

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Studijní obor: Speciální chemicko – biologické obory



Anna Deylová

**Intramembránové proteázy a jejich medicínský význam
Inramembrane proteases and their medical significance**

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Kvido Stříšovský, Ph.D.

Praha, 2018

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Kvidovi Stříšovskému, Ph.D. za pomoc, rady a trpělivost při psaní této práce. Dále svým spolupracovníkům z laboratoře rovněž za trpělivost a cenné rady.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 06.05.2018

Anna Deylová

Obsah

1. Abstrakt.....	1
Abstract	2
2. Úvod	3
2.1 Proteolýza membránových proteinů jako regulační mechanismus.....	3
2.2 'Juxtamembránová' versus 'intramembránová' proteolýza	3
3. Intramembránové proteázy – obecné poznámky	5
3.1 Historie objevů a rozdělení dle katalytického typu	5
3.3 Struktury	5
3.4 Mechanismus katalýzy	7
4. Intramembránové metaloproteázy (S2P)	10
4.1 Metabolismus cholesterolu	10
4.2 Extracytoplazmatický stres u <i>E. coli</i>	10
4.3 Degradace signálních peptidů u <i>E. coli</i>	11
4.4 Metabolismus lipidů u <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
5. Aspartátové intramembránové proteázy	12
5.1 Vývojová signalizace přes Notch receptor	12
5.2 Alzheimerova choroba.....	12
5.3 Infekce prvokem <i>Plasmodium falciparum</i>	13
5.4 Maturace viru hepatitidy C, Bunyamwera viru a viru prasečí chřipky.....	13
5.5 Kontrola kvality membránových proteinů.....	14
5.6 Modulace imunity.....	15
6. Rhomboidy - serinové intramembránové proteázy	16
6.1 Sekrece ligandů EGF receptoru	16
6.2 Kontrola kvality membránových proteinů.....	17
6.3 Infekce prvokem <i>Plasmodium falciparum</i>	17
6.4 Infekce parazitem <i>Entamoeba histolytica</i>	17
6.5 Mitochondriální dysfunkce.....	18
6.6 Apoptóza	18
7. Závěr.....	19
Seznam zkratk	21
Použitá literatura	23

1. Abstrakt

Intramembránové proteázy jsou membránové enzymy, které mají aktivní místo zanořeno pod povrch buněčné lipidové membrány a které štěpí ostatní membránové proteiny uvnitř jejich transmembránových domén. Podle svého katalytického mechanismu se dělí na celkem čtyři rodiny – aspartátové, serinové (často nazývané rhomboidy), metaloproteázy a nejnověji popsané glutamátové. Štěpením uvnitř lipidové dvojvrstvy ovlivňují mnoho biologicky významných dějů jako je metabolismus lipidů, buněčná proliferace či adheze, regulace vývojové signalizace, degradace signálních peptidů a obecně kontrola kvality membránových proteinů. Tato práce se zaměřuje především na jejich roli v různých původcích onemocnění a biologických mechanismech spojených s patologickými ději. Jedná se především o Alzheimerovu chorobu, infekci jednobuněčnými parazity (*Mycobacterium tuberculosis*, *Entamoeba histolytica* a *Plasmodium falciparum*), maturaci viru hepatitidy C, Bunyamwera viru a viru prasečí chřipky a mitochondriální dysfunkce.

Klíčová slova: intramembránová proteáza, metabolismus lipidů, kontrola kvality membránových proteinů, Alzheimerova choroba, infekce jednobuněčnými parazity, maturace viru hepatitidy C, mitochondriální dysfunkce

Abstract

Intramembrane proteases are membrane enzymes whose active site is buried below the surface of the biological lipid membrane, and which cleave other membrane proteins within their transmembrane domains. They are divided into four families according to their catalytic residues – aspartate, serine (often called rhomboids), metalloproteases and the recently described glutamate proteases. By proteolytic cleavage inside lipid bilayer they affect many significant biological processes such as metabolism of lipids, cell proliferation and adhesion, regulation of developmental signaling, degradation of signal peptides, and membrane protein quality control. This work focusses on the role of intramembrane proteases in various diseases and biological mechanisms associated with pathological processes. These are specifically Alzheimer's disease, infection by unicellular parasites (*Mycobacterium tuberculosis*, *Entamoeba histolytica* and *Plasmodium falciparum*), maturation of hepatitis C virus, Bunyamwera virus and swine influenza virus, and mitochondrial dysfunction.

Keywords: intramembrane proteases, lipid metabolism, membrane protein quality control, Alzheimer's disease, infection by unicellular parasites, maturation of Hepatitis C virus, mitochondrial dysfunction

2. Úvod

2.1 Proteolýza membránových proteinů jako regulační mechanismus

Štěpení proteinů v buňce zajišťují hydrolytické enzymy zvané proteázy. Jsou lokalizovány ve všech buněčných kompartmentech včetně plazmatické membrány. Proteázy se angažují v degradačních procesech (proteazom, lyzozomální proteázy), ale velmi často mají i jemnější regulační funkci. Konkrétně velké množství membránových proteinů na plazmatické membráně, jako třeba cytokiny, růstové faktory, buněčné adheziny, enzymy a mnoho dalších, jsou regulovaně štěpeny tak, že je jejich extracelulární doména (ektodoména) oddělena od svého membránového zakotvení. Tento proces, zvaný ectodomain shedding (štěpení ektodomén), ovlivňuje široké spektrum proteinů, které hrají zásadní úlohy v imunitních reakcích, růstu buněk, jejich adhezi na povrchy a mnoho dalšího (Arribas et al., 1996). Proteolýza na buněčném povrchu je tedy nezbytným regulačním krokem celé řady důležitých biologických dějů. Specifikum proteáz je to, že proteolýza je ve vodném prostředí nevratný děj a proteázy tak dávají signálním drahám jasnou směrovost.

Samotný ectodomain shedding může být indukován mnoha faktory – phorbolovými estery, cytokiny, růstovými faktory, buněčným stresem, vápníkovými ionofory a bakteriálními toxiny (Fitzgerald et al., 2000). Proteázy zajišťující shedding se nazývají sheddázy. Příkladem významné sheddázy je např. TNF α converting enzyme (TACE) patřící do rodiny ADAM (a disintegrin and metalloprotease) (Schlondorff and Blobel, 1999). TACE je sheddázou pro povrchové molekuly, například L-selektin či TGF α a jiné ligandy EGF receptoru. Další sheddázy z rodiny ADAM štěpí třeba E- a N-kadherin, Notch a mnoho dalších (Peschon et al., 1998). Ectodomain shedding tedy reguluje expresi a funkce biologicky aktivních molekul v buněčné adhezi, migraci, proliferaci, diferenciaci a smrti, což jsou všechno nanejvýš důležité biologické děje (Hayashida et al., 2010). Ectodomain shedding je tudíž podstatný pro řadu závažných nemocí, jako například rakovinu (Borrell-Pagès et al., 2003), infekce (Gibot et al., 2004), Alzheimerovu chorobu (Lichtenthaler and Haass, 2004) či mnohé zánětlivé choroby (Garton et al., 2006).

2.2 'Juxtamembránová' versus 'intramembránová' proteolýza

Proteázy bývají zakotveny v membráně různými způsoby. Většinou je globulární proteázová doména připojena k membráně transmembránovým α -helixem, což je případ ADAM proteáz. V posledních 20 letech bylo zjištěno, že existuje několik rodin proteáz, jejichž katalytická doména je tvořena transmembránovými α -helixy a jejich aktivní místo je plně zanořeno do hydrofobní části lipidové membrány. Tyto enzymy se nazývají intramembránové proteázy (IMPR) (Strisovsky, 2016).

Důsledkem umístění aktivního místa IMPR uvnitř membrány je, že jejich aktivita může podléhat změnám vlastností lipidové dvojvrstvy. Tím se IMPR principiálně liší od globulárních sheddáz popsaných výše. Další odlišnost IMPR je, že štěpí své substráty uvnitř jejich transmembránového α -helixu. Tím vznikne polární nebo nabitý konec polypeptidového řetězce v hydrofobním prostředí membrány, což je energeticky nevýhodné a může být kompenzováno vypuštěním tohoto zbytku z membrány ven, či jeho agregací (Strisovsky, 2016). Cílem této práce je stručně shrnout doposud známé biologické funkce těchto proteáz a nastínit jejich úlohu v nejrůznějších patologických dějích.

