

SLINNÉ PEPTIDY A PROTEINY, JEJICH STRUKTURA A VÝZNAM V ÚSTNÍ DUTINĚ

LENKA FIALOVÁ

*Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky,
1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná
fakultní nemocnice v Praze, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2
lfial@lf1.cuni.cz*

Došlo 8.1.19, přepracováno 13.6.19, přijato 15.6.19.

Klíčová slova: histatin, proteiny bohaté na prolin, sliny, statherin

Obsah

1. Úvod
2. Charakteristika vybraných proteinů ve slině
 - 2.1. Histatiny
 - 2.1.1. Struktura histatinů
 - 2.1.2. Histatiny v ústní dutině
 - 2.1.3. Funkce histatinů
 - 2.2. Proteiny bohaté na prolin
 - 2.2.1. Struktura proteinů bohatých na prolin
 - 2.2.2. Proteiny bohaté na prolin v ústní dutině
 - 2.2.3. Funkce proteinů bohatých na prolin
 - 2.3. Statherin
 - 2.3.1. Struktura statherinu
 - 2.3.2. Statherin v ústní dutině
 - 2.3.3. Funkce statherinu
3. Závěr

1. Úvod

Slina je snadno dostupná biologická tekutina, jejíž složení je za fyziologických i patologických podmínek již mnoho let intenzivně zkoumáno^{1–3}. Ve slině lze stanovovat řadu analytů jako součást diagnostického procesu různých onemocnění, prokazovat drogy, monitorovat hladiny léků a vzhledem k přítomnosti buněk i analyzovat DNA. K rutinnímu využití sliny jako diagnostické tekutiny zbývá ještě vyřešit řadu problémů týkajících se standardizace metod ve fázi preanalytické i analytické^{4,5}. Z širšího pohledu termínem slina označujeme tekutinu v ústní dutině, která obsahuje kromě produktů slinných žláz (vlastní slina) tekutinu dentogingiválního žlábků a slizničního transudátu, produkty bakteriálního metabolismu, součástí nosního a faryngeálního sekretu, zbytky potravy, uvolněné buňky epitelu, krevní buňky a mikroorganismy⁶.

Současný rozmach analytických metod zahrnující i oblasti metabolomiky, genomiky a proteomiky otevírá možnosti pro rozšíření spektra látek využitelných v diagnostice jak onemocnění v oblasti ústní dutiny, tak dalších chorob (např. nádorové, endokrinologické a infekční), nebo pro testování DNA¹.

Ve slině, která je tvořená z 98–99 % vodou, jsou rozpuštěné četné minerální látky a nízkomolekulární i vysokomolekulární organické sloučeniny včetně proteinů a peptidů^{1,5}. Proteiny a peptidy představují důležité součásti sliny, jejichž rozmanité účinky jsou nezbytné pro zajištění správné funkce ústní dutiny^{7,8}. Pro studium proteinů existují v současnosti moderní analytické postupy. Uplatnění metod proteomické a peptidomické analýzy přineslo celou řadu informací, které doplnily naše znalosti o slinných proteinech a peptidech získaných před érou proteomiky a peptidomiky^{9–11}. K dispozici jsou nové poznatky o kvantitativních i kvalitativních vlastnostech mnoha slinných proteinů za fyziologických i vybraných patologických podmínek^{3,9,12}.

Proteiny a peptidy představují složky, bez nichž by slina nebyla schopna plnit své funkce. Ústní dutina je vstupní bránou pro četné mikroorganismy, ale také místem, v němž minerální zubní tkáň mohou být v kontaktu s agresivně působícím okolím. Důležitá je úloha proteinů v iniciální fázi trávení, při vytváření proteinového filmu na povrchu v ústní dutině, při poskytování ochrany proti různým infekčním agens a při udržování homeostázy vápníku, potřebné pro zachování integrity minerální složky zubů.

Zajištění některých funkcí, zejména protektivních, není omezeno na jeden protein, ale podílí se na něm několik proteinů¹³. V této souvislosti jsou vhodným příkladem redundantní antimikrobiální účinky histatinů, cystatinů, mucinů a enzymů amylasy a peroxidasy, zajišťující obranu proti širokému spektru mikroorganismů, které se dostávají do ústní dutiny s potravou a vzduchem. Jiný příklad redundantního působení slinných proteinů souvisí se zachováním integrity minerálu skloviny. Rozpuštění minerálu skloviny v prostředí ústní dutiny zabraňuje přesycený roztok fosforečnanu vápenatého ve slině. Nežádoucím důsledkem těchto podmínek by byla precipitace fosforečnanu vápenatého v lalůčcích a vývodech slinných žláz a dále tvorba krystalů hydroxyapatitu na povrchu zubů. Uvedeným jevům zamezuje přítomnost několika peptidů a proteinů ve slině, jako jsou např. statherin a proteiny bohaté na prolin¹³.

Cílem článku je podat přehlednou informaci o struktuře, chování a funkcích vybraných skupin slinných proteinů a peptidů. Text bude zaměřen zejména na ty proteiny, popř. peptidy, jejichž přítomnost je nezbytná ve specifickém prostředí ústní dutiny. Soustředíme se zejména na fosforylované proteiny či peptidy, interagující

s hydroxyapatitem a tvořící součást antimikrobiální ochrany v ústech. Podobná práce v české literatuře není k dispozici.

