kyslíku, hydrolyza, přenos a přeměna funkčních skupin. Významné jsou také procesy, při kterých nedochází k tvorbě

nebo zániku vazby, jako je např. tok draselných nebo sodných iontů napětově řízenými kanály. Atomy kovů mohou tvořit relativně silné chemické vazby s jejich ligandy. V molekulách proteinů, kde většina stavebních aminokyselin obsahuje potenciální donorové skupiny (imidazolové, karboxylové, karbonylové, hydroxylové, thiolové nebo thioesterové), může docházet k vazbám atomů kovů do jejich struktur. Důležitým aspektem chemie kovů je to, že stejný kov se může účastnit řady rozličných reakcí v závislosti na prostředí, které jej obklopuje. Tím se myslí prostředí biomolekuly, která jej váže. Patrné je to např. u železa v hemu, který může plnit funkci reverzibilního transportéru elektronů (např.

v cytochromu), nosiče molekuly kyslíku (tak, jak je tomu např. v hemoglobinu) nebo aktivátoru (cytochrom P 450). Ačkoliv je ve všech uvedených případech reakční kovové centrum identické, jeho reaktivita se odvíjí od charakteru zbytku molekuly. Chování kovového centra je výsledkem jemné souhry mezi termodynamickými vlastnostmi kovu, diktovanými jeho koordinační chemií, a stabilitou proteinových konformací. V extrémních případech je funkce kovu klíčová. Tak např. u molekulových domén se zinečnatými prsty nedojde ke svinutí proteinu, pokud zde zinek chybí [14].

Proteiny spojené se zinkem lze formálně rozdělit na:

1. zinkové enzymy,
2. zinkové neenzymové proteiny (proteiny pro distribuci zinku, proteiny se zinkovými prsty a metalothioneiny).

Zinkové enzymy

Prvním objeveným enzymem obsahujícím zinek byla v roce 1940 anhydráza kyseliny uhličitě [17]. V současnosti jsou známy již stovky enzymů obsahujících v molekule zinek. S rozvojem technik schopných detailní strukturní analýzy byla u většiny z těchto enzymů objasněna katalytická role zinku. Biologické vlastnosti zinkových enzymů se odvíjejí od jejich jedinečné struktury. Až asi na dvě výjimky jsou molekuly zinkových enzymů tvořeny převládajícími beta-strukturami, ty se podílejí na velmi stabilním svinutí molekuly, které vytváří nezvyklou architekturu molekuly v okolí místa pro vazbu kovového iontu, a to i v případě jeho nepřítomnosti. Atakující skupiny aktivního místa enzymů katalyzujících větší substráty, tedy v našem případě zinkem vázaná voda a blízké organické postranní řetězce, musí projevovat jistou lokální pohyblivost. Teprve tehdy je zajištěna rychlá přeměna substrátů a uvolnění produktů a koordinace celého systému. Jak zinek, tak přeměňované substráty jsou vázány pomocí postranních řetězců proteinové molekuly, ty jsou poněkud flexibilní, protože mají β -CH₂-sekce, které jsou naprosto odlišné od podobných struktur pro vazbu kovových iontů (např. v Fe₄S₄, cytochromech, vitamínu B₁₂ nebo enzymu F-430). Velké množství extracelulárních enzymů s podobnou funkcí má dva nebo více zinečnatých iontů v aktivním místě. Velká většina těchto enzymů se účastní degradace a organizace extracelulární hmoty.

Je jenom několik cytoplazmatických enzymů, které se liší od předchozích. Pravděpodobně pouze ve dvou případech mají aktivní místa pouze kyslík-donorové ligandy a v jednom případě (fosfolipáza C) má aktivní místo N- a O-donorové ligandy. Tyto proteiny mají zcela helikální strukturu. Jeden nebo dva enzymy mají N/S ligandy a váží zinečnatý ion velmi pevně. U některých zinkových enzymů je sice zinek vázán na molekulu, ale ne v aktivním místě. Zinek u těchto enzymů slouží jako příčná vazba (cross-link) mezi thiolovými skupinami, obvykle čtyřmi nebo kombinací thiolů a histidinů vytvářejících celkem čtyři ligandy. Toto je takzvaně dvojitá nebo svázaná příčná vazba a nachází se u cytoplazmatických proteinů, jako je např. alkoholdehydrogenáza. Tato příčná vazba by mohla být částečně náhradou za

–S-S- nebo vápenaté můstky extracelulárních proteinů, protože uvnitř buněk je většina –S-S- můstků nestabilní a podléhá redukci a vápenaté příčné vazby jsou nestabilní v cytoplasmě vzhledem k nízké koncentraci Ca.

Zinek u zinkových enzymů není uplatňován jen skrze hydrolytické procesy v hotovém enzymu, uplatňuje se i v různých stupních jeho syntézy v cytoplasmě. Typickým příkladem za všechny může být přítomnost zinku v molekule reverzní transkriptázy a RNA polymerázy. Jiným příkladem může být uplatnění zinku v syntéze rostlinných zinkových enzymů, které zde plní podobnou funkci pro přenos metylových skupin jako u živočichů vitamin B₁₂ a v něm obsažený kobalt.

Skupina zinek dependentních metaloproteináz

Struktura a rozdělení zinek dependentních metaloproteináz

Zinek dependentní metaloproteinázy (Zn-metaloproteinázy) jsou nejpočetnější skupinou zinkových enzymů a jsou velmi rozšířené napříč všemi říšemi, mezi prokaryotními i eukaryotními organismy. Zástupci této skupiny enzymů se účastní různých procesů, jako je embryonální vývoj, formace kostí, botulinová nebo tetanová toxicita, reprodukce, artritida nebo nádorové procesy. Přibližně v posledních 20 letech počet objevů nových enzymů z této skupiny stoupl do té míry, že pro jejich klasifikaci je vhodné používat především kritérium jejich strukturní příbuznosti. Porovnáním aminokyselinové sekvence kolem ústředního strukturního motivu HEXXH došlo k rozlišení mezi pěti základními skupinami Zn-metaloproteináz, a to na termolysiny, astakiny, „serratia“ enzymy, matrixiny a prolysin metaloproteinázy [16]. Později byly do Zn-metaloproteináz začleněny další 4 skupiny enzymů, které mají rozšířené vazebné místo pro zinek HEXXHXXGXXH, v němž třetí histidinový zbytek funguje jako třetí ligand zinku místo více vzdálené kyseliny glutamové v termolysinu. Pro tyto skupiny enzymů byl zaveden název **metzinkiny**. Obsahují tzv. **methioninový ohyb** (Met-turn) a díky němu mají i podobnou konformaci. Obdobně pro všechny enzymy shodující se v již zmiňovaném strukturním motivu HEXXH se ujal název **zinkiny**. Pro přehlednost a zařazování proteináz byly vytvořeny různé klasifikační systémy. V této práci je použit systém MEROPS (Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, Velká Británie), který rozděluje proteinázy do jednotlivých systémů klanů a subklanů, rodin a subrodin na základě strukturních podobností (<http://merops.sanger.ac.uk/>) [31]. Tato databáze shromažďuje informace o zhruba 3000 známých proteolytických enzymech a jejich inhibitech. **Klan** je skupina peptidáz, které vznikly evolučně z jednoduchého společného předchůdce. Každý klan v sobě zahrnuje jednu nebo více enzymových rodin, které vykazují svoji evoluční příbuznost, co se týče terciární struktury. Pokud není struktura známa, jsou do klanu zařazené podle podobnosti reziduí katalytického