3. Intramembránové proteázy – obecné poznámky

3.1 Historie objevů a rozdělení dle katalytického typu

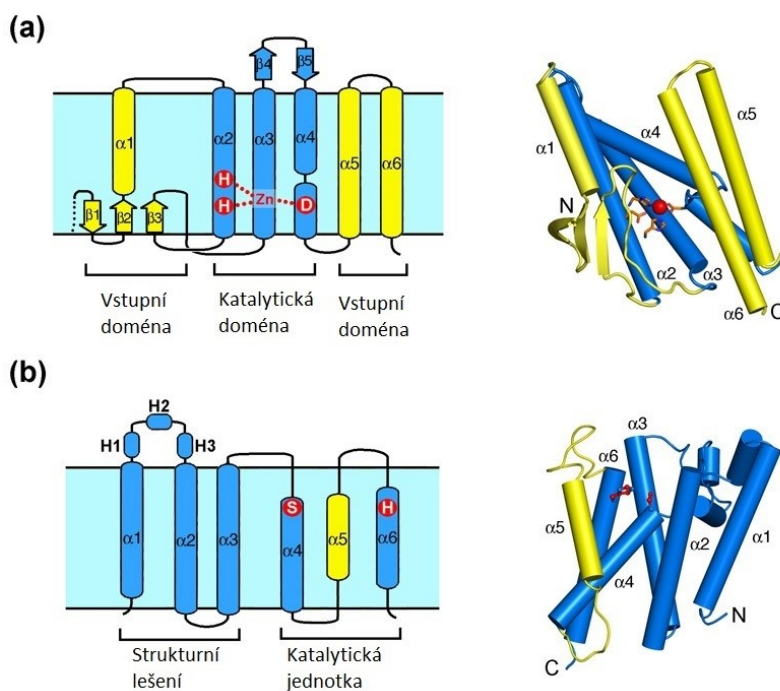
Intramembránové proteázy se dělí celkem na 4 třídy podle jejich katalytického mechanismu: serinové, aspartátové, metaloproteázy a nejnověji objevené glutamátové (Manolaridis et al., 2013). První objev intramembránových proteáz přišel společně s výzkumy regulace metabolismu sterolu a mastných kyselin (Brown and Goldstein, 1997). Jednalo se o metaloproteázu site-2 protease (S2P), účastníci se metabolismu cholesterolu (Duncan et al., 1998). Brzy byla identifikována první aspartátová IMPR – γ -sekretáza, komplex, jehož proteolytickou složkou je presenilin (Kimberly et al., 2000) a jehož mutace jsou spojeny s časným propuknutím Alzheimerovy choroby (Li et al., 1995). Dalším členem rodiny aspartátových IMPR je signal peptide peptidase (SPP). Matoucí je, že jméno SPP bylo poprvé použito pro SppA u *E.coli* (proteáza IV), což je serinová proteáza, která nemá nic společného se savčí SPP, kromě schopnosti štěpit signální peptidy (i když s úplně jinou specifitou) (Ichihara et al., 1986). Později byla objevena rodina serinových intramembránových proteáz nazývaných také rhomboidy, dle jména genu pro prvního člena této rodiny v *Drosophila*. Zde proteáza umožňuje štěpením sekreci růstových faktorů z jejich membránových prekurzorů v Golgiho aparátu (Urban et al., 2001).

Nejnovější studie naznačují, že proteiny se strukturním motivem CAAX (C - cystein, A – alifatická aminokyselina, X – jakákoliv aminokyselina) jsou procesovány členy úplně nové rodiny intramembránových proteáz – glutamátových (Manolaridis et al., 2013). Hlavní proteázová aktivita je zprostředkována Ras a α -faktor konvertujícím enzymem – Rce1 (Schmidt et al., 1998). Ten je kromě zajištění proteolytického zpracování Ras proteinů v membráně (Bergo et al., 2002) zřejmě důležitý pro přežití fotoreceptorových buněk, přestože se zdá, že pro jejich vývoj esenciální není (Christiansen et al., 2011). Rce1 tak hraje důležitou roli v mnoha signalizačních drahách a kontrolních procesech, jako diferenciace, proliferace a karcinogeneze (Bergo et al., 2002).

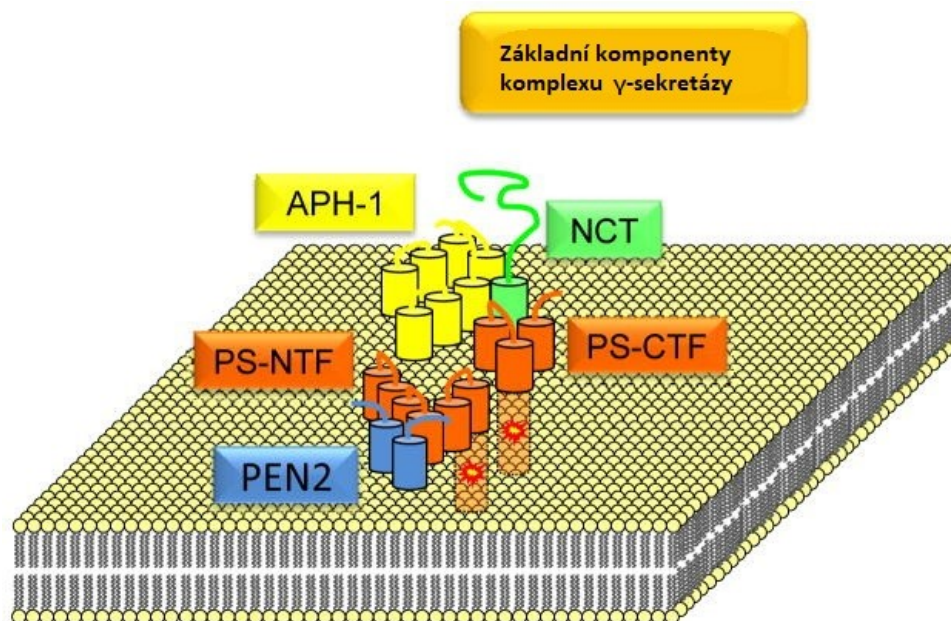
3.3 Struktury

Katalytická doména intramembránových proteáz je tvořena transmembránovými α -helixy, jejichž počet se v rámci jednotlivých rodin liší. Například S2P se skládá ze šesti transmembránových helixů (Obr. 1), přičemž katalytické jádro tvoří 3 helixy. Z toho helixy 2 a 4 nesou metaloproteázový motiv, jehož dva histidinové a jeden aspartátový zbytek vážou zinečnatý kationt, jehož funkce je aktivovat molekulu vody pro hydrolýzu (Feng et al., 2007; Kroos and Akiyama, 2013).

Zatímco rhomboidy, S2P a SPP jsou autonomní proteázy nevyžadující žádné další proteinové kofaktory, γ -sekretáza (Obr. 2) je obligátní heterotetramer tvořený presenilinem, Aph-1, Pen-2 a Nicastrinem (De Strooper, 2003). Komplex dále obsahuje dvě nedávno objevené fakultativní podjednotky - CD147 (Zhou et al., 2005) a TMP21, které rovněž ovlivňují aktivitu komplexu, ale nejsou pro ni esenciální (Pardossi-Piquard et al., 2009). Presenilin tvoří aktivní místo s katalytickými aspartáty a pravděpodobně také „dokovací místo“ (docking site), kudy se dostává transmembránový substrát k aktivnímu místu enzymu (Kornilova et al., 2005). Nicastrin rovněž přispívá k rozpoznávání substrátu, jeho ektodoména interaguje s N-konci substrátů (Shah et al., 2005). U Aph-1 se předpokládá, že slouží jako jakési lešení pro komplex γ -sekretázy, a Pen-2 zřejmě napomáhá autokatalytickému štěpení presenilinu v aktivní heterodimer (Shirotani et al., 2007). Celý proteinový komplex γ -sekretázy štěpí mnoho membránových proteinů typu I (C-konec proteinu se nachází na cytosolické straně membrány, u membránových proteinů typu II se na cytosolické straně membrány nachází N-konec proteinu) (Kopan and Ilagan, 2004).



Obr. 1: Obrázek (a) ukazuje strukturu zinkové metaloproteázy z *M. jannaschii*. Červeně je vyznačen zinečnatý kationt a katalytické zbytky. Konzervované transmembránové helixy jsou vyznačeny modře. Obrázek (b) znázorňuje strukturu GlpG - rhomboidu (serinové IMPR) z *E. coli*. Katalytické zbytky jsou opět vyznačeny červeně. U žlutě vyznačených segmentů se předpokládá, že interagují se substrátem. Na obou obrázcích je extracelulární strana membrány nahoře a cytosolická dole. Převzato z (Urban and Shi, 2008).



Obr. 2: Na obrázku je znázorněn komplex γ -sekretázy. Proteolytickou složkou je presenilin (PS). Dále je v komplexu anterior pharynx-defective 1 (APH-1), nicastrin (NCT) a presenilin enhancer 2 (PEN-2), který dopomáhá autokatalytickému štěpení presenilinu v N-koncový (PS-NTF) a C-koncový (PS-CTF) fragment. Červenožluté jiskry vyznačují polohu katalytických aspartátů. Převzato z (Gael et al., 2012).

3.4 Mechanismus katalýzy

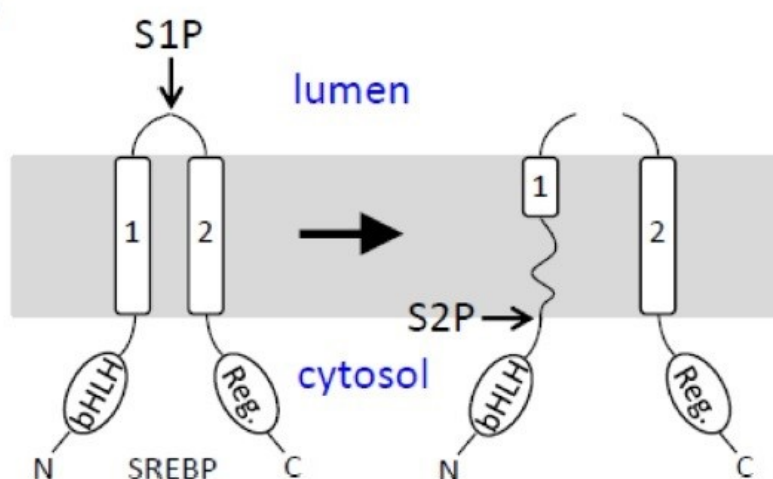
3.4.1 Dostupnost vody

Proteolýza uvnitř hydrofobní lipidové dvojvrstvy se zdá být obtížná, jelikož v hydrofobním jádru dvojvrstvy není běžně přítomna voda potřebná k hydrolýze. Intramembránové proteázy tak musí nějakým způsobem oddělit katalytické místo od hydrofobního prostředí membrány.