2. Charakteristika vybraných proteinů ve slině

K hlavním skupinám slinných proteinů jsou řazeny muciny, slinná amylasa, proteiny bohaté na prolin, cystatiny, statherin, histatiny a karboanhydrasa, jejichž hmotnostní podíly ve slině jsou uvedeny na obr. 1. Tabulka I shrnuje základní údaje o proteinech a peptidech, kterými se budeme podrobněji zabývat v dalším textu.

2.1. Histatiny

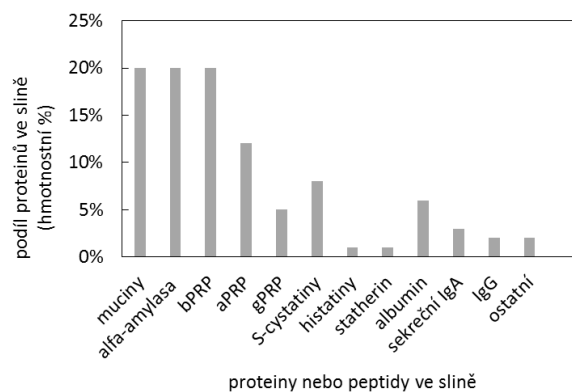
Histatiny představují rodinu strukturně příbuzných peptidů s neobvykle vysokým obsahem aminokyseliny histidinu¹⁴. Původně byly histatiny považovány za peptidy specificky produkované pouze ve slinných žlázách, ale nedávno byla prokázána produkce i v některých jiných tkáních¹⁵.

2.1.1. Struktura histatinů

Bylo charakterizováno nejméně 12 histatinů, které jsou produkty dvou genů a proteolytického štěpení. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 7 do 38 aminokyselinových zbytků. Hlavními zástupci jsou histatiny 1, 3 a 5 tvořené z 38, 32 a 24 aminokyselinových zbytků¹⁴. Histatiny 1 a 3 jsou kódovány geny *HTN1* a *HTN3*, histatin 5 vzniká proteolytickým odštěpením C-koncové části z histatinu 3.

Kromě dvou výjimek je sekvence prvních 22 aminokyselinových zbytků pro histatiny 1, 3 a 5 identická a sekvence sedmi zbytků na C-konci je společná pro histatin 1 a 3 (obr. 2). Prekurzorem ostatních histatinů jsou histatiny 1 a 3 (cit.^{14,16,17}).

Označení histatiny je odvozeno z primární struktury a antimikrobiálních vlastností. Jeden z dřívějších názvů, proteiny bohaté na histidin (HRPs – histidine-rich proteins), upozorňoval na vysoký podíl histidinu, který v histatinech tvoří kolem 18–29 % (cit.^{14,16}). Každý






Obr. 1. Zastoupení hlavních proteinů a peptidů ve slině. V grafu jsou uvedeny hlavní skupiny slinných proteinů (aPRP – kyselé proteiny bohaté na prolin, bPRP – bazické proteiny bohaté na prolin, gPRP – glykosylované proteiny bohaté na prolin). (přepřevzato podle cit.¹⁰)

Tabulka I
Přehled hlavních proteinů ve slině – vybrané skupiny

Protein/peptid	Počet aminokyselinových zbytků	Mr	Hlavní typy posttranslačních modifikací	Koncentrace v plné slině ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Původ ve slině
Histatin 1	38	4929	proteolýza, fosforylace, sulfatace	10,9–44,3	příušní, podjazyková a podčelistní žláza
Histatin 3	32	4063	proteolýza	1,7–11,8	příušní, podjazyková a podčelistní žláza
Kyselé proteiny bohaté na prolin	150 (171) ^a	15 000–17 000	proteolýza, fosforylace, transglutaminace	90–180	příušní, podjazyková a podčelistní žláza
Bazické a glykosylované proteiny bohaté na prolin	56–300	různá	proteolýza, fosforylace, transglutaminace, glykosylace	–	příušní žláza
Statherin	43	5000	fosforylace, proteolýza, transglutaminace	2–12	příušní, podčelistní a podjazyková žláza

^a Pouze jeden z kyselých proteinů bohatých na prolin je složen ze 171 aminokyselinových zbytků; (zpracováno podle cit.^{9,12,14,18,19,21,39,41})

Gen	Protein	Zjednodušené schéma molekuly		Počet aminokyselin
		N-konec	C-konec	
<i>HTN1</i>	Histatin 1			38
<i>HTN3</i>	Histatin 3			32
	Histatin 5			24

Obr. 2. Hlavní zástupci histatinů – strukturální vztahy mezi isoformami. Histatiny 1 a 3 jsou kódovány geny *HTN1* a *HTN3*, histatin 5 vzniká proteolytickým odštěpením C-koncové části z histatinu 3. (---- oblast chybějících částí polypeptidového řetězce), (přepřacováno podle cit.^{17,18})

z histatinů 1, 3 a 5 obsahuje sedm histidinových zbytků. Jediným fosforylovaným zástupcem je histatin 1, v němž je fosfát vázán na serinový zbytek Ser2 (cit.¹⁴).