místa v polypeptidovém řetězci a ještě častěji podle obvyklého sekvenčního motivu kolem katalytických reziduí. Každý klan je identifikován dvěma písmeny: první uvádí katalytický typ rodin zahrnutých v klanu a druhé je samotné označení klanu. Některé rodiny nebyly ještě začleněny do klanů. Některé klany jsou rozděleny na subklany, protože je zřejmá jejich prastará odlišnost uvnitř klanu, např. MA(E) gluzinkiny a MA(M) metzinkiny. **Rodina** je soubor **homologních peptidáz**. Homologie se projevuje významnou podobností v aminokyselinové sekvenci každého typu peptidázy v rodině nebo jiného proteinu, který je nějakému typu peptidázy podobný. Podobnost musí existovat minimálně v peptidázové jednotce. Rodina může obsahovat pouze jednu peptidázu, pokud žádný jiný homolog k ní ještě nebyl přiřazen. A naopak, samotný genový produkt, jako je např. virový polyprotein, může obsahovat více než jednu peptidázu zařazenou do různých rodin. Každá rodina je označena písmenem a unikátním číslem podle katalytických vlastností (A-aspartátové proteázy, C-cysteinové, G-glutamové, M-metaloproteinázy, S-serinové, T-treoninové, U-neznámé), některé rodiny se dělí ještě do **subrodin**.

Přehled biologických funkcí vybraných Zn-metaloproteináz u člověka

Aminopeptidáza N (M01.001) v ledvinách je důležitá pro inaktivaci v krvi vzniklých polypeptidáz, jako např. enkefalinů, substance P a interleukinu 8, zároveň se účastní proteolýzy v tenkém střevě. Enzymy této rodiny, které jsou membránově vázané, jsou známé jako povrchové antigeny, např. aminopeptidáza N jako marker **CD 13** u myeloidní leukémie.

Peptidyldipeptidáza A (M02.005) má velký význam v regulaci krevního tlaku. Štěpením C koncového dipeptidu His-Leu z angiotenzinu I vzniká potentní oktapeptidický vazopresor angiotenzin II. Většina peptidáz je syntetizována bez signálního peptidu nebo propeptidu a působí intracelulárně. Mitochondriální intermediární peptidáza je určitou výjimkou a obsahuje typický vedoucí mitochondriální peptid.

Jedna z funkcí peptidáz v rodině M3 je intracelulární degradace oligopeptidů. To zahrnuje štěpení signálního peptidu a tvorbu degradačních produktů. U obratlovců mohou být některé tyto peptidy navázány MHC třídou [39]. Mnoho savčích biologicky aktivních peptidů je excelentními substráty pro působení oligopeptidáz, jako je **thimet oligopeptidáza** nebo **neurolysin**.

Neprilysin (M13.001), metaloproteináza fungující v neutrálním pH prostředí, byl objeven v kartáčové stěně membrán Kennym a jeho kolegy. Působí v okolí buněk, kde degraduje a přeměňuje polypeptidové substráty. Fyziologické substráty enzymů z rodiny M41 jsou hlavně membránové proteiny. U člověka je zajímavý především mitochondriální

proteinový homolog **paraplegin** (M41.006). Mutace genu pro paraplegin jsou spojené s autozomální formou hereditární spastické paraplegie [3]. Přehled Zn-metaloproteináz uvádí tabulka 1.

Leishmanolysin z rodiny M8 je nejvíce zastoupeným povrchovým proteinem promastigót Leishmanií a může velmi významně přispět k virulenci těchto parazitů. Tento enzym je zodpovědný za prostup parazita přes extracelulární matrix hostujícího organismu [24].

Početná skupina **matrixinů** (M10) je hlavní skupinou enzymů degradujících extracelulární matrix. Matrixiny (MMP) byly prokázány jak u obratlovců, tak u bezobratlých, a dokonce i u rostlin. Vývojově však vznikly z daleko nižších organismů; důkazem je např. 59% shodná aminokyselinová sekvence pro metaloproteinázový toxin-2 organismu *Bacteroides fragilis* s 27. aminokyselinovým řetězcem lidské intersticiální kolagenázy (MMP-1). Tyto enzymy se účastní většiny procesů, které degradují pojivovou tkáň, podílejí se na řadě dějů v průběhu ontogenetického vývoje (morfogeneze, angiogeneze, růst, procesy spojené s hojením ran) [19, 20]. Změněnou expresi a aktivitu MMP pozorujeme i ve většině zánětlivých, degenerativních a především maligních procesů, spojených se zvýšenou syntézou, degradací nebo porušenou maturací a organizací extracelulární matrix (ECM) [19]. V době vzniku této práce bylo známo 24 lidských matrixových metaloproteináz, pro jejich označení se používá zkratka MMP plus arabská číslice.

Metaloproteinázy z rodiny M8 jsou obvykle proteiny syntetizované se signálním peptidem jako propeptidy. Adamalysin **ADAM 17** je také známý jako TNF- α konvertující enzym, enzym zodpovědný za limitované proteolytické procesy. Endopeptidáza **ADAMTS13** (M12.241), také známá jako proteáza von Willebrandova faktoru, působí jako normální ochrana před von Willebrandovou chorobou.

Enzymy z rodiny M14 jsou molekuly syntetizované bez signálních peptidů, ale jsou to zároveň propeptidy, které musí být přeměněny na aktivní enzymy. Zralé enzymy jsou obvykle rozpustné (např. **karboxypeptidáza A**, **karboxypeptidáza B**, **karboxypeptidáza U** (M14.009)), ale **karboxypeptidáza M** (M14.006) je membránově vázaná pomocí glykosylfosfatidylinositolové kotvy. Funkce těchto enzymů je velmi rozličná. Zahrnuje trávení potravy (pankreatická karboxypeptidáza A a B) nebo přeměnu bioaktivních peptidů (**karboxypeptidáza E**, M14.005).