Mechanismus štěpení lze popsat na zástupci rodiny serinových proteáz/rhomboidů – GlpG. Ten se skládá ze šesti α -helixů, které vytváří v membráně „svazek“, uvnitř kterého se nachází katalytické místo s katalytickým serinem. Takzvaná katalytická triáda serinových proteáz se skládá z nukleofilního atomu kyslíku v postranním řetězci katalytického serinu, obecné kyseliny/zásady (imidazolový kruh histidinu) a karboxylátu kyseliny asparagové. Obecná kyselina/zásada pomáhá deprotonovat nukleofil a karboxylát nastavuje imidazolový kruh histidinu do správné pozice pro katalýzu. Nukleofilní atak serinem generuje oxyanion, který musí být stabilizován, aby reakce mohla proběhnout. Ke stabilizaci dochází v oxyaniontové jámě, která je tvořena vedlejším řetězcem histidinu, amidovou skupinou z hlavního řetězce náležející katalytickému serinu a vedlejším řetězcem asparaginu. Rozhodujícím krokem v katalýze serinovou proteázou je vytvoření přechodného tetrahedrálního intermediátu. Postup přes tento krok závisí právě na výše zmíněné stabilizaci oxyaniontu (Cho et al., 2016).

Rhomboidy mají pouze katalytickou dyádu serinu a histidinu, ta jim však postačuje ke katalytické aktivitě (Wang et al., 2006). Katalytické místo se tedy nachází v úrovni membrány, je však na dně mělké prohlubně a je tak v kontaktu s vodným prostředím. Jedna práce naznačuje, že existuje pomocný mechanismus, kterým se molekuly vody dopravují touto prohlubní na místo katalýzy (Zhou et al., 2012). Výzkumy ukazují, že i S2P metaloproteázy mají své intramembránové katalytické místo spojeno s vodným prostředím roztoku jakýmsi kanálkem (Feng et al., 2007).

U většiny intramembránových proteáz probíhá štěpení jako dvoukrokový proces – nejprve jiná proteáza naštěpí ektodoménu substrátového proteinu, což umožní druhý krok – samotné štěpení uvnitř membrány (Lemberg and Martoglio, 2002). Příklady takového procesu jsou štěpení signálních peptidů sekrečních a membránových proteinů pomocí SPP v membráně ER, které byly předštěpeny signální peptidázou (Weihofen et al., 2002), a štěpení SREBP (Obr. 3), důležité molekuly v metabolismu lipidů. Nejdříve je SREBP naštěpen S1P (site-1 protease), čímž se od sebe oddálí jeho dva transmembránové helixy (Sakai et al., 1997), což pak umožní štěpení zbylé TMD S2P (Ye et al., 2000).



Obr. 3: Dvoukrokový proces štěpení SREBP (sterol regulatory element - binding protein). Nejprve Site-1 proteáza naštěpí lumenální smyčku SREBP, což pravděpodobně způsobí rozvolnění prvního transmembránového helixu. To umožní Site-2 proteáze provést proteolýzu uvnitř membrány. Převzato z (Kroos and Akiyama, 2013).

3.4.2 Rozeznávání substrátu

Jelikož IMPR i jejich substráty jsou celé zanořeny v lipidové dvojvrstvě a aktivní místo IMPR je odděleno od lipidového prostředí, naznačuje to, že přístup substrátu k aktivnímu místu je regulovaný. Protože proteázy obecně štěpí rozvolněné β -struktury (Madala et al., 2010), předpokládá se, že je pro štěpení nutné rozvolnění α -helikálního transmembránového segmentu substrátu v místě proteolýzy (Brown et al., 2000). V řadě případů se blízko štěpeného místa u substrátů IMPR vyskytují

aminokyseliny destabilizující helixy, jako glycin či prolin. Některé intramembránové proteázy však štěpí substráty bez těchto destabilizujících aminokyselin (Kopan and Ilagan, 2004; Wolfe, 2009). Nejlépe prostudovanými IMPR jsou z hlediska rozpoznání substrátu rhomboidy. Ukázalo se, že ve svých substrátech rozeznávají dva rysy – transmembránovou doménu a motiv lineární sekvence („rozeznávací motiv“), který určuje místo štěpení a jeho rychlost, přičemž tyto prvky jsou v sekvenci substrátu oddělitelné. Někdy se „rozeznávací motiv“ může dokonce nacházet mimo membránu (Strisovsky et al., 2009).

Jak je zmíněno v sekci 3.4.1, většina intramembránových proteáz, tedy γ -sekretáza, SPP a S2P, vyžaduje nejprve odštěpení ektodomény substrátu jinou proteázou. U γ -sekretázy jsou to ADAM metaloproteázy (Selkoe and Wolfe, 2007) a u S2P již zmíněná S1P (Sakai et al., 1997). Rovněž je důležité zmínit, že ne všechny intramembránové proteázy štěpí stejně orientované transmembránové substráty. Zatímco SPP a S2P štěpí substráty transmembránové orientace typu II, γ -sekretáza a rhomboidy naopak preferují substráty transmembránové orientace typu I (Weihofen and Martoglio, 2003).

4. Intramembránové metaloproteázy (S2P)

4.1 Metabolismus cholesterolu

Site-2 proteázy hrají důležitou roli v regulaci metabolismu cholesterolu v buňce tím, že zajišťují štěpení proteinů SREBP (sterol regulatory element – binding protein). SREBP jsou hlavními regulátory lipidové homeostázy v buňce. Spouští transkripci genů, které kódují enzymy podílející se na biosyntéze cholesterolu, triglyceridů, fosfolipidů a mastných kyselin. SREBP jsou syntetizovány jako prekurzory vázané v membráně ER společně se SCAP (SREBP cleavage-activating protein) (Waris et al., 2007). SCAP pravděpodobně nemá proteolytickou aktivitu, ale vazbou na SREBP zřejmě vytváří vazebné místo pro proteázu, která štěpí na lumenální straně membrány (Sakai et al., 1997). Pokud má buňka nedostatek sterolu, transportuje SCAP SREBP do GA, kde je SREBP naštěpen nejříve S1P, což umožní jeho následné štěpení proteázou S2P. Tímto druhým, intramembránovým proteolytickým štěpením se tak doména transkripčního faktoru uvolní z membrány a translokuje se do jádra, kde aktivuje geny spojené s lipidogenezí (McRae et al., 2016).

4.2 Extracytoplazmatický stres u *E. coli*

Při růstu bakteriální buňky je nezbytné, aby vnější membránový kompartment s vnitřkem buňky komunikoval. Pokud se v membráně (nebo v periplazmě) vyskytnou špatně sbalené proteiny, nastartuje buňka procesy vedoucí k odstranění tohoto problému. U Gram-negativních bakterií, jako je *E. coli*, se tento děj nazývá odpověď na extracytoplazmatický stres. Umístění S2P přímo v membráně umožňuje tomuto enzymu reagovat na její změny. Dvoukrokovým proteolytickým zpracováním, velmi podobným štěpení SREBP zmíněnému v předchozí kapitole, se aktivují regulační podjednotky RNA polymerázy zvané sigma faktory, které jsou drženy v inaktivní formě pomocí anti-sigma faktorů. U *E. coli* tento proces začíná naštěpením RseA, anti-sigma faktoru integrovaného do membrány. Druhým krokem je štěpení RseA pomocí RseP (regulator of sigma E protease; S2P v *E. coli*), což aktivuje sigma E faktor (Alba et al., 2002). Sigma faktory pak regulují opravné a rezistenční mechanismy, které bakterie aktivuje v odpovědi na měnící se prostředí. Většinou se jedná o tzv. ECF (extracytoplasmic function) sigma faktory, které interagují s RNA polymerázou a spouští expresi konkrétních genů v závislosti na podmínkách (Hastie et al., 2013).

4.3 Degradace signálních peptidů u *E. coli*

Při sekreci proteinů zůstávají po odštěpení signální peptidázou v membráně zanořené signální peptidy, které je nutno odstraňovat, aby nedošlo k zahlcení membrány. Degradaci signálních peptidů usnadňují či zajišťují intramembránové proteázy, a to SPP u eukaryot (Weihofen et al., 2000, 2002) a intramembránové (S2P) metaloproteázy u bakterií (kterým chybí homology SPP), například RseP v *E. coli* (Akiyama et al., 2004).