Histatiny jsou charakterizovány převážně jako kationické proteiny, které ve vodném prostředí zaujímají strukturu náhodného klubka¹⁷. V polypeptidovém řetězci histatinů jsou rozlišovány domény odpovědné za specifické funkce. N-koncový úsek v histatinu 1 a 3 zabezpečuje antimikrobiální aktivitu a C-koncová doména se podílí na hojení ran podporou procesu epitelizace a angiogeneze. V N-koncových oblastech histatinů 3 a 5 byly popsány motivy umožňující vazbu kationtů kovů Cu^{2+} a Ni^{2+} a ve všech hlavních histatinech i místa schopná vytvářet komplex se Zn^{2+} (cit.¹⁷).

2.1.2. Histatiny v ústní dutině

Histatiny, jejichž podíl v plné slině představuje 1,0 až 1,5 % ze všech slinných proteinů, jsou secernovány velkými párovými slinnými žlázami. Nejvíce zastoupené histatiny 1, 3 a 5 tvoří kolem 80 % všech histatinů secernovaných slinnými žlázami^{14,18}. Koncentrace celkových histatinů ve slině produkované příušní žlázou po stimulaci její sekrece (např. žvýkáním) je $155 \pm 59 \mu\text{g ml}^{-1}$, ale koncentrace histatinů v plné slině s hodnotou $26,8 \pm 7,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ je několikanásobně nižší, než v sekretech slinných žláz¹⁹. Tento rozdíl je vysvětlován tím, že poté, co se histatiny uvolní ze slinné žlázy a dostanou se do kontaktu se součástí plné sliny, stávají se předmětem intenzivního proteolytického štěpení, na němž se účastní různé proteasy^{11,20–22}. Kromě toho se histatiny s vysokou afinitou adsorbují na povrch zubů jako součást získané pelikuly a rovněž mohou vytvářet komplexy s muciny nebo se prostřednictvím enzymu transglutaminasy propojují příčnými vazbami s dalšími proteiny a peptidy^{23,24}. Proteolytickému štěpení podléhají i histatiny vázané na povrch zubní skloviny²⁴.

2.1.3. Funkce histatinů

Účinky histatinů v ústní dutině se projevují v několika oblastech.

- Společně s dalšími peptidy a proteiny jsou histatiny řazeny mezi antimikrobiálně působící látky, které v ústech poskytují ochranu proti širokému spektru

mikrobů^{16,25,26}. Předpokládá se, že důležitou roli v jejich antibakteriálním působení hrají pozitivně nabitě skupiny, které se elektrostatickými interakcemi vážou na negativní náboje kyselých fosfolipidů přítomných v membránách bakterií. Integrace histatinů do buněčné membrány vyvolá její zvýšenou permeabilitu a narušení struktury, což může vyústit až v destrukci bakterií¹⁷. Významné je především fungistatické a fungicidní působení histatinů namířené proti *Candida albicans*¹⁴. Nejúčinněji *in vitro* působí histatin 5 (cit.¹⁷). Mechanismus, kterým histatiny zneškodňují *Candida albicans*, je popisován jako několikastupňový. Je zahájen internalizací histatinu 5 po navázání na membránový receptor. Uvnitř buňky může histatin ovlivňovat mitochondrie a indukovat tvorbu reaktivních forem kyslíku. Jinými uváděnými důsledky jsou únik ATP a K^+ z buňky a zástava buněčného cyklu v G1 fázi^{17,25,27}.

- Další účinky histatinů souvisejí s jejich schopností vytvářet komplexy s kovovými ionty¹⁷. Ionty se stávají nedostupné pro enzymy, což může ovlivnit růst bakterií²⁷. Vznik komplexů může také přispívat k uvolňování reaktivních forem kyslíku s nežádoucími účinky na různé buněčné struktury mikroorganismů.
- Histatiny představují slinné složky, které mohou chránit extracelulární součásti pojiva v ústní dutině. *In vitro* byly prokázány inhibiční účinky histatinů na bakteriální, ale i endogenní metaloproteasy podílející se na destrukci struktur bílkovinných součástí pojivové tkáně u onemocnění parodontu²⁸.
- Histatiny mají i schopnost vazby na hydroxyapatit, v níž hraje důležitou roli fosforylovaný serinový zbytek v histatinu 1, ale zřejmě i konformační změny navozené adsorpcí k hydroxyapatitu. Histatiny se podílejí na potlačení spontánního růstu hydroxyapatitových krystalů ve slinném prostředí přesyceného roztoku fosforečnanu vápenatého¹⁶.
- Významnou a intenzivně zkoumanou funkcí histatinů je urychlení hojení ran. Přítomnost histatinů ve slině je dáována do souvislosti se skutečností, že rány se v dutině ústní hojí rychleji než kožní poranění. Na C-konci molekuly histatinů 1 a 3 je lokalizována ob-

last, která se podílí na hojivých procesech. Histatiny podporují růst epiteliálních buněk a jejich migraci, což je předpokladem re-epitelizace a angiogeneze a podobným způsobem působí i na fibroblasty a některé další buněčné typy²⁹.

- Histatiny jsou peptidy vykazující vysokou afinitu k taniinům. Vytvářejí s nimi komplexy, které jsou stabilní ve střevě. Tím mohou omezovat některé negativní účinky taniinů (např. poškození sliznice gastrointestinálního traktu)³⁰.