Medicínsky zajímavou metaloproteinázou ze skupiny M16 je **indulysin** (M16.002), který je fyziologicky významnou α -sekretázou, a který degraduje amyloidogenní beta-peptidy při Alzheimerově chorobě [8]. V tabulce 2 je uveden přehled známých MMP.

Savčí **leucylaminopeptidáza** z rodiny M17 je cytosolický enzym produkovaný ke štěpení peptidů, které vznikají činností intracelulárních proteináz. Je to jeden z enzymů, který je schopen stříhat peptidy produkované proteozómem pro antigenní třídu I a jeho gen je promotován interferonem gama [4].

Table 1. Survey of zinc dependent metalloproteinases occurring in animals and humans

Clan	Family	Family contents	Prototype enzyme	EC nomenclature	Alternative family name
MA	M1	Aminopeptidases	Aminopeptidase N	EC 3.4.11.2	
	M2	Metalloexopeptidases	Angiotensin-converting enzyme (ACE)	EC 3.4.15.1	
	M3	Metallopeptidases with different activity	Thimet oligopeptidase (<i>Rattus norvegicus</i>)	EC 3.4.24.15	
	M13	Metalloendopeptidases limited to substrates smaller than proteins	Neprilysin	EC 3.4.24.11	Neprilysins
	M41	ATP-dependent metallopeptidases	FtsH peptidase (<i>E.coli</i>)	Missing	Family of FtsH endopeptidase
	M48	Metalloendopeptidases	Ste 24 peptidases (<i>S.cerevisiae</i>)	EC 3.4.24.84	Family Ste 24 endopeptidases
	M8	Metalloendopeptidases leishmanolysin and its homologues	Leishmanolysin (<i>Leishmania major</i>)	EC 3.4.24.36	Leishmanolysins
	M10	Metalloendopeptidases	Collagenase 1	EC 3.4.24.7	Matrixins
	M12	Metalloendopeptidases	Astakin (<i>Astacus astacus</i>)	EC 3.4.24.21	Astakins and adamalysins
	M43	Metalloendopeptidases	Cytofagalsin (<i>Cytophaga sp.</i>)		Cytofagalsins
MC	M14	Metallo-carboxypeptidases	Carboxypeptidase A1	EC 3.4.17.1	Family of carboxypeptidase A
ME	M16	Metalloendopeptidases	Pytrilysin (<i>E.coli</i>)	EC 3.4.24.55	Pytrilysins
MF	M17	Aminopeptidases	Leucylaminopeptidase (<i>Bos taurus</i>)	EC 3.4.11.1	Family of leucylaminopeptidase
MH	M28	Aminopeptidases and carboxypeptidases	Aminopeptidase S (<i>Streptomyces griseus</i>)		Family of aminopeptidase Y
	M20	Exopeptidases, carboxypeptidases, dipeptidases and specialized aminopeptidases	Glutamate carboxypeptidase (<i>Pseudomonas sp.</i>)	EC 3.4.17.11	
	M18	Metalloendopeptidases	Aminopeptidase I (<i>S.cerevisiae</i>)	EC 3.4.11.2	
MJ	M19	Dipeptidases	Membrane dipeptidase	EC 3.4.13.19	Membrane dipeptidase
	M38	Omega peptidases	Isoaspartyl dipeptidase (<i>E.coli</i>)		Betaaspartyl-dipeptidases
MK	M22	Endopeptidases, splitting only O-sialoglycosylated proteins	O-sialoglycoprotein-peptidase (<i>Mannheimia haemolytica</i>)	EC 3.4.24.57	
MM	M50	Metalloendopeptidases	S2P peptidase	EC 3.4.24.85	S2P family
MO	M23	Endopeptidases cleaving peptidoglycans of bacterial wall	β -lytic metallopeptidase (<i>Achromobacter lyticus</i>)	EC 3.4.24.32	
MP	M67	Isopeptidases releasing ubiquitin from ubiquitinated proteins	Poh 1 peptidase (<i>S.cerevisiae</i>)		
M-	M49	Dipeptidyl peptidases	Dipeptidyl peptidase III (<i>Rattus norvegicus</i>)	EC 3.4.14.4	Family of dipeptidylpeptidase
	M76		Atp23 peptidase		

In the MEROPS nomenclature the Prototype enzyme has always a code in the form of M (number of family).001

Table 2. Survey of known MMP

Classification of matrix metalloproteinases				
MMP	Alternative name	EC number	Chromosome	Substrates
MMP-1	Collagenase (Type I, interstitial)	EC3.4.24.7	11q22-q23	Collagens (I,II,III,VIII and X); gelatin; aggrecan; L-selectin; IL-1 β proteoglycans; entactin; ovostatin; MMP-2; MMP-9
MMP-2	Gelatinase A 72 kDa Gelatinase Type IV Collagenase	EC3.4.24.24	16q13	Collagens (I,IV,V,VII,X,XI and XIV); gelatin; elastin; fibronectin; aggrecan; MBP; osteonectin; laminin-1; MMP-1; MMP-9; MMP-13
MMP-3	Stromelysin-1 Proteoglycanase	EC3.4.24.17	11q23	Collagens (III,IV,V, and IX); gelatin; aggrecan; perlecan; decorin; laminin; elastin; casein; osteonectin; ovostatin; entactin; plasminogen; MBP; IL-1 β ; MMP-2/TIMP-2; MMP-7; MMP-8; MMP-9; MMP-13
MMP-7	Matrilysin Putative MMP	EC3.4.24.23	11q21-q22	Collagens (IV a X); gelatin; aggrecan; decorin; fibronectin; laminin; entactin; elastin; casein; transferrin; plasminogen; MBP; β 4-integrin; MMP-1; MMP-2; MMP-9; MMP-9/TIMP-1
MMP-8	Neutrophil Collagenase	EC3.4.24.34	11q21-q22	Collagens (I,II,III,V,VII,VIII a X); gelatin; aggrecan; fibronectin
MMP-9	Gelatinase B	EC3.4.24.35	20q11.2-q13.1	Collagens (IV,V,VII,X a XIV); gelatin; entactin; aggrecan; elastin; fibronectin; osteonectin; plasminogen; MBP; IL-1 β
MMP-10	Stromelysin-2	EC3.4.2.22	11q22.3-q23	Collagens (III-V); gelatin; casein; aggrecan; elastin; MMP-1; MMP-8
MMP-11	Stromelysin-3	unclassified	22q11.2	unknown (casein)
MMP-12	Macrophage metalloelastase	EC3.4.24.65	11q22.2-q22.3	Collagen IV; gelatin; elastin; casein; fibronectin; vitronectin; laminin; entactin; MBP; fibrinogen; fibrin; plasminogen
MMP-13	Collagenase-3	unclassified	11q22.3	Collagens (I, II, III, IV,I X, X and XIV); gelatin; plasminogen; aggrecan; perlecan; fibronectin; osteonectin; MMP-9
MMP-14	MT1-MMP	unclassified	14q11-q12	Collagens (I-III); gelatin; casein; fibronectin; laminin; vitronectin; entactin; proteoglycans; MMP-2; MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	unclassified	16q12.2-q21	Fibronectin; entactin; laminin; perlecan; MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	unclassified	8q21	Collagen III; gelatin; casein; fibronectin; MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	unclassified	12q24	unknown
MMP-18	Collagenase-4	unclassified	unknown	Collagen (I,II,III,VIII a X); gelatin; aggrecan
MMP-19	RASI-1	unclassified	12q14	Gelatin; aggrecan; fibronectin
MMP-20	Enamelysin	unclassified	unknown	Amelogrenein; aggrecan
MMP-21		unclassified	1p36.3	unknown
MMP-22		unclassified	1p36.3	unknown
MMP-23		unclassified	unknown	unknown
MMP-24	MT5-MMP	unclassified	20q11.2	unknown
MMP-25	Leukolysin/MT6-MMP	unclassified	16p/3.3	Pro-gelatinase A; fibrin; fibronectin; collagen IV; gelatin
MMP-26	Endometase, matrilysin-2	unclassified	unknown	gelatin I α ; P1; fibrinogen; fibronectin; vitronectin
MMP-28	Epilysin	unclassified	17q11.2	Casein