4.4 Metabolismus lipidů u *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis je bakterie způsobující vážné infekční onemocnění – tuberkulózu. Z výzkumů vychází najevo, že pro virulenci této bakterie je zřejmě důležitá diverzita lipidů v buněčném obalu (Rao et al., 2005). Hlavní úlohu v patogenitě *M. tuberculosis* tedy hrají membránové lipidy, konkrétně glykolipidy a mykolové kyseliny. Přestože jsou složky buněčné stěny u *M. tuberculosis* relativně dobře prozkoumány, není jasná podstata důležitosti těchto lipidů pro virulenci. Nicméně z výzkumů vychází najevo, že existuje úzký vztah mezi cordingem (čili interakcemi povrchových molekul buněčné membrány, tvořící jakási vlákna) a patogenitou bakterie (Glickman et al., 2000).

U *M. tuberculosis* existuje homolog lidské S2P, který se podílí na virulenci proteolytickou regulací složení buněčného obalu. Rovněž je pozitivním i negativním transkripčním regulátorem několika genů spojených s metabolismem lipidů (Makinoshima and Glickman, 2005). Můžeme se domnívat, že by zde mohl probíhat obdobný mechanismus regulace lipidů v membráně jako u vyšších eukaryot. Tam je tento mechanismus regulován SREBP, která štěpí SREBP – membránově vázané transkripční faktory kontrolující syntézu lipidů (Sakai et al., 1996), včetně sterolu a mastných kyselin (Horton et al., 2003). S2P metaloproteázy u *M. tuberculosis* ovšem neregulují pouze metabolismus lipidů a složení buněčné membrány. Konkrétně další z členů S2P rodiny v *M. tuberculosis* – Rip1 – štěpí anti-sigma faktory, čímž umožní vypuštění sigma faktorů z membrány a expresi genů potřebných pro přežití parazita v hostiteli (například obrana proti oxidativnímu stresu) (Sklar et al., 2010).

5. Aspartátové intramembránové proteázy

5.1 Vývojová signalizace přes Notch receptor

Gamma-sekretáza je intramembránová proteáza podílející se na regulaci vývoje a buněčného osudu buněk v organismu proteolytickým procesingem ligandů Notch receptorů, což jsou transmembránové proteiny. Skládá se ze čtyř proteinů tvořících komplex – z presenilinu, Aph-1, Pen-2 a Nicastrinu (De Strooper, 2003), přičemž studie prokázaly presenilin jako aktivní místo (Kopan and Ilagan, 2004). Štěpení γ -sekretázou umožňuje vypuštění Notch intracelulární domény z membrány a její následnou translokaci do jádra, kde iniciuje transkripci (Annaert and Strooper, 2002).

Notch signalizace je typ přímé komunikace mezi buňkami, který je nezbytný pro regulaci proliferace, apoptózy a celkově buněčného osudu kmenových buněk během embryonálního vývoje (Fischer et al., 2004). Mnoho studií se také zaměřilo na působení Notch signalizace v rakovinném bujení. Z výsledků je zřejmé, že role Notch signalizace se velmi liší u různých typů rakoviny. Zatímco abnormální aktivace Notch signální kaskády u některých nádorů, například u rakoviny prsu, střeva či slinivky břišní může urychlovat proliferaci a podporovat přežití nádorových buněk (Büchler et al., 2005), u jiných typů rakoviny – konkrétně u podtypů rakoviny předního mozku, může Notch signalizace sloužit jako tumor supresor (Giachino et al., 2015).

5.2 Alzheimerova choroba

Dědičná Alzheimerova choroba (AD) je úzce spojena s aktivitou γ -sekretázy, jejíž podjednotka presenilin je zodpovědná za štěpení amyloidního prekursorového proteinu (APP), čímž generuje β -amyloidové peptidy (Futai et al., 2016). β -amyloid se v nervové tkáni nachází běžně, ale při Alzheimerově nemoci dochází k jeho patologickému ukládání a vzniku již zmíněných amyloidních plaků, které posléze poškozují neurony (Haass et al., 1994; Hung et al., 1993). Proto se γ -sekretáza stala cílem pro vývoj různých farmak proti AD. Při vývoji takových léků je ale nutné brát v úvahu, že kromě APP je substrátem γ -sekretázy také např. Notch a další důležité membránové proteiny typu I (Kopan and Ilagan, 2004). Sice již existují látky, které modulují γ -sekretázu bez ovlivnění Notch dráhy (Futai et al., 2016), přesto však zatím všechna potenciální léčiva založená na inhibici γ -sekretázy selhala v klinických testech (Tan et al., 2016).

Gamma-sekretáza štěpí také neurexiny, což jsou transmembránové adhezivní molekuly, které se účastní vývoje a funkce synapsí v neuronech (Bang and Owczarek, 2013). Mutace v neurexinech jsou příčinou poruch autistického spektra a schizofrenie (Yangngam et al., 2014). Rovněž se ukazuje, že hrají roli v Alzheimerově chorobě, konkrétně v dysfunkci synaptického přenosu (Naito et al., 2017). Je

možné, že proteolýza neurexinu γ -sekretázou uvolňuje intracelulární doménu, která se translokuje do jádra, kde působí jako transkripční faktor. Ten pravděpodobně způsobuje expresi genů s neurobiologickými účinky (např. synaptogeneze) (Borcel et al., 2016).

5.3 Infekce prvokem *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum je parazit z kmene Apicomplexa, způsobující závažné lidské onemocnění – malárii. Parazit se do hostitele dostává během sání krve samicí komára rodu *Anopheles*. *Plasmodium* se krevním řečištěm dopraví do jater, kde se namnoží a v dalším stádiu se rozmnožuje asexuálně uvnitř erytrocytů. Při dostatečném namnožení *Plasmodium* roztrhne erytrocyt a uvolní se do krevního řečiště. S tím jsou také spojeny projevy malárie – pravidelně se opakující záchvaty horeček (Cowman and Crabb, 2006).

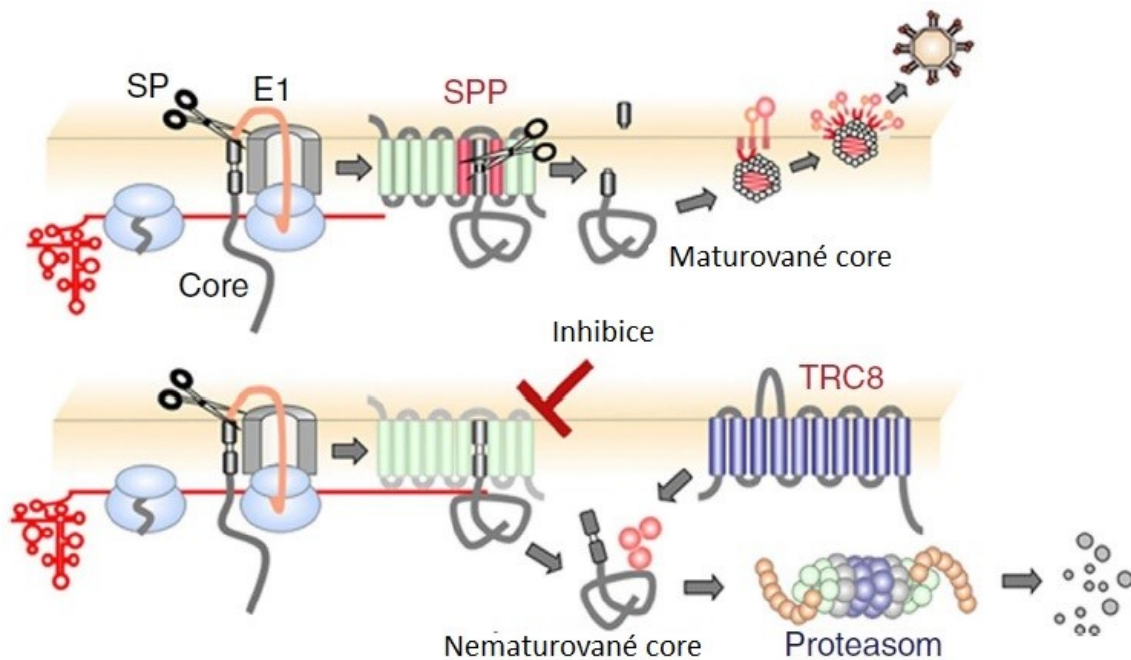
K průniku do hostitelských erytrocytů používá parazit specializované organely, mikronémy, které interagují s transmembránovými receptory na erythrocytech hostitele (Li et al., 2008). V mikronémách obsažené adheziny (MIC adheziny) při invazi zajišťují vazbu na buněčné receptory hostitele, což umožní vstup parazita do buňky a únik imunitnímu systému hostitele. Po průniku do hostitelské buňky však parazit potřebuje pevná spojení MIC adhezínů s receptory hostitele přerušit. Původně se věřilo, že se tak děje proteolytickým štěpením prostřednictvím homologu SPP v mikronémách parazita (Brossier et al., 2005). Plasmodiová SPP je pravděpodobně esenciální gen, jelikož se různým skupinám opakovaně nedařilo připravit mutanty s vyřazeným genem pro SPP (Sibley, 2013). Novější výzkumy však ukazují, že SPP není lokalizována v mikronémách a nepodílí se na invazi parazita, ale nachází se v ER a její chemickou inhibicí je blokován růst *Plasmodia* in vitro i vývoj jeho jaterního stadia (Marapana Danushka S. et al., 2012). SPP je tedy nový slibný cíl pro vývoj léčiv proti malárii.