2.2. Proteiny bohaté na prolin

Proteiny obsahující úseky bohaté na prolin jsou hojně zastoupeny u eukaryot i prokaryot. Jejich specifická struktura podmiňuje řadu důležitých funkcí v buňkách. V různých proteinech může být prolin soustředěn do krátkých repetitivních sekvencí nebo různě uspořádaných delších sekvencí. Ve skupině proteinů bohatých na prolin (PRP – prolin-rich proteins), které patří k nejhojnějším proteinovým složkám ve slině, je prolin obsažen v delších úsecích, které se tandemově opakují³¹.



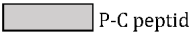


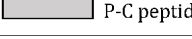







2.2.1. Struktura proteinů bohatých na prolin

Slinné PRP představují skupinu proteinů s charakteristickou primární strukturou³². Kromě vysokého obsahu prolinových zbytků, jež dosahuje v lidských PRP až 40 %, jsou v PRP početné zbytky glycinu, glutaminu a kyseliny glutamové¹⁸. Převažující zastoupení uvedených aminoky-

selin, které narušují vytváření α -helixu, způsobuje, že PRP zaujmají strukturu náhodného klubka³³. Slinné PRP se liší od jiných PRP (např. kolagenu) neobsahují hydroxylovaný prolin ani lysin¹⁸.

Lidské PRP jsou produkty šesti genů a vyznačují se výrazným polymorfismem²¹. Výsledkem RNA splicingu, proteolytického štěpení, odehrávajícího se před sekrecí, a dalších posttranslačních modifikací, jsou skupiny proteinů, obvykle označované jako kyselé, bazické a glykosylované PRP (cit.^{21,32,34}).

Molekuly kyselých PRP, na jejichž polypeptidovém řetězci se podílí s výjimkou jednoho PRP 150 aminokyselinových zbytků, jsou tvořeny dvěma hlavními doménami – N-koncovou, silně kyselou s malým obsahem prolinu, ale větším počtem zbytků kyseliny glutamové a asparagové, a delší C-koncovou částí s vysokým zastoupením prolinu, glutaminu a glycinu^{8,35}. Serinové zbytky v pozicích 8 a 22 mohou být fosforylovány oba současně nebo může být fosforylován pouze jeden z nich. V malé míře se může vyskytnout nefosforylovaná a trifosforylovaná varianta, v níž fosforylaci podléhá i serin na 17. pozici³⁶. Sekvence aminokyselin včetně fosforylace serinů podmiňuje výraznou asymetrii v molekule z hlediska rozložení nábojů. V prvních 29 aminokyselinových zbytcích v N-koncové části molekuly jsou soustředěny negativní náboje podstatné pro vazbu kladně nabitých Ca^{2+} iontů³⁷. N-konec kyselých PRP je zakončen zbytkem kyseliny pyroglutamové, která poskytuje ochranu před působením aminopeptidás^{35,38}. Intracelulárním proteolytickým štěpením vznikají

Gen	Protein	Zjednodušené schéma molekuly		Počet aminokyselinových zbytků
		N-konec	C-konec	
PRH1	Db-s			171
	Db-f		 P-C peptid	127
	PIF-s			150
	PIF-f		 P-C peptid	106
PRH2	Pa-dimer			2 x 150
	PRP1			150
	PRP3		 P-C peptid	106
	PRP2			150
	PRP4		 P-C peptid	106

Obr. 3. Hlavní zástupci kyselých proteinů bohatých na prolin a isoform vzniklých proteolýzou. Kyselé proteiny bohaté na prolin jsou kódovány dvěma geny *PRH1* a *PRH2*. Část kyselých proteinů bohatých na prolin podléhá intracelulárnímu proteolytickému štěpení, kterým vznikají zkrácené isoformy. Společným produktem uvedené proteolýzy je fragment jejich C-konce obsahující 44 aminokyselinových zbytků, tzv. P-C peptid. Jeden z kyselých proteinů bohatých na prolin (Pa) vytváří dimer.

zkrácené isoformy odpovídajících kyselých PRP. Společným produktem uvedené proteolýzy kyselých PRP je fragment jejich C-konce obsahující 44 aminokyselinových zbytků, tzv. P-C peptid. Štěpení ale nepodléhají všechny kyselá PRP a ve slině se společně s proteolytickými fragmenty nacházejí i intaktní kyselá PRP (cit.^{21,35,37,39}). Jeden z kyselých PRP je ve slině přítomen ve formě dimeru spojeného disulfidovým můstkem (obr. 3).

Bazické PRP tvoří skupinu vysoce polymorfních proteinů, lišících se v primární struktuře a různých posttranslačních modifikacích zmiňovaných u kyselých PRP, jako jsou proteolytická štěpení, fosforylace a vytvoření zbytku kyseliny pyroglutamové na N-konci^{18,39,40}. Posttranslační úpravy jsou zahajovány intracelulárně a pokračují i v extracelulárním prostředí ve vývodech slinných žláz a v ústní dutině. Významná je i proteolýza, které se účastní bakteriální endoproteasy. Výsledkem jsou peptidy o délce 7–20 aminokyselinových zbytků³⁹. Na rozdíl od kyselých PRP nejsou ve slině prokazovány bazické PRP ve formě neštěpených proproteinů³⁶.