Glutamátkarboxypeptidáza II (M28.010) degra- duje neuropeptidy Ac-Asp-Glu v mozku a zároveň přeměňuje folylpolygamaglutamát na pterorylglutamát ve střevě. V rodině M28 se nachází mnoho neprotei- názových analogů jako např. receptor pro transferin (M28.972).

Savčí **aspartylaminopeptidáza** z rodiny M18 je cytozolový enzym, který pravděpodobně přispívá ke katabolickým přeměnám peptidů. Mohl by přispívat k N-terminálnímu štěpení peptidů, které jsou určeny pro MHC třídu I.

Membránová dipeptidáza z rodiny M19 je lokalizo- vaná na povrchu buněk kartáčového lemu v ledvinách, plicích, střevech a v pankreatických sekrečních granu- lech, kde je upevněna pomocí glykosylfosfatidylinosi- tolové kotvy. Je syntetizovaná se signálním peptidem a C-koncovou hydrofobní doménou, která je odstra- něna v posttranslačních procesech. Membránová dipeptidáza inaktivuje leukotrien D4 přeměnou na leu- kotrien E4; účastní se také degradace extracelulárního glutathionu, štěpí dipeptid Cys-Gly po glutamátu, který byl odstraněn γ -glutamyltranspeptidázou.

S2P peptidázy jsou zapojeny do regulace genové exprese proteolýzou transkripčních faktorů. S2P pep- tidáza v savčí membráně endoplazmatického retikula uvolňuje N-koncovou doménu transkripčního faktoru z membránově vázaných SREBP (sterol regulatory ele- ment-binding protein), uvolněná doména pak vstupuje do jádra a aktivuje geny pro kontrolu příjmu a syntézy cholesterolu [40].

Proteiny, které mají být degradovány proteozómem, musí být nejdříve rozbaleny a ubiquitinové volné konce musí být odstraněny, to vše dělají komplexy PA700, 19S a komplex **COP9** z rodiny M67. **AMSH proteináza** ze stejné rodiny je spojená s endozómem a ovlivňuje stupeň přeměn ubiquitinovaných proteinů určených k degradaci. **Poh1 peptidáza** je důležitá k zachování mitochondriální integrity, především prostřednictvím své C-koncové domény [32].

Dipeptidylpeptidáza III (DPPIII, M49.001) z rodiny M49 je bohatě rozšířený cytozolický enzym, prav- děpodobně určený pro vnitřní potřebu katabolismu intracelulárních enzymů. Hodnoty DPPIII jsou zvýšeny v séru získaném z retroplacentální krve v porovnání s normálním sérem, což nasvědčuje tomu, že se může podílet na zvýšení hydrolyzy angiotenzinu pozorované během těhotenství [33].

Neenzymové metaloproteiny obsahující zinek

Proteiny pro distribuci zinku

První gen pro savčí transportér zinku ZnT1 byl identifikován v roce 1995. Před tím bylo nahlíženo na transport zinku v živočišných organismech tak, že se děje prostřednictvím anionických komplexů, jako jsou např. aminokyselinové (cystein nebo histidin) cheláty nebo prostřednictvím transferinových receptorů. V sou- časnosti jsou známy dvě rodiny proteinů zodpovědných za transport zinku. **ZnT proteiny** snižují intracelulární

zinek ovlivněním efluxu Zn z buněk nebo influxu do intracelulárního prostoru. **Zip proteiny** (Zrt- a Irt-like proteins) usnadňují zinku transport z extracelulární tekutiny nebo z intracelulárních vezikulů do cytoplaz- my [28].

Savčí ZnT rodina se skládá z 10 členů (ZnT1-10). Transportní aktivita zinku byla pro většinu z nich (ZnT1,2,4-8) potvrzena nezávisle přežitím buněk v médiu o vysoké koncentraci zinku přímo měřením absorpce/efluxu zinku nebo jeho akumulací v tran- fektovaných nebo mutovaných savčích buňkách, kva- sinkách nebo oocytech [6]. Transportní mechanismus zprostředkovaný ZnT proteiny je neznámý. Buněčná extruze zinku a ukládání Zn v buněčných vezikulech probíhá proti koncentračnímu spádu a je tedy pravdě- podobné, že ZnT proteiny fungují jako druhotné aktivní přenašeče nebo možná antiportery.

Existuje nápadná sekvenční homologie mezi lid- skými ZnT proteiny. Sekvence se liší velikostí a většina z nich má 6 transmembránových domén s výjimkou ZnT5, který jich má 12. Tyto proteiny mají jak N, tak C-terminální doménu na cytoplazmatické straně. Navíc většina ZnT proteinů má dlouhou intracelulární smyčku s proměnlivým počtem histidinových zbytků. Tyto smyčky by měly vázat zinek, a tedy fungovat jako iontově-vazebné domény [26].

