HUMANIN

Humanin

8: 200 - 435, 2006

ISSN 1212-4117

Jiřina Slaninová ¹ a Jiří Patočka ²¹Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd ČR, Praha²Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, katedra radiologie a toxikologie

Summary

The new substance called humanin was discovered by a group of Japanese scientists from Tokyo five years ago. Its discovery was facilitated by isolating a gene that had protective effect *in vitro* against different factors characteristic for Alzheimer's disease. Humanin is a linear peptide with 24 amino acids with slightly unusual solitary cysteine in position 8. If this cysteine is substituted by alanine, the peptide's activity gets lost; if it is substituted by arginine, the activity is maintained. It is surprising that if we substitute the amino acid in position 14 (serine) for glycine, the activity increases 1000 times. The peptide contains further methionine residue in position 1 and a long hydrophobic chain of leucines (residues 9-12) adjacent to the critical cysteine. The C-end of the peptide is characterized by the presence of a sequence of basic amino acids (Lys-Arg-Arg) in positions 21-23. It was found out that humanin protects cells in some tissues with mutations of certain genes against cell death, including one known as Swedish mutation. In this case, the mutated gene is probably responsible for early form of the familiar Alzheimer's disease. Although the detailed mechanisms of effects of humanin are not known so far, the existing findings give hope to come near to the possibility of medicating Alzheimer's disease. This will require further studies that would confirm the initial promising results and that would lead to modification of the fragile peptide into a more robust form – a new molecule that could become hope in the therapy of Alzheimer's disease.

Key words: humanin – neuroprotective peptide – Alzheimer's disease – mechanism of effect - structure

Souhrn

Nová látka nazvaná humanin byla objevena před pěti lety skupinou japonských vědců z Tokia. Její objev byl usnadněn izolací genu, který *in vitro* působil ochranně před různými faktory charakteristickými pro Alzheimerovu nemoc. Humanin je lineární peptid o 24 aminokyselinách s poněkud neobvyklým osamoceným cysteinem v pozici 8. Je-li tento cystein nahrazen alaninem, aktivita peptidu se ztratí, je-li nahrazen argininem, je aktivita zachována. Překvapivé pak je, že zaměníme-li aminokyselinu v pozici 14 (serin) za glycin, aktivita se zvýší 1000krát. Peptid dále obsahuje methioninový zbytek v pozici 1 a dlouhý hydrofobní řetězec leucinů (zbytky 9-12), přiléhající ke kritickému cysteinu. C-konec peptidu je charakterizován přítomností sledu bazických aminokyselin (Lys-Arg-Arg) v pozicích 21-23. Bylo zjištěno, že humanin chrání buňky v některých tkáních s mutacemi určitých genů před buněčnou smrtí, včetně jedné známé jako švédská mutace. V tomto případě je mutovaný gen pravděpodobně zodpovědný za časnou formu familiární Alzheimerovy nemoci. Ačkoliv detailní mechanismy účinku humaninu nejsou dosud známy, dosavadní nálezy vzbuzují naději na přiblížení se k možnosti léčení Alzheimerovy nemoci. Bude to ovšem vyžadovat další studie, které by potvrdily počáteční nadějné výsledky a jež by vedly k modifikaci křehkého peptidu do robustnější formy – nové molekuly, která by se mohla stát nadějí v terapii Alzheimerovy nemoci.

Klíčová slova: humanin – neuroprotektivní peptid – Alzheimerova nemoc – mechanismus účinku – struktura

ÚVOD

Humanin, peptid ze skupiny neuroprotektivních peptidů (Patočka et al., 2005), má za sebou pětiletou historii. Byl objeven japonskými vědci z tokijské soukromé univerzity KEIO na základě izolace genu, jehož produkt chránil *in vitro* nervové buňky před smrtí indukovanou stejnými faktory jako Alzheimerova choroba (AD) (Hashimoto et al., 2000a,b). Svitla tak naděje, že možná brzy budeme moci léčit jedno z nejrozšířenějších neurodegenerativních onemocnění současnosti (Patočka, Slaninová 2002). Co se z těchto nadějí splnilo a co na splnění teprve čeká, se snaží přiblížit náš článek. Kriticky shrnuje veškerou dostupnou literaturu o humaninu, která k datu napsání publikace čítala 65 referencí (z toho 26 od objevitelů) popisujících různé vlastnosti tohoto peptidu (v databázi Scifinder pak nalezneme okolo 110 odkazů – tato databáze zahrnuje i neimpaktované články, abstrakta a patenty). Několik firem již dodává humanin a jeho aktivní analog za ne příliš vysokou cenu a několik firem dodává i protilátky proti humaninu. Před 5 lety se vše zdálo docela jednoduché a jasné, ale pak se celá záležitost zamotala. Následující řádky objasní, co vlastně o humaninu víme a co dosud zůstává zahaleno tajemstvím.