Ve štěpení povrchových molekul se zřejmě angažují spíše jiné IMPR – rhomboidy, což je zmíněno později v sekci 6.3.

5.4 Maturace viru hepatitidy C, Bunyamwera viru a viru prasečí chřipky

Bunyamwera virus patří do rodiny Bunyavirů, patřící mezi minus RNA viry. Některé viry z této rodiny jsou vážnými lidskými patogeny jako La Crosse virus, Oropouche virus, Sin Nombre virus nebo Rift Valley fever virus (Elliott, 1997). Virus Hepatitidy C je plus RNA virus z rodiny Flavivirů, který způsobuje jaterní cirhózu až rakovinu (Lindenbach and Rice, 2013). Virus prasečí chřipky je rovněž plus RNA virus, který způsobuje těžké infekce u zvířat i u lidí (Bintintan and Meyers, 2010). U většiny těchto virů se ukazuje, že štěpení virových glykoproteinů pomocí SPP je velmi důležité pro virovou aktivitu

(Shi et al., 2016). Posttranslační modifikace virových proteinů, které jsou nezbytné pro maturaci viru, většinou provádí hostitelské enzymy. Může se jednat o odštěpení signálního peptidu signální peptidázou nebo SPP, proteolýzu či glykosylaci (Bintintan and Meyers, 2010). Virový core protein (nukleoprotein, na který se váže genom viru a tvoří tak „jádro“ viru) není schopen bez proteolytického zpracování SPP tvořit infekční částice. Některé studie naznačují, že tyto nematurované virové částice jsou poměrně rychle degradovány v proteozomu (Aizawa et al., 2016) (Obr. 4).



Obr. 4: Horní část obrázku ukazuje maturaci viru hepatitidy C. V tomto procesu se významně angažují proteázy – Signal peptidase (SP) a Signal peptid peptidase (SPP). Dolní část obrázku znázorňuje osud core proteinu, pokud inhibujeme štěpení SPP. Nematurovaná virová partikule je degradována v proteozomu. Převzato z (Aizawa et al., 2016).

5.5 Kontrola kvality membránových proteinů

Signal peptide peptidase - SPP se nachází v membráně ER, kde štěpí signální peptidy sekrečních a membránových proteinů (Weihofen et al., 2002). Mimo jiné se také účastní imunitního dozoru v organismu (proteolýza je důležitý krok pro tvorbu epitopů vázajících HLA molekuly) a proteolytického zpracování core proteinu viru hepatitidy C (Lemberg et al., 2001). Nedávné studie naznačují, že by SPP rovněž mohla být součástí ERAD – ER associated degradation. SPP zřejmě vytváří komplex s faktory ERAD dráhy – Derlin1 a TRC8. Tento komplex poté štěpí XBP1u, UPR (unfolded protein response) regulátor, což je molekula, hrající důležitou úlohu v signalizaci odpovědi na nesbalené proteiny (Chen et al., 2014).

5.6 Modulace imunity

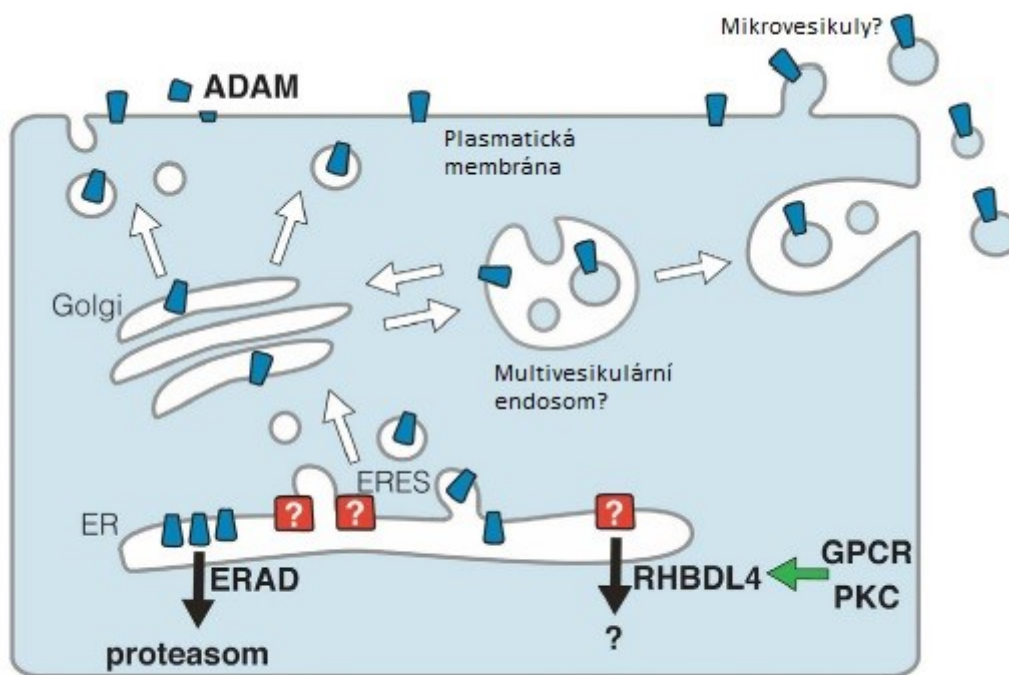
MHC II. třídy se nachází na profesionálních antigen prezentujících buňkách jako jsou B-lymfocyty, makrofágy či dendritické buňky. Na MHC II. třídy dochází k prezentaci antigenů toho, co tyto buňky požřely. MHC II. třídy je sestaven v membráně ER, kde se na něj naváže CD74 neboli invariantní řetězec. Tento komplex je poté poslán do pozdního endozomu, kde je invariantní řetězec proteolyticky degradován. MHCII tak může navázat peptid z proteinu, který byl buňkou fagocytován. Invariantní řetězec je nezbytnou součástí procesu sestavení a umístění MHC II. třídy (Neefjes et al., 2011). CD74 je štěpen SPPL2a (signal peptide peptidase like-2a), což je nezbytný krok pro jeho funkčnost. Při absenci toho kroku dochází k akumulaci N-terminálního fragmentu CD74 a narušení signalizace nezbytné pro maturaci B-lymfocytů (Schneppenheim et al., 2013).

SPPL2a je aspartátová IMPR příbuzná presenilinu (Weihofen et al., 2002). Vzhledem k její důležité roli v maturaci B-lymfocytů (Schneppenheim et al., 2013) byl započat výzkum inhibitorů této proteázy jako léčby některých autoimunitních chorob. Zpočátku nedostatečně selektivní inhibitory SPPL2a ovlivňovaly i aktivitu γ -sekretázy, což ovlivnilo Notch signalizaci a způsobovalo nežádoucí účinky. Až nedávno se podařilo vyvinout selektivní inhibitory SPPL2a, které na Notch signalizaci vliv nemají (Velcicky et al., 2018).

6. Rhomboidy - serinové intramembránové proteázy

6.1 Sekrece ligandů EGF receptoru

Transforming growth factor alfa (TGF α) patří do rodiny epidermálních růstových faktorů (EGF) a je to jeden z hlavních ligandů EGF receptoru (EGFR/ErbB1/Her1), což je receptor tyrosin kináza. EGFR je významný pro proliferaci buněk a často bývá zmnožený nebo aktivovaný mutacemi při rakovinném bujení (Wilson et al., 2009). K aktivaci TGF α , stejně jako ostatních ligandů EGFR, je nutné štěpení jeho transmembránové prekurzorové formy proteázou. Většinou jsou tyto proteázy ADAM10 nebo ADAM17 (Sahin et al., 2004). V lidských nádorech tlustého střeva byla nedávno zjištěna nadprodukce proteinu RHBDL4 (také znám jako RHBDD1) z rodiny rhomboidů. Bylo ukázáno, že RHBDL4 zesiluje sekreci TGF α (Song et al., 2015) pravděpodobně prostřednictvím zvýšené sekrece membránových mikrovesikul (exosomů) obsahujících celodélkový TGF α (Wunderle et al., 2016) (Obr. 5), což ukazuje spojitost mezi rhomboidy, signalizací přes EGFR a rakovinou.



Obr. 5: Obrázek znázorňuje mechanismus zesílení sekrece TGF α pomocí RHBDL4. Nadbytek proTGF α (tmavě modré lichoběžníky) je degradován prostřednictvím ERAD dráhy, dokud RHBDL4 nenaštěpí zatím neznámý blok (červené čtverce) sekrece proTGF α z ER do GA. Je pravděpodobné, že se jedná o ER exit site (ERES) faktor. GPCR (G-protein coupled receptor) a PKC (protein kináza C) mohou zvyšovat aktivitu rhomboidu (zelená šipka). Převzato z (Wunderle et al., 2016)

6.2 Kontrola kvality membránových proteinů

Degradace proteinů se děje především dvěma cestami. První se odehrává hydrolázami uvnitř specializovaných membránových organel zvaných lyzozomy, druhá probíhá v cytozolu prostřednictvím ubiquitin-proteazomového systému. Druhý zmíněný mechanismus je velmi dokonale regulován prostřednictvím ubikvitin ligáz, deubikvitinačních enzymů, proteazomu a různých adaptorových proteinů. Asi třetina všech proteinů v buňce vzniká v endoplazmatickém retikulu (ER), což zahrnuje transmembránové, lumenální nebo sekretované proteiny. Proteiny, které neprojdou „kontrolou kvality“ při sbalování a skládání, jsou degradovány v ERAD dráze (Tsai and Weissman, 2012). To je obzvláště náročné pro membránové proteiny, které musí být „vytaženy“ z membrány. Bylo ukázáno, že ‚dislokací‘ některých membránových proteinů usnadňují proteázy z rodiny rhomboidů, jako například RHBDL4 (Fleig et al., 2012).