Savčí Zip rodina proteinů se skládá ze 14 členů. Jejich schopnost přenášet Zn byla potvrzena pro Zip1-8 a 14 použitím transfekce DNA do savčích buněk (lid- ských embryonálních ledvinových, K562 a křeččích ovariálních). Transportní aktivita byla měřena absor- bováním ^{65}Zn nebo použitím prób, které produkovaly emisi fluorescence. Mechanismus transportu Zn, který zprostředkovávají Zip proteiny není zcela pochopen. Absorpce zinku by mohla být řízena koncentračním gra- dientem, hZip1 a hZip2 přenašeče totiž nepotřebují ATP. Zip-dependentní transport je indukován anionty HCO_3^- a to poukazuje na mechanismus symportu [10].

Zip rodina může být rozdělena do 4 subrodin: Zip I, Zip II, gufA a LZT [6]. Většina savčích Zip proteinů včetně Zip4-8, Zip10 a Zip12-14 patří do LZT subrodiny. Zip1-3 jsou ze Zip II subrodiny; Zip9 ze Zip I subrodiny a Zip11 patří do gufA subrodiny. Většina Zip proteinů obsahuje 8 transmembránových domén, ale Zip6 jich má jenom 6. Transmembránové domény IV a I jsou vysoce konzervativní a mohou tvořit póry, skrze které procházejí kovové ionty. Zip proteiny obsahují N a C-ter- minální doménu a dlouhou intracelulární smyčku s opakujícími se sekvencemi bohatými na histidin [6]. Na druhé straně imunohistochemické studie ukazují, že Zip14 má na histidin bohatou smyčku v extracelulár- ním prostoru [23]. Přítomnost specifických strukturních motivů může umožňovat Zip proteinům i jiné funkce, než je pouze transport Zn. Například metaloproteiná- zový motiv (HEXPHEXGD) v subrodině LZT proteinů dovolu- je těmto proteinům fungovat jako matrixové metaloproteinázy, nebo se účastnit katalytických procesů těchto enzymů [6].

Většina ZnT proteinů byla nalezena v intracelulár- ních kompartmentech, obvykle spojených s endozómy, Golgiho komplexem nebo endoplazmatickým retikulem.

ZnT1 je jediným transportérem umístěným v plazmatické membráně, a je tak prvním regulátorem kontrolujícím buněčný Zn eflux. ZnT2 je lokalizován ve vezikulech pankreatických acinózních buněk. ZnT1 má také vezikulární lokalizaci, ale nachází se i v plazmatické membráně [22]. ZnT9 se nachází v buněčném jádru během mitózy [34]. Molekuly ZnT5 jsou lokalizovány v sekrečních váčcích pankreatických beta buněk a apikálních membránách enterocytů. ZnT10 by mohl být umístěn v plazmatické membráně, jak to ukazují některé softwarové výpočty. Většina Zip proteinů byla pozorována v plazmatické membráně, přesto se Zip7 nachází i v Golgiho komplexu [13]. Lokalizace Zip proteinů se může měnit během fyziologických podmínek a biologické dostupnosti zinku. Jakákoliv porucha regulace transportu zinku prostřednictvím jejich specifických transportérů je většinou spojena se specifickým onemocněním.

Proteiny se zinkovými prsty

Proteiny se zinkovými prsty jsou jednou z největších proteinových rodin vyskytujících se u eukaryontních organismů. Jenom lidský genom těchto proteinů kóduje zhruba 700. Vzhledem k tomu, že většina těchto proteinů funguje jako transkripční faktory regulující genovou expresi (3 % genů lidského genomu), jsou přítomny uvnitř buňky ve velmi malém množství a jejich výzkum nebyl možný před rozvojem technologií molekulové genetiky. První protein s motivem zinkového prstu označený jako TFIIA byl popsán relativně nedávno, v roce 1983 u africké žáby *Xenopus laevis* (Drápatka vodní), v jejíž nezralých oocytech je přítomno nezvykle velké množství tohoto proteinu v komplexu s 5S RNA [11]. Zinkové prsty (zinc fingers – ZnF) jsou proteinové domény, které obsahují 30–40 aminokyselinových zbytků. Jejich struktura je uspořádána tak, aby koordinovala zinečnaté ionty s postranními řetězci histidinu nebo cysteinu v tetraedrální geometrii. Dnes známe více než 10 rozdílných tříd motivů vázajících zinek. Klasické ZnF motivy obsahují (od N-konce směrem k C-konci) dva zinek vázající cysteiny oddělené několika (nejčastěji dvěma) nic nevázejícími aminokyselinami; následuje delší úsek dalších nevázejících zbytků zakončený dvěma histidiny oddělenými opět nevázejícími zbytky. Na základě aminokyselinového sledu je takový motiv označován jako CCHH. Řetězec zbytků mezi Cys₂ a His₂ podmotivy zajišťuje ZnF kontaktní povrch. Výsledné svinutí zinkového prstu je stabilizováno sekundárními strukturními motivy jako je α -helix u N-konce a β -struktura poblíž C-konce klasického ZnF. [5]. V posledních dvou desetiletích byly v různých proteinech rozpoznány i jiné varianty Cys/His zinkových prstů. Pro jisté zjednodušení bylo provedeno označení těchto ZnF podle donorových sad na varianty Cys₂His₂, Cys₃His a Cys₄. Je známo také několik typů dvojitých ZnF, kde dva Zn²⁺ koordinuje celkem 8 donorových skupin v kooperativním svinutí celé domény. Tyto prsty obsahují především zbytky cysteinu, typické jsou donorové sety Cys₆His₂, Cys₅His a nejvíce frekventovaný Cys₈ [38].

V závislosti na uspořádání donorových skupin zaujímají ZnF různé sekundární struktury. Funkce jednotlivých ZnF vyplývají právě z charakteru svinutí domény.

Zahrnují především schopnost rozpoznání struktur a sekvencí nukleových kyselin a proteinů. Evolučně jsou ZnF velmi staré proteinové motivy, zinek zde hraje klíčovou roli, bez něj by tak malá struktura byla nestabilní. Tyto malé struktury jsou ideální pro vazbu na DNA, snadno se váží na velkou rýhu DNA dvoušrobovice s minimálními entropickými nároky, zde rozpoznávají specifickou nukleotidovou sekvenci. Většina proteinů se ZnF proto patří mezi transkripční faktory, další častou funkcí je funkce strukturní ve spojení s multiproteinovými komplexy, regulace apoptózy, svinování proteinů a vazba lipidů.