STRUKTURA HUMANINU A JEHO AKTIVNÍCH ANALOGŮ

Humanin je lineární peptid o 24 aminokyselinách (viz obr. 1) mající ve své struktuře sérii 4 za sebou následujících leucinů, jeden cystein a sérii bazických aminokyselin na C-konci. Díky těmto prvkům ve struktuře není jeho syntéza

triviální. Přestože je humanin komerčně dostupný, jediní, kdo podrobně publikovali syntézu a čištění humaninu, jsou Evangelou A. et al. (2004). Japonští autoři (Yamagishi et al., 2003) provedli řadu strukturně aktivních studií, jednak pomocí synteticky připravených peptidů, jednak pomocí mutované cDNA, a určili tzv. aktivní jádro humaninu a aminokyseliny nezbytně nutné pro jeho neuroprotektivní aktivitu. Překvapivě zjistili, že nahradí-li se serin v poloze 14 glycinem (G14-humanin) či D-serinem, zvýší se aktivita peptidu 1000x. Zpočátku se zdál být pro aktivitu nepostradatelný Cys v poloze 8, neboť jeho náhrada alaninem vedla ke ztrátě aktivity. Později však bylo zjištěno, že Cys v poloze 8 lze nahradit argininem beze ztráty aktivity. Jsou-li v aktivním jádře, které tvoří heptadecapeptid 3-19 (molekula je zkrácena o 2 aminokyseliny na N-konci a o sérii bazických aminokyselin na C-konci), arginin a fenylalanin v poloze 4 a 6 (číslování podle původní humaninové sekvence) nahrazeny alaniny, cystein v poloze 8 argininem a serin v poloze 14 glycinem nebo D-serinem, dostaneme vysoce aktivní peptid někdy nazývaný PAGA, viz obr. 1. Při provedení tzv. alaninového, asparaginového a argininového skenu, tj. pomocí syntézy analogů humaninu, kdy jsou postupně všechny aminokyseliny v řetězci jednotlivě nahrazovány buď alaninem, nebo asparaginem či argininem, autoři dále zjistili, že zásadní roli hrají aminokyseliny Leu9, Leu10, Leu11, Pro19 a Val20, které nelze nahradit žádnou bazickou ani kyselou aminokyselinou (Yamagishi et al., 2003).

Obr. 1: Aminokyselinová sekvence humaninu, aktivního analogu PAGA a chimerního peptidu s ADNF-9.

Chiba et al. (2005) popsali syntézu konjugátu peptidu humaninu s 9 aminokyselinovým fragmentem neurotrofního faktoru ADNF-9 (SALLRSIPA), tzv. colivelin (obr. 1), který je účinný ve femtomolárních koncentracích (Chiba et al., 2006). ADNF-9, sám o sobě velmi účinný neuroprotektivní faktor (Brenneman, Gozes 1996; Brenneman et al. 1998; Glazner et al. 1999), je připojen k N-konci aktivního jádra humaninu.

Pokud jde o prostorovou strukturu humaninu, nalezneme v literatuře pouze dvě experimentální práce. Benaki et al. (2005) studovali strukturu humaninu pomocí NMR a zjistili, že ve vodě nemá organizovanou strukturu. Tyto výsledky potvrdil také Arakawa se spolupracovníky (2006) pomocí CD spektroskopie. Tito autoři také zjistili, že struktura humaninu je značně odlišná v prostředí pufrovaného fyziologického roztoku. Data z CD měření ve fyziologickém roztoku ukazují na možnost intermolekulárních či intramolekulárních hydrofobních interakcí, což by naznačovalo možnost tvorby aktivních dimerů.

NEUROPROTEKTIVNÍ AKTIVITA HUMANINU

Humanin antagonizuje *in vitro* neurotoxické působení produktů mutovaných genů, které jsou příčinou dědičné Alzheimerovy choroby [V642I, K595N/M596L (NL), A617G a L648P mutanty amyloidního prekursorového proteinu (APP), M146L, A246E, L286V, C410Y a H163R mutanty presenilinu 1 (PS 1) a N141I mutantem presenilinu 2 (PS2)]. Dále chrání před neurotoxickým působením amyloidního beta peptidu (Abeta) 1–43, 1–42 a 25–35 a inhibuje toxické působení protilátek proti extracelulární části APP (viz následující odstavec). Je však bez efektu na neurotoxicitu způsobenou mutanty superoxid dismutázy 1 nebo glutamátem či fragmentem prionu PrP(106–126) (Hashimoto et al., 2001b). Relativně selektivní působení humaninu vůči činidlům, která vyvolávají smrt buněk při AD, je zajímavým faktem. Hashimoto et al. (2001b) též srovnávali neuroprotektivní účinnost humaninu a Gly14-humaninu s neuroprotektivním účinkem neurotrofního faktoru IGF-I (inzulinu podobný růstový faktor I) nebo FGF (fibroblastový růstový faktor) a zjistili, že zatímco neurotrofní faktory chrání nervovou buňku jen proti některým toxickým proteinům, huma-

nin vykazoval neuroprotektivní účinek proti všem testovaným agens. Později bylo popsáno, že humanin chrání nejen nervové buňky, ale také buňky hladkého svalstva před toxickým působením Abeta (Jung, Van Nostrand, 2003).