6.3 Infekce prvokem *Plasmodium falciparum*

Hlavními virulenčními faktory nejen v malárii, ale i v mnoha dalších onemocněních způsobených prvoky (z nejvýznamnějších lze uvést *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica* či *Trichomonas vaginalis*), jsou proteázy. Hrají důležitou roli v invazi parazita do hostitelských buněk, degradaci hemoglobinu a úniku imunitnímu systému (Sibley, 2013). V genomu *Plasmodia* bylo nalezeno celkem devět genů pro rhomboidové IMPR. Nachází se například v apikální organelle (mononéma) krevní fáze merozoita (Singh et al., 2007) či na povrchu sporozoita po invazi do slinné žlázy (Srinivasan et al., 2009). Zdá se, že rhomboidy napomáhají invazi merozoita intramembránovým štěpením povrchových molekul, například adhezinu na membráně parazita (Howell et al., 2005) či antigenů vázajících erytrocyty (O'Donnell et al., 2006).

6.4 Infekce parazitem *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica je extracelulární střevní parazit, který způsobuje zánět tlustého střeva a jaterní absces (Stauffer and Ravdin, 2003). Patogenita *Entamoeba* je spojena s její schopností narušit střevní epitel a cestovat tak mimo tlusté střevo (Labruyère and Guillén, 2006). Při prohledávání genomu *E. histolytica* bylo zjištěno, že obsahuje čtyři geny pro rhomboidové proteázy (Baxt et al., 2010). Při snížení exprese genu (downregulaci) pro rhomboidovou proteázu se snížila schopnost parazita hemolyzovat erytrocyty a migrovat. To značí, že proteáza hraje významnou roli v interakci mezi amébou a hostitelem (Rastew et al., 2015).

6.5 Mitochondriální dysfunkce

Mitochondriální dysfunkce, především nedostatečné odstraňování nefunkčních mitochondrií a následná akumulace toxických látek, byla prokázána jako jedna z příčin dědičné Parkinsonovy choroby (Exner N et al., EMBO J. 2012). Ta je způsobena mutací ve dvou genech - PINK1 (PTEN induced kinase 1) a PARK2 (parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase) (Valente et al., 2004). Ty hrají ústřední roli v kontrole kvality mitochondrií (Schapira, 2012). PINK1 navádí PARK2 do mitochondrie, kde PARK2 zničí poničenou mitochondrii indukci makroautofágie – mitofágie. V normální situaci je transmembránová doména PINK1 ve vnitřní mitochondriální membráně štěpena intramembránovou proteázou PARL (PINK1-associated rhomboid-like), což vede k vypouštění fragmentu PINK1 do cytoplasmy, kde je degradován, a k mitofágii nedochází. Snížení aktivity PARL vede k akumulaci PINK1 na vnější mitochondriální membráně, rekrutaci PARK2 a ve výsledku k autofagii. Inhibice PARL by tedy mohla být spouštěčem degradace nefunkčních mitochondrií, čehož by se dalo využít při léčbě Parkinsonovy choroby (Meissner et al., 2015).

6.6 Apoptóza

Proteázy v mitochondriích zastávají významnou úlohu v regulaci a řízení interakcí mitochondrií s intracelulárním prostředím (Quirós et al., 2015). Například mitochondriální fragmentace je řízena štěpením dynamin-like GTPázy OPA1 proteázami vnitřní membrány mitochondrie (Griparic et al., 2007). Zvýšený processing OPA1 vede k remodelaci krist a vypuštění cytochromu c z mitochondrie, což je faktor indukující apoptózu (Frezza et al., 2006; Jiang et al., 2014). V regulaci vypouštění cytochromu c se angažuje intramembránová proteáza PARL. Saita a kolektiv ve své studii ukazují, že ztráta této IMPR by mohla buňku chránit před apoptózou. Přestože ztráta PARL neinhibuje vypuštění cytochromu c, dokáže zabránit apoptóze v různých buněčných liniích (Saita et al., 2017). Dá se tedy usuzovat, že PARL je pro-apoptický mitochondriální protein. Především kvůli jeho proteolytickému štěpení mitochondriálního proteinu Smac, který se musí dostat do cytosolu pro zahájení apoptózy, a regulaci vypouštění cytochromu c do cytozolu (Saita et al., 2017).

7. Závěr

V současné době se stále více ukazuje důležitost intramembránových proteáz ve významných biologických pochodech. Jejich umístění uvnitř membrány jim umožňuje sledovat a regulovat složení membrány, což kromě lipidogeneze zahrnuje i kontrolu kvality membránových proteinů. Intramembránové proteázy se mohou rovněž účastnit regulace apoptózy štěpením membránových proteinů uvnitř membrány mitochondrie. Dalším neméně důležitým dějem, který IMPs regulují, je Notch signalizace. Proteolýzou Notch ligandů se IMPR angažují ve vývoji a buněčném osudu buněk.

PARL se významně angažuje při regulaci mitofágie, jeho inhibicí se spouští lyzozomální degradace celé mitochondrie. Při Parkinsonově chorobě dochází k hromadění nefunkčních mitochondrií, inhibitory PARL by se tedy mohly stát účinným léčivem. IMPR hrají důležitou roli i v dalším neurodegenerativním onemocnění – Alzheimerově chorobě. Štěpení APP γ -sekretázou generuje delší β -amyloid, který se ukládá v nervové tkáni a způsobuje tím Alzheimerovu chorobu. Při vývoji inhibitorů proti γ -sekretáze je ovšem třeba mít na paměti, že se angažuje v regulaci Notch signalizace.

Významnou roli hrají IMPR i v parazitárních infekcích. SPP se kupříkladu podílí na růstu a vývoji jaterního stadia *Plasmodium falciparum*, prvoka způsobujícího nejzávažnější formu malárie. Na virulenci *Plasmodia* se podílí i rhomboidy, napomáhající invazi prvoka. Rhomboidy jsou rovněž zásadní pro patogenitu *Entamoeba histolytica*, což je parazit způsobující zánět tlustého střeva a jaterní absces. Rhomboidy zde zřejmě zprostředkovávají interakci mezi amébou a buňkami hostitele. IMPR hrají důležitou roli i ve virových infekcích. Pro virulenci viru hepatitidy C a Bunyamwera viru je nezbytné proteolytické zpracování core proteinu viru. Bez naštěpení SPP nedojde k maturaci viru a nematurované částice jsou degradovány. IMPR mají nezanedbatelný význam i pro modulaci imunity, konkrétně SPPL2a se podílí na maturaci B-lymfocytů. Stává se tak slibným cílem pro vývoj léčby autoimunitních chorob. Dokonce již existují selektivní inhibitory této proteázy, které neovlivňují Notch signalizaci.

Jen při pohledu na výčet nemocí a patologických dějů, do kterých IMPR zasahují, je naprosto logické zaměření úsilí na vývoj léků ovlivňujících IMPR. Tento směr výzkumu má velký potenciál a inhibitory IMPR jsou dále vyvíjeny a studovány. Použití takovýchto inhibitorů ovšem skrývá jistá úskalí daná především rozličnými funkcemi IMPR, které kromě patologických dějů běžně regulují fyziologické děje nezbytné pro zdravý chod buňky. Jako příklad lze uvést γ -sekretázu, která je původcem β -amyloidu způsobujícího Alzheimerovu chorobu, ale zároveň je také enzymem regulujícím vývoj buňky přes Notch signální dráhu. Vývoj inhibitorů IMPR jako léků proti mnoha závažným nemocem má tedy velký potenciál. Je ovšem nutné pečlivě prostudovat veškeré funkce dané proteázy, aby nedocházelo

k ovlivnění životně důležitých dějů, které studované proteázy regulují. V této práci jsem se pokusila o shrnutí dosavadních poznatků v této oblasti a zdůraznění medicínského významu intramembránových proteáz.