V některých případech byla prokázána přímá souvislost mezi ZnF proteinem a určitým onemocněním. Je tomu tak např. u Wilmsova nádoru a tumorového supresorového genu WT1, který je mutovaný u 10–15 % těchto nefroblastomů. ZnF protein WT1 se uplatňuje při vývoji ledvin, fetálních gonád a mezotelu. Mutace WT1 je také spojována s rozvojem Denys-Drashova syndromu a Frasierova syndromu [25]. WT1 je zároveň mutovaný v 15 % akutních myeloidních leukémiích a spojován s nízkou odpovědí na jejich chemoterapii [21]. Další protein označovaný jako ZnF74 je spojován se zvýšenou náchylností organismu ke vzniku schizofrenie. Některé výzkumy ukázaly, že polymorfismus v genu ZnF74 v japonské populaci silně koreluje s věkem nástupu schizofrenie [35]. Porucha v syntéze některých ZnF proteinů jako je ZPR1 způsobuje neurodegenerativní poruchy [7]. Mutace genů lidské rodiny Zic proteinů (obsahuje 5 členů) způsobuje rozsáhlé vrozené malformace včetně Dandy-Walkerovy malformace, holoprosencefalii, defekty neurální trubice a heterotaxii.

Proteiny se zinkovými prsty jsou ideální pro vazbu na DNA a následnou specifickou regulaci genové exprese, a proto jejich syntetické konstrukty začaly být používány jako revoluční nástroj v genové terapii [29].

Metalothioneiny

V roce 1957 Margoshes a Vallee izolovali z ledviny koně nízkomolekulový protein, který vykazoval vysokou afinitu ke kadmii a obsahoval vysoký počet thiolových skupin. Díky vysokému obsahu kovu a neobvyklé bioorganické struktuře byl zařazen mezi metaloproteiny. Není příliš překvapující, že většina savčích tkání obsahuje na věku závislé bazální hladiny metalothioneinů (MT), které se účastní procesů závislých na regulovaném přívodu kovů, jako je buněčný růst nebo dělení. Zvýšené hladiny MT naopak nacházíme ve vyvíjejících se buňkách, jeho zvýšená exprese doprovází nádorové bujení, je to perspektivní onkomarker [18].

Dnes je možno charakterizovat metalothioneiny jako **superrodinu neenzymatických polypeptidů** (61–68 aminokyselin) s malou molekulovou hmotností (6–7 kDa) a s unikátní aminokyselinovou sekvencí (unikátní rozmístění motivu Cys-X-Cys) a vysokým podílem síry a kovů. *In vivo* MT váží Zn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ nebo Hg²⁺, zatímco *in vitro* jsou schopny navíc vázat Ag⁺, Bi³⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Pb²⁺, Pt²⁺ a Tc⁴⁺. Nicméně hlavním vázaným kovem za fyziologických podmínek je zinek. U savců se vyskytují 4 subrodiny MT (MT-I, MT-II, MT-III,

MT-IV), z toho nejdéle známé a nejlépe popsané jsou MT-I a MT-II. Lidské MT jsou kódovány rodinou genů vytvářejících 10 izoform. Zatímco jeden MT-2A gen kóduje pouze jeden MT-2 protein, MT-1 existuje ve více izoformách. Konkrétně MT-1 protein vytváří více subtypů kódovaných sadou MT-1 genů na chromozómu 16q13 (MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1H, MT-1I, MT-1J, MT-1K, MT-1L, MT-1X), což vede k rozdílnosti mezi izoformami MT-1 proteinu [30]. Rozdíly v MT genech pravděpodobně hrají rozdílnou funkční roli v průběhu vývoje nebo při změnách fyziologických podmínek. V porovnání s lidskými geny, myší geny pro MT jsou méně komplexní, existuje vždy jeden gen pro jednu hlavní izoformu MT (jeden gen kóduje MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4) a ty jsou umístěny na chromozómu 8 [30].

Promotorové cis-elementy DNA (ve směru 5' → 3') k úseku, který kóduje MT RNA, odpovídají na mnoho různých signálů a udržují nízké hladiny bazální exprese MT mRNA a syntézy proteinu. Jsou také indukovány ke zvýšené expresi MT v odpovědi na rozličné vývojové a environmentální signály. Ústředními promotory genů pro MT-1 a MT-2 jsou klasické TATA-boxy a iniciátorové oblasti (InR) k posílení transkripčního faktoru IID (TFIID), části preiniciačního komplexu, který upravuje bazální transkripci. Navíc obsahují sady promotorů odpovídající na kovy (metal response element – MRE), úseky s příbuznými, nicméně odlišnými sekvencemi, např. gen pro MT-1 je u myši regulován šesti MRE (a-f). MRE jsou normálně potřebné pro indukci genu MT pomocí kovů, ale ukázalo se, že jsou stejně nepostradatelné i pro indukci MT při absenci kovů v prostředí [12]. Pro bazální expresi je nejdůležitější MRE-c. MRE fungují ve spojení s dalším transkripčním faktorem, na zinku závislou molekulou tzv. zinek-responzivním transkripčním faktorem MTF-1, který se uplatňuje v procesu indukibilní exprese MT. Tento faktor je závislý na hladině zinečnatých iontů v organismu a prostřednictvím MRE reguluje jak bazální, tak indukovanou expresi MT v organismu [12]. U genů myši a křečka pro MT-1 se motiv E boxu (vazebné místo pro vnitřní pozdní transkripční faktor MLTF, někdy také označovaný jako upstream stimulatory factor – USF), se sekvencí GGCCACGT-GACC překrývá s tzv. antioxidant response element – ARE (se sekvencí TGACnnnGC) za tvorby kombinované sekvence MLTF/ARE, která je nezbytná jak pro bazální, tak pro kadmíem indukovanou expresi genu pro MT-1 [2]. ARE se uplatňují v regulačních kaskádách spouštějící expresi genů pro tvorbu bílkovin, které brání organismus před poškozujícím atakem volných radikálů. Děje se tak přes interakci ARE s NF-E2 podobným faktorem 2 nebo Nrf-2 [27]. Všechny promotorové geny MT obsahují alespoň jeden GC box (konzervativní sekvence GGGGCGGGG), který odpovídá na působení transkripčních faktorů z rodiny Sp/XKLF ZnF transkripčních faktorů včetně faktoru Sp1. Toto působení přispívá k bazální transkripci MT. Bazální genová transkripce je kontrolována i pomocí represorů, o kterých existuje jen několik literárních údajů. Mezi ně např. patří ZnF protein PZ120 nebo cykloheximid [12]. Geny pro MT jsou indukibilní i celou řadou anorganických agens (těžké kovy, reaktivní kyslí-

kové částice) nebo organickými signálními molekulami (cytokiny, steroidní hormony).