MECHANISMUS NEUROPROTEKTIVNÍHO ÚČINKU HUMANINU

Komplexní mechanismus neuroprotektivního účinku humaninu není znám, ale zdá se, že je zprostředkován několika mechanismy. Jednak, jak bylo ukázáno na několika liniích buněk, působí vnitrobuněčně, kdy interaguje s proteiny indukujícími apoptózu, např. Bax proteinem (pro-apoptotický člen skupiny Bcl2 proteinů; Bax=Bcl2-associated X protein), který je mitochondriálního původu, a tak snižuje jejich aktivitu (Guo et al., 2003, Zhai et al., 2005 a Luciano et al., 2005), jednak přes hypotetický receptor na povrchu nervových buněk. Po vazbě na tento receptor humanin aktivuje signální kaskádu, která zahrnuje mezi jiným aktivaci c-Jun N-koncové kinas (Hashimoto et al., 2003a).

Jedním z nejvýraznějších patologických znaků Alzheimerovy choroby je výskyt tzv. senilních plaků vně nervových buněk, jejichž hlavní složkou je Abeta. Abeta se váže k extracelulární doméně p75^{NTR} (p75 neurotrofinového receptoru) a indukuje tak smrt nervových buněk. Pomocí neuronální hybridní linie buněk F11 bylo ukázáno, že smrt buněk vlivem Abeta přes p75^{NTR} prochází po dvou různých liniích. Jedna zahrnuje p75^{NTR}, G_o, JNK, NADPH oxidázu a kaspázy příbuzné kaspáze 3, druhá pak zahrnuje p75^{NTR}, PLAIDD (p75-like apoptosis-inducing death domain), G_i proteiny a pak už je totožná s první cestou, tj. zahrnuje JNK, NADPH oxidázu a kaspázy příbuzné kaspáze 3. Humanin, ADNF, IGF-I nebo bFGF inhibují obě cesty, kterými Abeta působí neurotoxicky přes p75^{NTR} (Tsukamoto et al. 2003, Nükura et al., 2004, Nishimoto et al., 2004a,b).

Receptor humaninu zatím nebyl identifikován. Přestože už v jedné z prvních publikací bylo ukázáno, že derivát humaninu značený radioaktivním jodem se váže na buněčné membrány, a byla postulována existence receptoru spojeného s G-proteinem (GPCR), který spouští kaskádu reakcí vedoucích k neuroprotekcí, další informace se zatím nepodařilo získat. Ying et al. (Ying et al., 2004) se pokusili identifikovat tento receptor a zkoušeli, jak působí syntetický huma-

nin na různé buňky a zjistili, že humanin indukuje chemotaxi u mononukleárních fagocytů tak, že interaguje s lidským GPCR receptorem formylpeptid receptor-like-1 (FPRL1) a jeho myším ekvivalentem FPR2. FPRL1 a FPR2 jsou současně funkčními receptory pro Abeta 42 jako chemoatraktanty a aktivátory fagocytárních buněk. Humanin snižuje agregaci a tvorbu fibril tím, že potlačuje vliv Abeta 42 na mononukleární fagocyty. V neuroblastech jak humanin, tak Abeta 42 aktivují FPRL1; avšak pouze aktivace peptidem Abeta 42 vede k apoptotické smrti. Humanin jeho působení blokuje. Paralelně jinými metodami došli ke stejnému závěru Harada et al. (2004). Ti také zjistili, že humanin a jeho formylovaný analog interagují s FPRL 1 a FPRL 2 proteiny a dále, že humanin inhibuje forskolinem indukované zvýšení hladiny cAMP v CHO buňkách, které exprimují tento receptor; formylovaný humanin má dokonce vyšší afinitu k FPRL 1 než humanin. Avšak později Hashimoto et al. (2005) testovali tuto hypotézu jinou metodou a zjistili, že interakce humaninu s FPRL-1 není příčinou jeho neuroprotektivních vlastností.

Kariya a spol. (2002) za použití 3 různých metod (stanovení metabolicky aktivních buněk, stanovení kaspázy-3 a detekce fragmentace DNA) popsali, že jak humanin, tak G14-humanin chrání PC12 buňky před smrtí způsobenou nedostatkem séra v inkubačním médiu. To naznačilo schopnost těchto peptidů chránit neurony i před negativním působením jiných faktorů. Později Kariya a spol. (2005a) ukázali, že humanin zvyšuje hladinu ATP v lidských lymfocytech, svalových TE671 a nervových SKN-MC buňkách a chrání tyto buňky od apoptotické smrti způsobené deprivací séra v médiu, v němž jsou pěstovány. To lze vysvětlit blokací Bax. Na druhou stranu ale humanin také zvyšuje hladiny ATP u buněk, které netrpí nedostatkem séra, ve kterých by Bax měl být neaktivní. Tento náález ukazuje na přítomnost jiného mechanismu, nezávislého od inaktivace Bax, kterým dochází ke zvýšení ATP při neapoptotických podmínkách. V úvahu přichází přímé působení na mitochondrie. Působením humaninu na lymfocyty pacientů s mitochondriální encefalomyopatií, laktátovou acidózou a stavy podobnými záchvatům mrtvice (MELAS), chorobou, jejíž příčinou je mutace mtDNA (A3243G), dochází též ke zvýšení hladiny ATP. Humanin

by tedy měl být schopen zabránit nedostatku ATP i u těchto buněk. PCR výsledky ukazují, že nejspíše nejde o důsledek zvýšené proliferace mitochondrií, neboť humanin působí inhibici replikace mitochondriální DNA.