Bazické PRP kromě již zmíněných posttranslačních modifikací podléhají i glykosylaci, jejíž produkty jsou zahrnovány pod samostatnou skupinu glykosylovaných PRP. Připojení oligosacharidů s variabilním složením se děje prostřednictvím N- a O-glykosidových vazeb na různých glykosylačních místech³⁹.

2.2.2. Proteiny bohaté na prolin v ústní dutině

Skupina heterogenních PRP tvoří ve slině téměř 40 % všech proteinů a peptidů¹⁰. Kyselá PRP, které představují asi jednu třetinu mezi všemi PRP, jsou produkovány pouze slinnými žlázami. Hodnoty koncentrací kyselých PRP jsou v plné slině po stimulaci ve srovnání s jinými slinnými proteiny vysoké, a to v rozsahu $430 \pm 130 \mu\text{g ml}^{-1}$. V sekretech z příušní žlázy jsou hladiny dokonce 1,5krát vyšší než v plné slině¹⁹.

Bazické PRP jsou také syntetizovány ve slinných žlázách, především v *gl. parotis*, ale jejich přítomnost je prokazována i v jiných sekretech^{10,41}. Jejich koncentrace se zvyšuje v průběhu dětství až do období dospívání zřejmě v závislosti na hormonálních, ale i dietních změnách⁴². Ve slině se odehrává fragmentace PRP, při níž se tvoří i fosfopeptidy. Řada z nich jsou N-koncové fragmenty vzniklé proteolýzou kyselých PRP a účinné v inhibici precipitace fosforečnanu vápenatého^{43,44}.

PRP se vážou na povrch zubů a stávají se součástí získané pelikuly. V menším množství PRP nalézáme i ve slizniční pelikule, kde se předpokládá jejich účast v lubrikaci, hydrataci, popř. interakci s mikroorganismy^{24,45,46}.

2.2.3. Funkce proteinů bohatých na prolin

Podobně jako histatiny i PRP se svými účinky podílejí na interakcích s vápenatými ionty nebo ovlivňují vazby mikroorganismů k povrchům skloviny.

- Hlavní funkce kyselých PRP spočívá v účasti na udržování homeostázy vápníku v prostředí ústní dutiny³⁷. Toto působení kyselých PRP je podmíněno zápornými

náboji kyselých aminokyselin, ale i fosforylací obou serinových zbytků N-domény, která vykazuje vysokou afinitu k hydroxyapatitu a schopnost vázat vápenaté ionty^{8,18}. Adsorpce kyselých PRP na povrch zubu zamezuje sekundárnímu růstu krystalů hydroxyapatitu na povrchu zubů, ale nikoliv primární precipitaci fosforečnanu vápenatého při fyziologických koncentracích^{34,39,47}.

- Vazba PRP na hydroxyapatit skloviny prostřednictvím N-domény navozuje konformační změnu v molekule proteinu, při níž se odhalí C-koncový úsek molekuly, umožňující vazbu bakterií. Kratší fragmenty kyselých PRP zahrnující N-úsek molekuly schopnost vazby bakterií postrádají a naopak s nativními PRP soutěží o vazbu na hydroxyapatit⁸. Podobně jako kyselá PRP i skupina bazických PRP váže mikroorganismy. Zatím není plně prozkoumána úloha četných peptidových fragmentů. Přítomnost některých z nich byla prokázána v získané pelikule³⁹.
- Účinky glykosylovaných PRP vyplývají z přítomnosti připojených sacharidů. Podobně jako muciny napomáhají lubrikaci a poskytují ochranu tvrdým i měkkým tkáním ústní dutiny. Chrání i proti různým patogenům. Prostřednictvím značně variabilní sacharidové složky jsou glykosylované PRP schopny vázat různé mikroorganismy a napomáhat jejich odstranění z ústní dutiny^{21,39}.
- PRP, zejména bazické, vykazují výraznou afinitu k taninům. Stejně jako histatiny s nimi tvoří stabilní komplexy⁴⁸ a omezují jejich absorpci v gastrointestinálním traktu⁴⁹.

2.3. Statherin

Statherin představuje další multifunkční peptid ve slině, jehož význam spočívá zejména ve stabilizaci zubní skloviny. Ve slinném prostředí přesyceného roztoku reguluje statherin primární (spontánní) i sekundární precipitaci (růst krystalů) fosforečnanu vápenatého¹⁸. Název statherin má původ v řeckém slovu *statheropio*, což znamená stabilizovat⁵⁰.

2.3.1. Struktura statherinu

Statherin, produkt jednoho genu, je peptid tvořený 43 aminokyselinovými zbytky o relativní molekulové hmotnosti 5380 (cit.³⁷). Na N-konci v první třetině molekuly je soustředěna většina nabitých aminokyselinových zbytků a v poloze 2 a 3 dva sousedící fosforylované serinové zbytky, po kterých bezprostředně následují dva zbytky kyseliny glutamové. Kyselá část molekuly zahrnující prvních pět aminokyselin umožňuje vazbu vápenatých iontů. V dalších dvou třetinách molekuly představuje tyrosin téměř jednu čtvrtinu aminokyselin a přispívá k hydrofobnímu charakteru této struktury^{50,51}. Existuje varianta statherinu označovaná SV2, která postrádá vnitřní úsek 10 aminokyselinových zbytků obsahující všechny bazické aminokyseliny. Je produktem alternativního sestřihu mRNA. Z polypeptidového řetězce statherinu i jeho

varianty SV2 může být posttranslačně proteolýzou odštěpen fenylalanin na C-konci, což se projeví snížením hydrofobicity molekuly^{18,21,52} (obr. 4).