V molekulách MT nejsou přítomny aromatické aminokyseliny a 20 cysteinů se v primární sekvenci vyskytuje obvykle v těchto repetičích: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X je označení pro jinou aminokyselinu než cystein. Molekula MT je tvořena dvěma vazebnými doménami (α , β), které jsou složeny z cysteinových klastrů. Sulfhydrylové zbytky cysteinu se podílejí na kovalentní vazbě s atomy kovů.

Tyto klastry vytvářené skupinami -SH s kovem existují v obou globulárních doménách. Domény jsou k sobě vázány krátkým polypeptidovým úsekem bohatým na lysin.

Na svém C-konci obsahuje α -doména 11 cysteinů a je schopna vázat 4 divalentní nebo 6 monovalentních kovů, zatímco N-koncová β -doména zahrnuje 9 cysteinů schopných vázat 3 divalentní nebo 6 monovalentních kovů. Cysteinové zbytky jsou tedy spojky, které mohou vázat 2 divalentní ionty, nebo jsou to koncové zbytky, které váží pouze jeden divalentní ion. Pokud se kovové ionty naváží na apothionein, polypeptidový řetězec se okamžitě svine do dvou nativních třírozměrných thiolových klastrů umístěných v každé z domén. Pouze v α -doméně je jediná krátká oblast se sekundární strukturou (α -helix), a to tehdy, pokud je protein plně obsazený divalentními (nikoliv monovalentními) kovy [37].

Metalothionein má mnoho biologických funkcí. Mezi ty hlavní patří funkce:

1. imunoregulační,
2. neuroprotektivní,
3. metaloregulační,
4. detoxikační (vychytávání volných kyslíkových radikálů, eliminace těžkých kovů z organismu).

Zájem o metalothionein však vzrůstá také díky tomu, že je to perspektivní **onkomarker**. Mnoho studií prokázalo, že se MT vyskytuje nebo že je jeho syntéza zvýšena v normálních proliferujících buňkách, obnovujících se buňkách a nádorových buňkách. Byl prokázán přímý vztah mezi expresí MT proteinu a agresivním neoplastickým růstem buněk. Díky své nukleofilítě MT chrání buňky před cytotoxickým efektem elektrofilních protinádorových léčiv [36]. Současné studie poukazují na to, že zvýšená exprese MT v buňkách indukuje **antiapoptický efekt** a nedostatek MT v buňkách s chybějící syntézou MT zvyšuje jejich náchylnost k programované smrti poté, co jsou vystaveny působení protinádorových léků [1]. MT hraje důležitou roli v procesech detoxikace těžkých kovů; zároveň existují práce dokazující jeho schopnost vychytávat reaktivní kyslíkové radikály, částečně i hydroxylové radikály. Tyto částice se normálně uvolňují v průběhu aerobních procesů, ale stávají se noxou v situacích nerovnováhy endogenních antioxidantů. V těchto případech pak poškozují DNA, indukují peroxidaci lipidů, oxidují enzymy atd. To vše vede k destrukci buňky, chromozomálním aberacím a konečně k nádorovému bujení [15]. MT byl zařazen k potenciálním prognostickým markerům invazivních duktálních karcinomů mamy, kůže, cervixu a pankreatu [36]. Nepravidelný růst buněk způsobený

zvýšenou buněčnou proliferací nebo poruchou buněk uskutečnit apoptózu je považován za hlavní faktor maligních procesů. Metallothioneiny mají jistou **duální funkci**. Jednak ovlivňují růst a přežití tumorových buněk, protože jsou to tzv. **metaloregulátory funkcí** v procesech buněčných oprav, růstu a diferenciaci, a zároveň mají protektivní funkci při oxidačním stresu, chrání tedy buňku před apoptózou, která je vyvolaná generací volných radikálů v buňce. MT může být indukován celou řadou endogenních i exogenních stimulů, jako jsou glukokortikoidy, interferon, interleukin-1, progesteron, vitamin D₃, endotoxiny a těžké kovy, ukládání kovových iontů a hospodaření s buněčným zinkem. Vysoká exprese MT tak, jak to ukázaly některé studie, je příčinou chemorezistence platinových cytostatik v léčbě mnoha typů nádorových onemocnění. Platinové léky a jejich metabolity jsou vychytávány MT dříve, než mohou působit v místě jejich určení [9, 18].