V několika laboratořích bylo zjištěno, že protilátky vážící se k extracelulární části APP působí smrt nervových buněk. Hashimoto se spolupracovníky ukázali (2003b), že dimerizace cytoplasmatické domény APP indukovaná různými činidly extracelulárně, např. tedy protilátkami, spouští procesy vedoucí ke smrti nervových buněk. V případě neurohybridních buněk exprimujících fuzní konstrukt receptoru epidermálního růstového faktoru (EGF) a APP cytoplasmatické domény CD (EGFR/APP CD hybrid), EGF zvyšoval odumírání těchto buněk a humanin tento proces potlačoval. Dimerizací APP CD se spouští pochody zahrnující ASK 1, JIP-1b a JNK. ASK1/JNK komplex se pravděpodobně podílí na pokračování apoptotického procesu, i když primární impulz, např. vazba protilátek na APP, byl odstraněn.

O rok později pak Sponne et al. (2004) zjistili, že humanin v 10 μ M koncentraci zabraňuje rozpustnému fragmentu prionu PrP(118–135) v indukovaní buněčné smrti současně s inhibicí apoptotických jevů v kultuře potkaních kortikálních buněk z mozku. G14-humanin měl 500x vyšší protektivní účinek, zatímco alaninový analog neměl žádnou aktivitu. Účinek humaninových peptidů nezávisel na před-inkubaci těchto peptidů s PrP(118–135) fragmentem. V souladu s předcházejícími výsledky humaninové peptidy neovlivňovaly toxické působení fibrilárního fragmentu prionu PrP(106–126) peptidu. Tento náález ukazuje na skutečnost, že peptidy PrP(118–135) a PrP(106–126) působí apoptózu rozdílnými mechanismy.

Onoue et al. (2002) testovali různé peptidy, mezi jinými také humanin, na schopnost zabránit smrti nediferencovaných PC12 buněk vlivem Abeta peptidu a zjistili, že v koncentraci 10^{-9} M vykazovaly jak hypofyzární polypeptid aktivující adenylátcyklázu (PACAP), tak vazooaktivní intestinální polypeptid (VIP) a humanin neuroprotektivní aktivitu, nejaktivnější však byl PACAP, který byl minimálně 10 000x aktivnější než VIP a humanin. Neuroprotektivita korelovala s hladinou cAMP. Postulovali, že PACAP zlepšuje životaschopnost PC12 buněk v přítomnosti Abeta zvýšením koncentrace cAMP a že v tom-

to procesu je zapojena deaktivace apoptotického enzymu kaspázy 3. Abeta indukoval smrt neuronů tím, že došlo ke ztrátě funkce mitochondrií. Přidání PACAP27 a dibutyryl-cAMP podstatně zvýšilo počet přežívajících buněk a zvýšilo tvorbu neuritů (Luciano et al., 2005; Zhai et al., 2005).

VLASTNOSTI HUMANINU

Ve struktuře humaninu lze nalézt prvky signálního proteinu (kladně nabitý N-konec, centrální hydrofobní oblast a polární C-konec, který je ukončen úsekem štěpitelným signálními peptidázami). Humanin sám může také jako signální peptid fungovat. Je-li ke genu humaninu připojen gen pro větší protein, je tento protein transportován ven z buňky a během transportu je humanin degradován. Je-li exprimován humaninový gen samotný nebo s připojeným genem pro krátký protein, je produkt sekretován bez degradace humaninu (Yamagishi et al., 2003).

Zdá se, že humanin dimerizuje a pouze jeho homodimer je aktivní. Při dimerizaci hraje významnou roli Ser7, avšak bližší informace o tvorbě dimeru a jeho struktuře zůstávají nejasné (Hashimoto et al., 2004c; Terashita et al., 2003). Humanin je poměrně rychle degradován. Skupina německých výzkumníků testovala enzymatickou stabilitu humaninu a shledala, že je štěpen specifickou prolylendopeptidázou s neobvyklou post-cysteinovou specificitou (Bar et al. 2006).