Ve vodném prostředí statherin nezaujímá žádnou ze sekundárních struktur a je řazen mezi nestrukturované proteiny^{53,54}. N-koncová doména statherinu, pokud je vázána k povrchu hydroxyapatitu, má potenciál vytvořit strukturu α -helixu. Úsek N-konce s dvěma fosforylovanými serinovými zbytky a dvěma karboxylovými skupinami umožňuje pevnější interakci s hydroxyapatitovým povrchem, zatímco zbylá část α -helixu je připojena méně pevně⁵⁴.

2.3.2. Statherin v ústní dutině

Statherin produkují především příušní, podčelistní a von Ebnerovy slinné žlázy, ale nepatří mezi peptidy specifické pouze pro sliny^{41,55}. Statherin je prokazován i v jiných biologických tekutinách, jako jsou slzy a bronchiální a nosní sekrety⁴¹.

Koncentrace statherinu ve slině vykazuje výrazné interindividuální diference, ale na rozdíl od histatinů nebyly prokázány cirkadiální rytmy⁵⁶. Rozmezí koncentrací statherinu v sekretech příušní žlázy je 17,7–208,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a je pouze mírně vyšší než v sekretech podčelistní a podjazykové žlázy na rozdíl od plné sliny, v níž byly naměřeny řádově nižší hladiny (2,5–12,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (cit.⁵⁷). Tak významný rozdíl mezi koncentracemi statherinu v sekretech slinných žláz a plnou slinou, který v této míře u jiných slinných proteinů či peptidů není pozorován, je mimo jiné podobně jako u histatinů vysvětlován degradací peptidu a výraznou adsorbí na povrch zubů¹⁸. V sekretech slinných žláz byl statherin popsán jako jedna ze složek heterotypických komplexů s muciny, které by mohly poskytovat ochranu před proteolýzou, ale také představovat zásobní formu pro získanou pelikulu⁵⁸.

Statherin patří mezi hlavní složky získané pelikuly a v menší míře je prokazován i jako součást slizniční pelikuly^{24,45,57}.

2.3.3. Funkce statherinu

- Hlavní funkce statherinu souvisí s homeostázou vápníku v ústní dutině. Statherin efektivně inhibuje při-

mární precipitaci fosforečnanu vápenatého na rozdíl od jiných slinných proteinů a peptidů⁵⁹. Na účinné inhibici spontánní precipitace vápenatých solí v přesyceném roztoku sliny (primární precipitace) se účastní celá molekula⁶⁰. Společně s dalšími slinnými proteiny působí statherin také jako inhibitor sekundární precipitace fosforečnanu vápenatého^{60,61}. Pomocí N-konce polypeptidového řetězce se může vázat na hydroxyapatit skloviny a tím zamezit růstu krystalů hydroxyapatitu na povrchu zubů^{53,54}. Vrstvička obohacená statherinem a vápníkem, která byla prokázána na povrchu zubů, může podporovat mineralizaci zubů bez projevů nežádoucí sekundární precipitace⁶².





- Statherin připojený k hydroxyapatitu skloviny je jedním z prekurzorů získané pelikuly a prostřednictvím hydrofobní C-domény je schopen vázat některé bakterie na povrch zubů^{63,64}. Na druhé straně tím, že statherin společně s dalšími proteiny některé mikroorganismy agreguje, jejich schopnost adheze může být potlačena⁶⁵.
- Molekula statherinu může za určitých podmínek projevovat amfipatické vlastnosti a na povrchu zubů fungovat jako přirozený lubrikant^{66,67}.

3. Závěr

Slina je perspektivní biologická tekutina a proteiny a peptidy představují její významnou složku. Svými účinky slinné proteiny a peptidy zajišťují optimální prostředí v ústní dutině, která je vystavena nejrůznějším vlivům ze zevního prostředí.

Proteiny a peptidy ve slině jsou tvořeny heterogenním souborem po stránce strukturální i funkční. Některé z nich jsou prokazovány pouze ve slině, jiné jsou přítomné i v dalších biologických tekutinách. Náročnost analýzy slinných proteinů je dána četnými posttranslačními modifikacemi a degradačními procesy, které se v ústech odehrávají zejména vlivem bakteriálních enzymů.