Literatura

1. **Abdel-Mageed, A. B., Agrawal, K. C.** Activation of nuclear factor kappaB: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res.*, 1998, 58, p. 2335–2338.
2. **Aniskovitch, L. P., Jacob, S. T.** Distinct rat proteins can recognize CCAAT-homologous sequences of the metallothionein promoter and trans-activate this promoter. *Oncogene*, 1998, 16, p. 1475–1486.
3. **Atorino, L., Silvestri, L., Koppen, M., Cassina, L., Ballabio, A., Marconi, R., Langer, T., Casari, G.** Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J. Cell. Biol.*, 2003, 163, p. 777–787.
4. **Beninga, J., Rock, K. L., Goldberg, A. L.** Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, p. 18734–18742.
5. **Berg, J. M., Godwin, H. A.** Lessons from zinc-binding peptides. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1997, 26, p. 357–371.
6. **Cousins, R. J., Liuzzi, J. P., Lichten, L. A.** Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, p. 24085–24089.
7. **Doran, B., Gherbesi, N., Hendricks, G., Flavell, R. A., Davis, R. J., Gangwani, L.** Deficiency of the zinc finger protein ZPR1 causes neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, p. 7471–7475.
8. **Edland, S. D.** Insulin-degrading enzyme, apolipoprotein E, and Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.*, 2004, 23, p. 213–217.
9. **Fabrik, I., Kukačka, J., Adam, V., Průša, R., Eckschlager, T., Kizek, R.** Metallothionein a jeho vztah k protinádorové léčbě na bázi platinových komplexů. *Prakt. Léč.*, 2008, 88, p. 92–95.
10. **Gaither, L. A., Eide, D. J.** Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*, 2001, 14, p. 251–270.
11. **Hanas, J. S., Hazuda, D. J., Bogenhagen, D. F., Wu, F. Y., Wu, C. W.** Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, p. 14120–14125.
12. **Haq, F., Mahoney, M., Koropatnick, J.** Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res.*, 2003, 533, p. 211–226.
13. **Huang, L., Kirschke, C. P., Zhang, Y., Yu, Y. Y.** The ZIP7 gene (Slc39a7) encodes a zinc transporter involved in zinc homeostasis of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, p. 15456–15463.
14. **Christianson, D. W.** Structural biology of zinc. *Adv Protein Chem.*, 1991, 42, p. 281–355.
15. **Janssen, A. M., van Duijn, W., Kubben, F. J., Griffioen, G., Lamers, C. B., van Krieken, J. H., van de Velde, C. J., Verspaget, H. W.** Prognostic significance of metallothionein in human gastrointestinal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2002, 8, p. 1889–1896.
16. **Jiang, W., Bond, J. S.** Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett.*, 1992, 312, p. 110–114.
17. **Keilin, D., Mann, T.** Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.*, 1940, 34, p. 1163–1176.
18. **Kizek, R., Vacek, J., Adam, V., Vojtěšek, B.** Vztah metallothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě. *Klin. Biochem. Metab.*, 2004, 12, 33, p. 72–78.
19. **Kukacka, J., Prusa, R., Kotaska, K., Pelouch, V.** Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2005, 149, p. 225–236.
20. **Kukačka, J., Zikmundová, K., Kotaška, K., Halačová, M., Vajtr, D., Průša, R.** PAPP-A a matrixové metaloproteinázy 3 a 9 u pacientů se smíšenou dyslipoproteinémií. *Klin. Biochem. Metab.*, 2007, 15, 36, p. 85–88.
21. **Ladomery, M., Dellaire, G.** Multifunctional zinc finger proteins in development and disease. *Ann. Hum. Genet.*, 2002, 66, p. 331–342.
22. **Liuzzi, J. P., Bobo, J. A., Lichten, L. A., Samuelson, D. A., Cousins, R. J.** Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, p. 14355–14360.
23. **Liuzzi, J. P., Lichten, L. A., Rivera, S., Blanchard, R. K., Aydemir, T. B., Knutson, M. D., Ganz, T., Cousins, R. J.** Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, p. 6843–6848.
24. **McGwire, B. S., Chang, K. P., Engman, D. M.** Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect. Immun.*, 2003, 71, p. 1008–1010.
25. **Morrison, A. A., Viney, R. L., Ladomery, M. R.** The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, 1785, p. 55–62.
26. **Murgia, C., Vespignani, I., Cerase, J., Nobili, F., Perozzi, G.** Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells. *Am. J. Physiol.*, 1999, 277, p. G1231–1239.
27. **Nguyen, T., Sherratt, P. J., Pickett, C. B.** Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2003, 43, p. 233–260.
28. **Palmiter, R. D., Huang, L.** Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch*, 2004, 447, p. 744–751.
29. **Papworth, M., Kolasinska, P., Minczuk, M.** Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene*, 2006, 366, p. 27–38.
30. **Penkowa, M.** Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *Febs J.*, 2006, 273, p. 1857–1870.
31. **Rawlings, N. D., Morton, F. R., Barrett, A. J.** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, p. D270–272.

32. **Rinaldi, T., Pick, E., Gambadoro, A., Zilli, S., Maytal-Kivity, V., Frontali, L., Glickman, M. H.** Participation of the proteasomal lid subunit Rpn11 in mitochondrial morphology and function is mapped to a distinct C-terminal domain. *Biochem. J.*, 2004, 381, p. 275–285.
33. **Shimamori, Y., Watanabe, Y., Fujimoto, Y.** Purification and characterization of dipeptidyl aminopeptidase III from human placenta. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, 1986, 34, p. 3333–3340.
34. **Sim, D. L., Chow, V. T.** The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif. *Genomics*, 1999, 59, p. 224–233.
35. **Takase, K., Ohtsuki, T., Migita, O., Toru, M., Inada, T., Yamakawa-Kobayashi, K., Arinami, T.** Association of ZNF74 gene genotypes with age-at-onset of schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 2001, 52, p. 161–165.
36. **Thirumoorthy, N., Manisenthil Kumar, K.T., Shyam Sundar, A., Panayappan, L., Chatterjee, M.** Metallothionein: An overview. *World. J. Gastroenterol.*, 2007, 13, p. 993–996.
37. **Vasak, M.** Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2005, 19, p. 13–17.
38. **Witkiewicz-Kucharczyk, A., Bal, W.** Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, 2006, 162, p. 29–42.
39. **York, I. A., Mo, A. X., Lemerise, K., Zeng, W., Shen, Y., Abraham, C. R., Saric, T., Goldberg, A. L., Rock, K. L.** The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity*, 2003, 18, p. 429–440.
40. **Zelenski, N. G., Rawson, R. B., Brown, M. S., Goldstein, J. L.** Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, p. 21973–21980.

Do redakce došlo 11. 4. 2008.

Adresa pro korespondenci:

Ing. Jiří Kukačka, Ph.D.

Ústav klinické biochemie a patobiochemie

UK 2. LF a FN v Motole

V Úvalu 84

150 00 Praha 5-Motol

e-mail: jiri.kuckacka@lf2.cuni.cz

Zaujalo nás

Deficit vitamínu D – rizikový faktor pro srdeční onemocnění

Na toto možné nebezpečí upozorňuje článek autorů Wang, T. J. et al., *Circulation*, 2008. Nedostatek vitamínu D postihuje 1/3 až 1/2 populace středního a vyššího věku ve vyvinutých zemích. Příčinou je jak nedostatek syntézy v kůži (malá expozice slunečnímu záření), tak nedostatečný příjem v potravě. Důsledkem je zřejmý nepříznivý efekt na kosterní svalstvo a též (možná nepřímý) na kardiovaskulární systém. Receptory vitamínu D jsou přítomny v řadě tkání včetně hladkých svalů cév, v endoteliích nebo v kardiomyocytech. V prospektivní studii, do níž bylo vzato 1739 jedinců bez známek kardiovaskulárního onemocnění (bělochů, průměrný věk 59 roků), byla vyšetřena hladina 25-OH-vitamínu D. Z celkového

počtu mělo 28 % hladinu 25-OH D nižší než 15 µg/l a 9 % pod 10 µg/l. V průběhu sledování (průměrně za 5,4 roku) dostalo 129 jedinců první kardiovaskulární příhodu (rizikový faktor 1,62; ti kteří měli současně hypertenzi dokonce 2,13). Za možný mechanismus rizika nedostatku 1,25-dihydroxy-vitamínu D považují autoři vliv na regulaci renin-angiotenzinové osy a též na modulaci proliferace cévních hladkých svalů, zánětlivou reakci a trombózu. Suplementace vitamínem D podporovala snížení arteriálního krevního tlaku, snížení výskytu hypertofie levé srdeční komory a zvýšenou tvorbu prozánětlivých cytokinů.

Jaroslav Masopust