INTERAKCE HUMANINU S JINÝMI PROTEINY A JEHO ÚLOHA PŘI APOPTÓZE

Humanin interaguje s Abeta 40, mění dynamiku jeho agregace a morfologii; G14-humanin způsoboval morfologickou změnu Abeta 40 z fibrilární na amorfní. Pokusy také ukázaly, že interakce humaninu s Abeta 40 může snížit zvýšení koncentrace vápníku vlivem Abeta 40, což je primární úkaz vedoucí k Abeta 40-indukované apoptóze neuronů v kultuře (Zou, 2003). Humanin interaguje s Bax proteinem (viz výše). Blokuje přesun Bax z cytosolu k mitochondriím, blokuje asociaci s izolovanými mitochondriemi a *in vitro* inhibuje uvolňování cytochromu c. V buňkách, kde byl over-exprimován humanin, dochází k inhibici apoptózy inhibicí aktivity Bax proteinu. Zhai et al. (2005) vytvořili teorii, že gen pro humanin přešel z mitochondrií do jaderného genomu, aby chránil mitochondrie před

Bax. Humanin také interaguje s extra-dlouhou formou Bim (BimEL), jiným členem Bcl 2 rodiny proteinů, ale nikoli s krátkou či dlouhou formou; analoga humaninu, která neinteragují s BimEL, nemají neuroprotektivní účinek proti apoptóze dané BimEL (Luciano et al., 2005).

Kritickou roli v indukci apoptózy hraje také další člen Bcl 2 skupiny proteinů, nedávno popsaný mitochondriální protein tBID (Bcl 2 Interacting Domain), který patří do skupiny „BH3-only“ pro-apoptotických regulatorů. Humanin interaguje jak s BID, tak se zkrácenou formou tBID (Zhai et al., 2005). Ikonen et al. (2003) zjistili, že humanin interaguje specificky s vysokou afinitou s IGFBP-3 (Insulin-like growth factor binding protein 3). Komplex IGFBP-3 a humaninu lze co-imunoprecipitovat z myších varlat. Humanin se váže s IGFBP-3, ale tato vazba nekompetuje s IGF-I-IGFBP-3 vazbou, neboť humanin se váže k 18 aminokyselinové doméně vážící heparin. Vazba humaninu a IGFBP-3 má pleiotropní charakter a dochází jak k synergistickým, tak antagonistickým účinkům.

Humanin interaguje také s TRIM11 proteinem (Niikura et al., 2003). Tento nukleární protein a humanin jsou lokalizovány na stejných místech v savčích buňkách. Tato vazba snižuje neuroprotektivní aktivitu humaninu. TRIM11 pravděpodobně hraje důležitou roli při degradaci proteinů. Hladina ubiquitin-konjugovaného humaninu je zvýšena v přítomnosti TRIM11. V práci jsou popsány části TRIM11 proteinu nutné pro interakci s humaninem. Byla vyslovena hypotéza, že TRIM11 reguluje aktivitu humaninu v buňce.

DISTRIBUCE HUMANINU

Poté, co byl humanin identifikován *in vitro* molekulárně biologickými metodami, byl lokalizován v celé řadě tkání a buněčných struktur. Tajima et al. (2002) detekovali humanin pomocí imunoblotingu ve varlatech a střevě 3denních myší a ve varlatech 12denních myší. Imunoreaktivitu detekovali také v CNS pacientů trpících AD. Jen velmi nízká imunoreaktivita byla detekována v kontrolních mozcích. Imunoreaktivita humaninu byla detekována v intaktních velkých neuronech okcipitálního laloku AD mozku, ale už ne v jiných oblastech a ve věkově odpovídajících kontrolních skupinách.

Caricasole et al. (2002) detekovali potkaní

gen kódující humaninu podobný peptid s širokým spektrem neuroprotektivní aktivity, který nazvali rattin (v další literatuře používán název potkaní humanin - rat humanin). Narozdíl od humaninu rattin chránil neurony i proti excitotoxickému působení NMDA. Rattin také interaguje s protilátkami proti humaninu. Colon et al. (2006) zjistili expresi humaninu ve všech stadiích vývoje potkaních varlat, kde humanin pravděpodobně zabraňuje odumírání Leydigových buněk během první vlny spermatogeneze. Humanin zvyšoval přežívání Leydigových buněk v kultuře a spolu s IGF-I stimuloval syntézu DNA a steroidogenezi. Autoři postulovali, že humanin je novým testikulárním anti-apoptotickým faktorem. Kin et al. (2006) našli humanin ve vzorcích kosterních svalů pacientů trpících chronickou progresivní ophthalmoplegií (CPEO), závažným mitochondriálním onemocněním. Ze svých výsledků *in vivo* a *in vitro* vyvodili, že exprese humaninu může být indukována jako odpověď na energetickou krizi v postižených buňkách. Silná imunoreaktivita byla detekována ve vzorcích svalů pacientů s MELAS, imunoreaktivita korelovala s markery pro mitochondrie. Humanin by mohl být kandidátem na lék proti MELAS (Kariya et al., 2005b). Ijiri et al. (2005) zjistili zvýšenou expresi humaninových peptidů v mitochondriích a siderosomech primárních synoviálních buněk pacientů s onemocněním pigmentovou vilonodulární synovitiidou (PVS) difuzního typu. Předpokládá se, že hlavním faktorem v patogenezi tohoto onemocnění je disfunkce mitochondrií, a pak by zde humanin mohl hrát významnou roli.