Studium slinných proteinů a peptidů přináší cenné poznatky perspektivně aplikovatelné pro diagnostické úče-

Gen	Protein	Zjednodušené schéma molekuly		Počet aminokyselinových zbytků
		N-konec	C-konec	
<i>STATH</i>	Statherin			43
	SV1			42
<i>STATH</i>	SV2			33
	SV3			32

Obr. 4. **Statheriny – strukturální vztahy mezi isoformami.** Statherin je produkt jednoho genu *STATH*. Výsledkem alternativního sestřihu mRNA je varianta statherinu označovaná SV2, která postrádá vnitřní úsek 10 aminokyselinových zbytků. Posttranslační proteolýzou statherinu nebo varianty SV2 může být na C-konci odštěpen fenylalanin. Vzniklé produkty se označují SV1 a SV3. (---- oblast chybějících částí polypeptidového řetězce), (přepřacováno podle cit.¹⁸)

ly a monitorování různých onemocnění. Otevírají se i další možnosti jejich využití, např. jako účinných antimikrobiálních prostředků a látek podporujících hojení ran (např. histatiny)²⁹. Tyto aplikace jsou však zatím ve fázi primárního výzkumu.

Práce byla podpořena projekty PROGRES Q25 a MZ ČR – RVO VFN64165, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze.

LITERATURA

- Nunes L. A., Mussavira S., Bindhu O. S.: *Biochem. Med. (Zagreb)* 25, 177 (2015).
- Malamud D.: *Dent. Clin. North. Am.* 55, 159 (2011).
- Ruhl S.: *Expert Rev. Proteomics* 9, 85 (2012).
- Janšáková K., Celec P., Tóthová L.: *Klin. Biochem. Metab.* 26, 21 (2018).
- Castagnola M. a 11 spoluautorů: *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 31, 347 (2011).
- Kaufman E., Lamster I. B.: *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 13, 197 (2002).
- Koscielniak D., Jurczak A., Zygmunt A., Krzysciak W.: *Acta Biochim. Pol.* 59, 451 (2012).
- Lamkin M. S., Oppenheim F. G.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 251 (1993).
- Messana I., Inzitari R., Fanali C., Cabras T., Castagnola M.: *J. Sep. Sci.* 31, 1948 (2008).
- Scarano E. a 10 spoluautorů: *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 30, 125 (2010).
- Amado F., Lobo M. J., Domingues P., Duarte J. A., Vitorino R.: *Expert Rev. Proteomics* 7, 709 (2010).
- Castagnola M., Cabras T., Vitali A., Sanna M. T., Messana I.: *Trends Biotechnol.* 29, 409 (2011).
- Levine M. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 694, 11 (1993).
- Oppenheim F. G., Xu T., McMillian F. M., Levitz S. M., Diamond R. D., Offner G. D., Troxler R. F.: *J. Biol. Chem.* 263, 7472 (1988).
- Shah D., Ali M., Pasha Z., Jaboori A. J., Jassim S. H., Jain S., Aakalu V. K.: *PLoS One* 11, e0148018 (2016). doi: 10.1371/journal.pone.0148018.
- Oppenheim F. G., v knize: *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology* (Tenovuo J. O., ed.), svazek I, kapitola 6, str. 151. CRC Press, Boca Raton 1989.
- Melino S., Santone C., Di Nardo P., Sarkar B.: *FEBS J.* 281, 657 (2014).
- Oppenheim F. G., Salih E., Siqueira W. L., Zhang W., Helmerhorst E. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1098, 22 (2007).
- Campese M., Sun X., Bosch J. A., Oppenheim F. G., Helmerhorst E. J.: *Arch. Oral Biol.* 54, 345 (2009).
- Ekström J., Khosravani N., Castagnola M., Messana I., v knize: *Dysphagia: Diagnosis and Treatment*, série Medical Radiology (Ekberg O., ed.), str. 19. Springer-Verlag, Berlin 2012.
- Helmerhorst E. J., Oppenheim F. G.: *J. Dent. Res.* 86, 680 (2007).
- Helmerhorst E. J., Alagl A. S., Siqueira W. L., Oppenheim F. G.: *Arch. Oral Biol.* 51, 1061 (2006).
- Yao Y., Lamkin M. S., Oppenheim F. G.: *J. Dent. Res.* 78, 1696 (1999).
- Lee Y. H., Zimmerman J. N., Custodio W., Xiao Y., Basiri T., Hatibovic-Kofman S., Siqueira W. L.: *PLoS One* 8, e67919 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0067919.
- De Smet K., Contreras R.: *Biotechnol. Lett.* 27, 1337 (2005).
- Fabian T. K., Hermann P., Beck A., Fejerdy P., Fabian G.: *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4295 (2012).
- Wiesner J., Vilcinskas A.: *Virulence* 1, 440 (2010).
- Gusman H., Travis J., Helmerhorst E. J., Potempa J., Troxler R. F., Oppenheim F. G.: *Infect. Immun.* 69, 1402 (2001).
- Torres P., Castro M., Reyes M., Torres V. A.: *Oral Dis.* 24, 1150 (2018).
- Shimada T.: *J. Chem. Ecol.* 32, 1149 (2006).
- Williamson M. P.: *Biochem. J.* 297 (Pt 2), 249 (1994).
- Bennick A.: *J. Dent. Res.* 66, 457 (1987).
- Murray N. J., Williamson M. P.: *Eur. J. Biochem.* 219, 915 (1994).
- Bennick A.: *Mol. Cell. Biochem.* 45, 83 (1982).
- Hay D. I., Bennick A., Schlesinger D. H., Minaguchi K., Madapallimattam G., Schluckebier S. K.: *Biochem. J.* 255, 15 (1988).
- Messana I. a 19 spoluautorů: *Mol. Cell. Proteomics* 7, 911 (2008).
- Hay D. I., Moreno E. C., v knize: *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology* (Tenovuo J. O., ed.), svazek I, kapitola 5, str. 131. CRC Press, Boca Raton 1989.
- Inzitari R., Cabras T., Onnis G., Olmi C., Mastinu A., Sanna M. T., Pellegrini M. G., Castagnola M., Messana I.: *Proteomics* 5, 805 (2005).
- Manconi B., Castagnola M., Cabras T., Olianias A., Vitali A., Desiderio C., Sanna M. T., Messana I.: *J. Proteomics* 134, 47 (2016).
- Padiglia A., Orru R., Boroumand M., Olianias A.: *J. Proteome Res.* 17, 3292 (2018).
- Schenkels L. C., Veerman E. C., Nieuw Amerongen A. V.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6, 161 (1995).
- Cabras T., Pisano E., Boi R., Olianias A., Manconi B., Inzitari R., Fanali C., Giardina B., Castagnola M., Messana I.: *J. Proteome Res.* 8, 4126 (2009).
- Minaguchi K., Madapallimattam G., Bennick A.: *Biochem. J.* 250, 171 (1988).
- Bennick A., Chau G., Goodlin R., Abrams S., Tustian D., Madapallimattam G.: *Arch. Oral Biol.* 28, 19 (1983).
- Hannig C., Hannig M., Kensche A., Carpenter G.: *Arch. Oral Biol.* 80, 144 (2017).
- Yakubov G., Gibbins H. B., Proctor G., Carpenter G., v knize: *Mucoadhesive Materials and Drug Delivery Systems* (Khutoryanskiy V. V., ed.), str. 1. J. Wiley, Chichester 2014.
- Hay D. I., Carlson E. R., Schluckebier S. K., Moreno

- E. C., Schlesinger D. H.: *Calcif. Tissue Int.* 40, 126 (1987).
48. Lu Y., Bennick A.: *Arch. Oral Biol.* 43, 717 (1998).
 49. Bennick A.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13, 184 (2002).
 50. Schlesinger D. H., Hay D. I.: *J. Biol. Chem.* 252, 1689 (1977).
 51. Raj P. A., Johnsson M., Levine M. J., Nancollas G. H.: *J. Biol. Chem.* 267, 5968 (1992).
 52. Jensen J. L., Lamkin M. S., Troxler R. F., Oppenheim F. G.: *Arch. Oral Biol.* 36, 529 (1991).
 53. Goobes G. a 11 spoluautorů: *Magn. Reson. Chem.* 45, S32 (2007).
 54. Stayton P. S., Drobny G. P., Shaw W. J., Long J. R., Gilbert M.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14, 370 (2003).
 55. Azen E. A., Hellekant G., Sabatini L. M., Warner T. F.: *J. Dent. Res.* 69, 1724 (1990).
 56. Castagnola M. a 11 spoluautorů: *Biol. Rhythm Res.* 33, 213 (2002).
 57. Li J., Helmerhorst E. J., Yao Y., Nunn M. E., Troxler R. F., Oppenheim F. G.: *Arch. Oral Biol.* 49, 379 (2004).
 58. Iontcheva I., Oppenheim F. G., Troxler R. F.: *J. Dent. Res.* 76, 734 (1997).
 59. Hay D. I., Smith D. J., Schluckebier S. K., Moreno E. C.: *J. Dent. Res.* 63, 857 (1984).
 60. Schwartz S. S., Hay D. I., Schluckebier S. K.: *Calcif. Tissue Int.* 50, 511 (1992).
 61. Hay D. I., Moreno E. C., Schlesinger D. H.: *Inorg. Perspect. Biol.* 2, 271 (1979).
 62. Proctor G. B., Hamdan S., Carpenter G. H., Wilde P.: *Biochem. J.* 389, 111 (2005).
 63. Amano A., Sojar H. T., Lee J. Y., Sharma A., Levine M. J., Genco R. J.: *Infect. Immun.* 62, 3372 (1994).
 64. Goobes G., Goobes R., Schueler-Furman O., Baker D., Stayton P. S., Drobny G. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 16083 (2006).
 65. Humphrey S. P., Williamson R. T.: *J. Prosthet. Dent.* 85, 162 (2001).
 66. Douglas W. H., Reeh E. S., Ramasubbu N., Raj P. A., Bhandary K. K., Levine M. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 91 (1991).
 67. Ramasubbu N., Thomas L. M., Bhandary K. K., Levine M. J.: *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4, 363 (1993).
- L. Fialová** (*Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University, and General University Hospital in Prague, Prague*): **Salivary Peptides and Proteins, Their Structure and Importance in the Oral Cavity**
- Proteins and peptides represent important components of saliva. A wide spectrum of their effects is necessary for physiological function of the oral cavity. The aim of the article is to provide review information on selected groups of salivary proteins and peptides, namely histatins, proline-rich proteins and statherin. Attention is paid to their structure, behavior in the mouth and functions.
- Keywords: histatin, proline-rich proteins, saliva, statherin
- Acknowledgements*
This work was supported by projects *PROGRES Q25* and *RVO VFN64165*, General University Hospital in Prague from the Ministry of Health of the Czech Republic.