EXPRESE HUMANINOVÉHO GENU

Humaninový gen je přítomen jednak v jaderném genomu, jednak v mitochondriálním genomu. Maximov et al. (2002) ukázali, že humanin je kódován lidskou mitochondriální 16S rRNA. Nukleotidová sekvence nejdelší humaninové cDNA (1 567 bází, včetně poly-A) je z 99 % identická s mitochondriální DNA kódující 16S rRNA (polohy 1 680–3 231). Humaninová mRNA je s největší pravděpodobností překládána v cytosolu, nikoli přímo v mitochondriích. To vedlo autory k hypotéze, že AD může být důsledkem zablokovaného transportu humaninové mRNA z mitochondrií do cytoplazmy. Jejich data ukazují na to, že humanin je potenciální onkopeptid.

Liang et al. 2004 při studiu exprese genů důležitých pro diferenciaci a vývoj zjistili, že geny kódující cytochrom c oxidázu II a tzv. „rescue factor“ humanin patřily k těm, které byly nejčastěji exprimovány v primárních spermatocytech, což naznačuje jejich roli během meiózy. Humanin tedy může být klíčovým faktorem, který brání odumírání zárodečných buněk a/nebo apoptóze, a tak umožňuje průběh spermatogeneze.

Yadav et al. (2004) zjistili, že ve žlutém tělisku je exprese humaninového genu zvýšena při inhibici sekrece LH a je tedy tímto hormonem regulována. Identifikovali celkem 7 neredundantních cDNA, jejichž exprese byla regulována LH. Ukázali, že při inhibici sekrece LH dojde jednak ke snížení exprese některých genů (např. receptoru pro lipoprotein o nízké hustotě (LDL receptoru) a aldózo reduktázy, ale současně také ke zvýšení exprese jiných genů, a to genů pro humanin, RNA helikázu, Lyric-protein, kyselý ribozomální fosfoprotein a KIAA1750.

DALŠÍ ÚČINKY HUMANINU

V četných studiích byla prokázána řada dalších účinků humaninu *in vitro* i *in vivo*. Bylo např. zjištěno, že humanin zpokožuje apoptózu v buňkách K562 tím, že snižuje expresi P38 MAP kinázy (Wang et al., 2005) a potlačuje smrt lidských lymfocytů v kultuře v nepřítomnosti séra (Kariya et al. 2003). Jung a Van Nostrand (2003) zjistili, že lidské cerebrovaskulární hladké svalové (HCSM) buňky v přítomnosti 10 μM humaninu přežily patogenní působení Abeta a degradace jejich vnitrobuněčného alfa-aktinu byla snížena. Naproti tomu ukládání Abeta a tvorba fibril na povrchu buněk a zvýšená hladina APP nebyly humaninem ovlivněny. Tyto výsledky též naznačují, že Abeta může indukovat smrt buněk stejným mechanismem jak v neuronálních buňkách, tak v HCSM buňkách.

O vlivu humaninu na kognitivní funkce mozku existují tři práce. Mamiya a Ukai (2001) demonstrovali, že podání humaninu vede ke zlepšení učení a paměti u myši, kterým byl podán skopolamin. Toto zlepšení bylo zprostředkováno cholinergním systémem. Další práce týkající se *in vivo* efektu byla publikována Krejčovou a spol. (2004), kteří ukázali, že humanin a jeho nový analog mající ve struktuře o jeden leucin ve střední části méně zlepšují po intraperitoneální aplikaci paměť a prostorovou orienta-

ci u potkanů, kterým byl podán 3-chinuklidinylbenzilát, vyvolávající amnézii podobně jako skopolamin. Tajima a spol. (2005) potvrdili výsledky Mamiya a Ukai (2001) týkající se zlepšení paměti u myši, která byla porušena podáním skopolaminu, a nadto ukázali, že humanin chrání neurony před poškozením, které působí intracerebroventrikulární podání Abeta.

ZÁVĚR

Pět let po objevu humaninu, peptidu, který chrání neurony před poškozením různého původu, jsme se dosud nedopracovali k žádnému léku, který by léčil neurodegenerativní choroby jako např. Alzheimerovu nemoc. Studium humaninu se ukázalo být velmi složitým úkolem, na němž ale pracuje jen omezená skupina lidí. Humanin a jemu účinkem podobné neuroprotektivní peptidy (Patočka et al., 2005) hrají u savců dosud ne zcela poznanou úlohu. Nicméně studium humaninu a jeho analogů přineslo řadu nových poznatků. Nesmírně důležité bylo objasnění interakcí humaninu s různými proteinovými složkami uvnitř buňky i na vnějším povrchu buněčné membrány, poznání procesů, které po vazbě na tyto proteiny následují, a procesů, které následují po štěpení APP na jednotlivé peptidy. Musíme doufat, že tyto znalosti nám umožní efektivní vývoj léků účinných proti Alzheimerově chorobě i jiným méně častým neurodegenerativním onemocněním v blízké budoucnosti.

LITERATURA

ABE, Y. et al.: Cytotoxic mechanisms by M239V presenilin 2, a little-analyzed Alzheimer's disease-causative mutant. *J Neurosci Res*. 2004. Vol. 77, s. 583–595.
 ARAKAWA, T. et al.: The secondary structure of a potent Ser14Gly analog of antiAlzheimer peptide, Humanin, by circular dichroism. *J Pept Sci*. 2006. Vol. 12, s. 639–642.
 BAR, J. W. et al.: Prolylendopeptidase cleaves the apoptosis rescue peptide humanin and exhibits an unknown post-cysteine cleavage specificity. *Adv Exp Med Biol*. 2006. Vol. 575, s. 103–108.
 BENAKI, D. et al.: Solution structure of humanin, a peptide against Alzheimer's disease-related neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005. Vol. 329, s. 152–160.
 BRENNEMAN, D. E., GOZES, I.: A femtomolar-acting neuroprotective peptide. *J Clin Invest*. 1996. Vol. 9, s. 2299–2307.
 BRENNEMAN, D. E. et al.: Activity-dependent neurotrophic factor: structure–activity relationships of femtomolar-acting peptides. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998. Vol. 285, s. 619–627.
 CARICASOLE, A. et al.: A novel rat gene encoding a Humanin-like peptide endowed with broad neuropro-

TECTIVE activity. *FASEB J*. 2002. Vol. 16, p. 1331–1333.
 COLON, E. et al.: Anti-apoptotic factor humanin is expressed in the testis and prevents cell-death in leydig cells during the first wave of spermatogenesis. *J Cell Physiol*. 2006. Vol. 208, p. 373–385.
 EVANGELOU, A. et al.: High-yield, solid-phase synthesis of humanin, an Alzheimer's disease associated, novel 24-mer peptide which contains a difficult sequence. *J Pept Sci*. 2004. Vol. 10, s. 631–635.
 GLAZNER, G. W. et al.: Activity-dependent neurotrophic factor peptide (ADNF9) protects neurons against oxidative stress-induced death. *J Neurochem*. 1999. Vol. 73, s. 2341–2347.
 HARADA, M. et al.: N-Formylated humanin activates both formyl peptide receptor-like 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. Vol. 324, p. 255–261.
 HASHIMOTO, Y. et al.: A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001a. Vol. 98, s. 6336–6341.
 HASHIMOTO, Y. et al.: Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor Humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J Neurosci*. 2001b. Vol. 21, s. 9235–9245.
 HASHIMOTO, Y. et al.: Mechanism of neuroprotection by a novel rescue factor humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001c. Vol. 283, s. 460–468.
 HASHIMOTO, Y. et al.: Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. *J Neurochem*. 2003a. Vol. 84, s. 864–877.
 HASHIMOTO, Y. et al.: The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid- β protein precursor causes sustained apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun NH2-terminal kinase-mediated neurotoxic signal via dimerization. *J Pharm Exp Therap*. 2003b. Vol. 306, p. 889–902.
 HASHIMOTO, Y. et al.: Amino- and carboxyl-terminal mutants of presenilin 1 cause neuronal cell death through distinct toxic mechanisms: Study of 27 different presenilin 1 mutants. *J Neurosci Res*. 2004a. Vol. 75, p. 417–428.
 HASHIMOTO, Y. et al.: Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid- β peptides via p75NTR/PLAIDD. *J Neurochem*. 2004b. Vol. 90, p. 549–558.
 HASHIMOTO, Y. et al.: Humanin antagonists: mutants that interfere with dimerisation inhibit neuroprotection by Humanin. *Eur J Neurosci*. 2004c. Vol. 19, p. 2356–2564.
 HASHIMOTO, Y. et al.: Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in humanin mediated neuroprotection. *Life Sci*. 2005. Vol. 77, p. 3092–3104.
 CHIBA, T. et al.: Characterization of colivelin-mediated neuroprotection against Alzheimer's disease-relevant insults in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2005. Vol. 25, s. 10252–10261.
 CHIBA, T. et al.: Colivelin prolongs survival of an ALS model mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006. Vol. 343, s. 793–798.
 IJIRI, K. et al.: Increased expression of humanin peptide in diffuse-type pigmented villonodular synovitis: implication of its mitochondrial abnormality. *Ann Rheum Dis*. 2005. Vol. 64, p. 816–823.
 IKONEN, M. et al.: Interaction between the Alzheimers survival peptide humanin and insulin-like growth factor-

- binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2003. Vol. 100, p. 13042-13047.
- JUNG, S. S., VAN NOSTRAND, W. E. J.: Humanin rescues human cerebrovascular smooth muscle cells from Abeta-induced toxicity. *Neurochem*. 2003. Vol. 84 p. 266-272.
- KARYIA, S. et al.: Humanin inhibits cell death of serum-deprived PC12h cells. *Neuroreport*. 2002. Vol. 13, p. 903-907.
- KARYIA, S., TAKAHASHI, N., HIRANO, M., UENO, S.: Humanin improves impaired metabolic activity and prolongs survival of serum-deprived human lymphocytes. *Mol Cell Biochem*. 2003. Vol. 254, p. 83-89.
- KARYIA, S. et al.: Effect of humanin on decreased ATP levels of human lymphocytes harboring A3243G mutant mitochondrial DNA. *Neuropeptides*. 2005a. Vol. 39, p. 97-101.
- KARYIA, S. et al.: Humanin detected in skeletal muscles of MELAS patients: a possible new therapeutic agent. *Acta Neuropathol*. 2005b. Vol. 109, p. 367-372.
- KIN, T. et al.: Humanin expression in skeletal muscles of patients with chronic progressive external ophthalmoplegia. *J Hum Genet*. 2006. Vol. 51, p. 555-558.
- KREJČOVÁ, G., PATOČKA, J., SLANINOVÁ, J.: Effect of humanin analogues on experimentally induced impairment of spatial memory in rats. *J Peptide Sci*. 2004. Vol. 10, p. 636-639.
- LIANG, G. et al.: Identification of differentially expressed genes of primary spermatocyte against round spermatid isolated from human testis using the laser capture microdissection technique. *Cell Res*. 2004. Vol. 14, p. 507-512.
- LUCIANO, F. et al.: Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL. *J Biol Chem*. 2005. Vol. 280, p. 15825-15835.
- MAMIYA, T., UKAI, M.: [Gly14]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. *Br J Pharmacol*. 2001. Vol. 134, p. 1597-1599.
- MAXIMOV, V. et al.: Mitochondrial 16S rRNA gene encodes a functional peptide, a potential drug for Alzheimer's disease and target for cancer therapy. *Med Hypotheses*. 2002. Vol. 59, p. 670-673.
- NIIKURA, T. et al.: A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilises Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimers disease-relevant insults. *Eur J Neurosci*. 2003. Vol. 17, p. 1150-1158.
- NIIKURA, T. et al.: Characterization of V642I-A_PP-induced cytotoxicity in primary neurons. *J Neurosci Res*. 2004. Vol. 77, p. 54-62.
- ONOUE, S. et al.: The neuropeptide PACAP attenuates beta-amyloid (1-42)-induced toxicity in PC12 cells. *Peptides*. 2002. Vol. 23, p. 1471-1478.
- PATOČKA, J., SLANINOVÁ, J.: Humanin - nový peptid v etiologii Alzheimerovy nemoci. *Čes-Slov Psychiat*. 2002. Vol. 98, s. 221-222.
- PATOČKA, J., SLANINOVÁ, J., KUNEŠOVÁ, G.: Neuroprotective peptides as drug candidates against Alzheimer's disease. *J Appl Pharmacol*. 2005. Vol. 3, s. 67-73.
- SPONNE, I. et al.: Humanin rescues cortical neurons from prion-peptide-induced apoptosis. *Mol Cell Neurosci*. 2004. Vol. 25, p. 95-102.
- TAJIMA, H. et al.: Evidence for in vivo production of Humanin peptide, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-related insults. *Neurosci Letters*. 2002. Vol. 324, p. 227-231.
- TAJIMA, H., et al.: A Humanin derivative, S14G-HN, prevents amyloid-beta-induced memory impairment in mice. *J Neurosci Res*. 2005. Vol. 79, p. 714-723.
- TERASHITA, K. et al.: Two serine residues distinctly regulate the rescue function of Humanin, an inhibiting factor of Alzheimer's disease-related neurotoxicity: functional potentiation by isomerization and dimerization. *J Neurochem*. 2003. Vol. 85, p. 1521-1538.
- TSUKAMOTO, E. et al.: Characterization of the toxic mechanism triggered by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75 neurotrophin receptor in neuronal hybrid cells. *J Neurosci Res*. 2003. Vol. 73, p. 627-636.
- WANG, D. et al.: Humanin delays apoptosis in K562 cells by downregulation of P38 MAP kinase. *Apoptosis*. 2005. Vol. 10, p. 963-971.
- YADAV, V. K., MURALY, P., MEDHAMURTHY, R.: Identification of novel genes regulated by LH in the primate corpus luteum: insight into their regulation during the late luteal phase. *Mol Hum Reprod*. 2004. Vol. 10, p. 629-639.
- YAMAGISHI, Y. et al.: Identification of essential amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease-relevant insults. *Peptides*. 2003. Vol. 24, s. 585-595.
- YING, G. et al.: Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J Immunol*. 2004. Vol. 172, p. 7078-7085.
- ZHAI, D. et al.: Humanin binds and nullifies Bid activity by blocking its activation of Bax and Bak. *J Biol Chem*. 2005. Vol. 280, p. 15815-15824.
- ZOU, P. et al.: Humanin peptides block calcium influx of rat hippocampal neurons by altering fibrogenesis of Abeta (1-40). *Peptides*. 2003. Vol. 24, p. 679-685.

Jiřina Slaninová a Jiří Patočka
 slan@uochb.cas.cz
 prof.patočka@gmail.com