Seznam zkratek

AD = Alzheimer disease

ADAM = a disintegrin and metalloprotease

APH-1 = anterior pharynx-defective 1

APP = amyloid precursor protein

ECF = extracytoplasmic function

EGF = epidermal growth factor

EGFR = epidermal growth factor receptor

ER = endoplasmatické retikulum

ERAD = ER associated degradation

ERES = ER exit sites

GA = Golgiho aparát

GPCR = G-protein coupled receptor

HLA = human leukocyte antigen

IMPR = intramembránové proteázy

MHC = major histocompatibility complex

MIC = proteiny nacházející se pouze v mikronémě

OPA1 = optic atrophy 1

PARK2 = parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase

PARL = presenilin associated rhomboid-like

PEN-2 = presenilin enhancer 2

PINK1 = PTEN induced kinase 1

PKC = protein kináza C

PS-CTF = C-koncový fragment presenilinu

PS-NTF = N-koncový fragment presenilinu

Rce1 = Ras and α -faktor convertiing enzyme

RHBDL4 = rhombiod like 4

RseP = regulator of sigma E, protease

S1P = site 1 protease

S2P = site 2 protease

SCAP = SREBP cleavage-activating protein

SPP = signal peptide peptidase

SPPL2a = signal peptide peptidase like-2a

SREBP = sterol regulatory element – binding protein

TACE = TNF α converting enzyme

TGF α = transforming growth factor alfa

TMD = transmembránová doména

UPR = unfolded protein response

Použitá literatura

- Aizawa, S., Okamoto, T., Sugiyama, Y., Kouwaki, T., Ito, A., Suzuki, T., Ono, C., Fukuhara, T., Yamamoto, M., Okochi, M., et al. (2016). TRC8-dependent degradation of hepatitis C virus immature core protein regulates viral propagation and pathogenesis. *Nat. Commun.* *7*.
- Akiyama, Y., Kanehara, K., and Ito, K. (2004). RseP (YaeL), an Escherichia coli RIP protease, cleaves transmembrane sequences. *EMBO J.* *23*, 4434–4442.
- Alba, B.M., Leeds, J.A., Onufryk, C., Lu, C.Z., and Gross, C.A. (2002). DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the σ E-dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev.* *16*, 2156–2168.
- Annaert, W., and Strooper, B.D. (2002). A Cell Biological Perspective on Alzheimer's Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *18*, 25–51.
- Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T.K., Rose-John, S., and Massagué, J. (1996). Diverse Cell Surface Protein Ectodomains Are Shed by a System Sensitive to Metalloprotease Inhibitors. *J. Biol. Chem.* *271*, 11376–11382.
- Bang, M.L., and Owczarek, S. (2013). A Matter of Balance: Role of Neurexin and Neuroligin at the Synapse. *Neurochem. Res.* *38*, 1174–1189.
- Baxt, L.A., Rastew, E., Bracha, R., Mirelman, D., and Singh, U. (2010). Downregulation of an Entamoeba histolytica Rhomboid Protease Reveals Roles in Regulating Parasite Adhesion and Phagocytosis. *Eukaryot. Cell* *9*, 1283–1293.
- Bergo, M.O., Ambroziak, P., Gregory, C., George, A., Otto, J.C., Kim, E., Nagase, H., Casey, P.J., Balmain, A., and Young, S.G. (2002). Absence of the CAAX Endoprotease Rce1: Effects on Cell Growth and Transformation. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 171–181.
- Bintintan, I., and Meyers, G. (2010). A New Type of Signal Peptidase Cleavage Site Identified in an RNA Virus Polyprotein. *J. Biol. Chem.* *285*, 8572–8584.
- Borcel, E., Palczynska, M., Krzisch, M., Dimitrov, M., Ulrich, G., Toni, N., and Fraering, P.C. (2016). Shedding of neurexin 3 β ectodomain by ADAM10 releases a soluble fragment that affects the development of newborn neurons. *Sci. Rep.* *6*.
- Borrell-Pagès, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J., and Arribas, J. (2003). TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *EMBO J.* *22*, 1114–1124.
- Brossier, F., Jewett, T.J., Sibley, L.D., and Urban, S. (2005). A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by Toxoplasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4146–4151.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* *89*, 331–340.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated Intramembrane Proteolysis: A Control Mechanism Conserved from Bacteria to Humans. *Cell* *100*, 391–398.

- Büchler, P., Gazdhar, A., Schubert, M., Giese, N., Reber, H.A., Hines, O.J., Giese, T., Ceyhan, G.O., Müller, M., Büchler, M.W., et al. (2005). The Notch Signaling Pathway Is Related to Neurovascular Progression of Pancreatic Cancer. *Ann. Surg.* *242*, 791–801.
- Chen, C., Malchus, N.S., Hehn, B., Stelzer, W., Avci, D., Langosch, D., and Lemberg, M.K. (2014). Signal peptide peptidase functions in ERAD to cleave the unfolded protein response regulator XBP1u. *EMBO J.* *33*, 2492–2506.
- Cho, S., Dickey, S.W., and Urban, S. (2016). Crystal structures and inhibition kinetics reveal a two-stage catalytic mechanism with drug design implications for rhomboid proteolysis. *Mol. Cell* *61*, 329–340.
- Christiansen, J.R., Kolandaivelu, S., Bergo, M.O., and Ramamurthy, V. (2011). RAS-converting enzyme 1-mediated endoproteolysis is required for trafficking of rod phosphodiesterase 6 to photoreceptor outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 8862–8866.
- Cowman, A.F., and Crabb, B.S. (2006). Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* *124*, 755–766.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active γ -Secretase Complex. *Neuron* *38*, 9–12.
- Duncan, E.A., Davé, U.P., Sakai, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Second-site Cleavage in Sterol Regulatory Element-binding Protein Occurs at Transmembrane Junction as Determined by Cysteine Panning. *J. Biol. Chem.* *273*, 17801–17809.
- Elliott, R.M. (1997). Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol. Med.* *3*, 572–577.
- Feng, L., Yan, H., Wu, Z., Yan, N., Wang, Z., Jeffrey, P.D., and Shi, Y. (2007). Structure of a Site-2 Protease Family Intramembrane Metalloprotease. *Science* *318*, 1608–1612.
- Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., and Gessler, M. (2004). The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev.* *18*, 901–911.
- Fitzgerald, M.L., Wang, Z., Park, P.W., Murphy, G., and Bernfield, M. (2000). Shedding of Syndecan-1 and -4 Ectodomains Is Regulated by Multiple Signaling Pathways and Mediated by a Timp-3-Sensitive Metalloproteinase. *J. Cell Biol.* *148*, 811–824.
- Fleig, L., Bergbold, N., Sahasrabudhe, P., Geiger, B., Kaltak, L., and Lemberg, M.K. (2012). Ubiquitin-Dependent Intramembrane Rhomboid Protease Promotes ERAD of Membrane Proteins. *Mol. Cell* *47*, 558–569.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., et al. (2006). OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell* *126*, 177–189.
- Futai, E., Osawa, S., Cai, T., Fujisawa, T., Ishiura, S., and Tomita, T. (2016). Suppressor Mutations for Presenilin 1 Familial Alzheimer Disease Mutants Modulate γ -Secretase Activities. *J. Biol. Chem.* *291*, 435–446.
- Gael, B., Georgakopoulos, A., and Robakis, N.K. (2012). Cellular mechanisms of γ -secretase substrate selection, processing and toxicity. *Prog. Neurobiol.* *98*, 166–175.

- Garton, K.J., Gough, P.J., and Raines, E.W. (2006). Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J. Leukoc. Biol.* *79*, 1105–1116.
- Giachino, C., Boulay, J.-L., Ivanek, R., Alvarado, A., Tostado, C., Lugert, S., Tchorz, J., Coban, M., Mariani, L., Bettler, B., et al. (2015). A Tumor Suppressor Function for Notch Signaling in Forebrain Tumor Subtypes. *Cancer Cell* *28*, 730–742.
- Gibot, S., Kolopp-Sarda, M.-N., Béné, M.-C., Bollaert, P.-E., Lozniewski, A., Mory, F., Levy, B., and Faure, G.C. (2004). A Soluble Form of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Modulates the Inflammatory Response in Murine Sepsis. *J. Exp. Med.* *200*, 1419–1426.
- Glickman, M.S., Cox, J.S., and Jacobs, W.R. (2000). A Novel Mycolic Acid Cyclopropane Synthetase Is Required for Cording, Persistence, and Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell* *5*, 717–727.
- Griparic, L., Kanazawa, T., and van der Bliek, A.M. (2007). Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J. Cell Biol.* *178*, 757–764.
- Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J., and Teplow, D.B. (1994). Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J. Biol. Chem.* *269*, 17741–17748.
- Hastie, J.L., Williams, K.B., and Ellermeier, C.D. (2013). The Activity of σ^V , an Extracytoplasmic Function σ Factor of *Bacillus subtilis*, Is Controlled by Regulated Proteolysis of the Anti- σ Factor RsiV. *J. Bacteriol.* *195*, 3135–3144.
- Hayashida, K., Bartlett, A.H., Chen, Y., and Park, P.W. (2010). Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding. *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007* *293*, 925–937.
- Horton, J.D., Shah, N.A., Warrington, J.A., Anderson, N.N., Park, S.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12027–12032.
- Howell, S.A., Hackett, F., Jongco, A.M., Withers-Martinez, C., Kim, K., Carruthers, V.B., and Blackman, M.J. (2005). Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens. *Mol. Microbiol.* *57*, 1342–1356.
- Hung, A.Y., Haass, C., Nitsch, R.M., Qiu, W.Q., Citron, M., Wurtman, R.J., Growdon, J.H., and Selkoe, D.J. (1993). Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J. Biol. Chem.* *268*, 22959–22962.
- Ichihara, S., Suzuki, T., Suzuki, M., and Mizushima, S. (1986). Molecular cloning and sequencing of the *sppA* gene and characterization of the encoded protease IV, a signal peptide peptidase, of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *261*, 9405–9411.
- Jiang, X., Jiang, H., Shen, Z., and Wang, X. (2014). Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 14782–14787.
- Kimberly, W.T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2000). The Transmembrane Aspartates in Presenilin 1 and 2 Are Obligatory for γ -Secretase Activity and Amyloid β -Protein Generation. *J. Biol. Chem.* *275*, 3173–3178.

- Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2004). γ -Secretase: proteasome of the membrane? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 499.
- Kornilova, A.Y., Bihel, F., Das, C., and Wolfe, M.S. (2005). The initial substrate-binding site of γ -secretase is located on presenilin near the active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 3230–3235.
- Kroos, L., and Akiyama, Y. (2013). Biochemical and Structural Insights into Intramembrane Metalloprotease Mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* *1828*, 2873–2885.
- Labruyère, E., and Guillén, N. (2006). Host Tissue Invasion by *Entamoeba histolytica* Is Powered by Motility and Phagocytosis. *Arch. Med. Res.* *37*, 252–257.
- Lemberg, M.K., and Martoglio, B. (2002). Requirements for Signal Peptide Peptidase-Catalyzed Intramembrane Proteolysis. *Mol. Cell* *10*, 735–744.
- Lemberg, M.K., Bland, F.A., Weihofen, A., Braud, V.M., and Martoglio, B. (2001). Intramembrane Proteolysis of Signal Peptides: An Essential Step in the Generation of HLA-E Epitopes. *J. Immunol.* *167*, 6441–6446.
- Li, J., Ma, J., and Potter, H. (1995). Identification and expression analysis of a potential familial Alzheimer disease gene on chromosome 1 related to AD3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 12180–12184.
- Li, X., Chen, H., Oh, S.S., and Chishti, A.H. (2008). A Presenilin-like protease associated with *Plasmodium falciparum* micronemes is involved in erythrocyte invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* *158*, 22–31.
- Lichtenthaler, S.F., and Haass, C. (2004). Amyloid at the cutting edge: activation of α -secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* *113*, 1384–1387.
- Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 688–700.
- Madala, P.K., Tyndall, J.D.A., Nall, T., and Fairlie, D.P. (2010). Update 1 of: Proteases Universally Recognize Beta Strands In Their Active Sites. *Chem. Rev.* *110*, PR1-PR31.
- Makinoshima, H., and Glickman, M.S. (2005). Regulation of *M. tuberculosis* cell envelope composition and virulence by Regulated Intramembrane Proteolysis. *Nature* *436*, 406–409.
- Manolaridis, I., Kulkarni, K., Dodd, R.B., Ogasawara, S., Zhang, Z., Bineva, G., Reilly, N.O., Hanrahan, S.J., Thompson, A.J., Cronin, N., et al. (2013). Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the integral membrane protease Rce1. *Nature* *504*.
- Marapana Danushka S., Wilson Danny W., Zuccala Elizabeth S., Dekiwadia Chaitali D., Beeson James G., Ralph Stuart A., and Baum Jake (2012). Malaria Parasite Signal Peptide Peptidase is an ER-Resident Protease Required for Growth but not for Invasion. *Traffic* *13*, 1457–1465.
- McRae, S., Iqbal, J., Sarkar-Dutta, M., Lane, S., Nagaraj, A., Ali, N., and Waris, G. (2016). The Hepatitis C Virus-induced NLRP3 Inflammasome Activates the Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) and Regulates Lipid Metabolism. *J. Biol. Chem.* *291*, 3254–3267.
- Meissner, C., Lorenz, H., Hehn, B., and Lemberg, M.K. (2015). Intramembrane protease PARL defines a negative regulator of PINK1- and PARK2/Parkin-dependent mitophagy. *Autophagy* *11*, 1484–1498.

- Naito, Y., Tanabe, Y., Lee, A.K., Hamel, E., and Takahashi, H. (2017). Amyloid- β Oligomers Interact with Neurexin and Diminish Neurexin-mediated Excitatory Presynaptic Organization. *Sci. Rep.* 7.
- Neefjes, J., Jongma, M.L.M., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 823–836.
- O'Donnell, R.A., Hackett, F., Howell, S.A., Treeck, M., Struck, N., Krnajski, Z., Withers-Martinez, C., Gilberger, T.W., and Blackman, M.J. (2006). Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *J. Cell Biol.* 174, 1023–1033.
- Pardossi-Piquard, R., Böhm, C., Chen, F., Kanemoto, S., Checler, F., Schmitt-Ulms, G., St. George-Hyslop, P., and Fraser, P.E. (2009). TMP21 Transmembrane Domain Regulates γ -Secretase Cleavage. *J. Biol. Chem.* 284, 28634–28641.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., et al. (1998). An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science* 282, 1281–1284.
- Quirós, P.M., Langer, T., and López-Otín, C. (2015). New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 345.
- Rao, V., Fujiwara, N., Porcelli, S.A., and Glickman, M.S. (2005). Mycobacterium tuberculosis controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J. Exp. Med.* 201, 535–543.
- Rastew, E., Morf, L., and Singh, U. (2015). Entamoeba histolytica rhomboid protease 1 has a role in migration and motility as validated by two independent genetic approaches. *Exp. Parasitol.* 154, 33–42.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* 164, 769–779.
- Saita, S., Nolte, H., Fiedler, K.U., Kashkar, H., Venne, A.S., Zahedi, R.P., Krüger, M., and Langer, T. (2017). PARL mediates Smac proteolytic maturation in mitochondria to promote apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 19, 318–328.
- Sakai, J., Duncan, E.A., Rawson, R.B., Hua, X., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1996). Sterol-Regulated Release of SREBP-2 from Cell Membranes Requires Two Sequential Cleavages, One Within a Transmembrane Segment. *Cell* 85, 1037–1046.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y.K., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Identification of Complexes between the COOH-terminal Domains of Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs) and SREBP Cleavage-Activating Protein. *J. Biol. Chem.* 272, 20213–20221.
- Schapira, A.H. (2012). Mitochondrial diseases. *The Lancet* 379, 1825–1834.
- Schlondorff, J., and Blobel, C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 112, 3603–3617.
- Schmidt, W.K., Tam, A., Fujimura-Kamada, K., and Michaelis, S. (1998). Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX

protein processing and amino-terminal a-factor cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 11175–11180.

Schneppenheim, J., Dressel, R., Hüttl, S., Lüllmann-Rauch, R., Engelke, M., Dittmann, K., Wienands, J., Eskelinen, E.-L., Hermans-Borgmeyer, I., Fluhrer, R., et al. (2013). The intramembrane protease SPPL2a promotes B cell development and controls endosomal traffic by cleavage of the invariant chain. *J. Exp. Med.* *210*, 41–58.

Selkoe, D.J., and Wolfe, M.S. (2007). Presenilin: Running with Scissors in the Membrane. *Cell* *131*, 215–221.

Shah, S., Lee, S.-F., Tabuchi, K., Hao, Y.-H., Yu, C., LaPlant, Q., Ball, H., Dann, C.E., Südhof, T., and Yu, G. (2005). Nicastrin Functions as a γ -Secretase-Substrate Receptor. *Cell* *122*, 435–447.

Shi, X., Botting, C.H., Li, P., Niglas, M., Brennan, B., Shirran, S.L., Szemiel, A.M., and Elliott, R.M. (2016). Bunyamwera orthobunyavirus glycoprotein precursor is processed by cellular signal peptidase and signal peptide peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 8825–8830.

Shirotani, K., Tomioka, M., Kremmer, E., Haass, C., and Steiner, H. (2007). Pathological activity of familial Alzheimer's disease-associated mutant presenilin can be executed by six different γ -secretase complexes. *Neurobiol. Dis.* *27*, 102–107.

Sibley, L.D. (2013). The roles of intramembrane proteases in protozoan parasites. *Biochim. Biophys. Acta* *1828*, 2908–2915.

Singh, S., Plassmeyer, M., Gaur, D., and Miller, L.H. (2007). Mononeme: A new secretory organelle in *Plasmodium falciparum* merozoites identified by localization of rhomboid-1 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20043–20048.

Sklar, J.G., Makinoshima, H., Schneider, J., and Glickman, M.S. (2010). *M. tuberculosis* intramembrane protease Rip1 controls transcription through three anti-sigma factor substrates. *Mol. Microbiol.* *77*, 605–617.

Song, W., Liu, W., Zhao, H., Li, S., Guan, X., Ying, J., Zhang, Y., Miao, F., Zhang, M., Ren, X., et al. (2015). Rhomboid domain containing 1 promotes colorectal cancer growth through activation of the EGFR signalling pathway. *Nat. Commun.* *6*.

Srinivasan, P., Coppens, I., and Jacobs-Lorena, M. (2009). Distinct Roles of *Plasmodium* Rhomboid 1 in Parasite Development and Malaria Pathogenesis. *PLoS Pathog.* *5*.

Stauffer, W. a, and Ravdin, J.I. b (2003). *Entamoeba histolytica*: an update. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *16*, 479–485.

Strisovsky, K. (2016). Why cells need intramembrane proteases – a mechanistic perspective. *FEBS J.* *283*, 1837–1845.

Strisovsky, K., Sharpe, H.J., and Freeman, M. (2009). Sequence-Specific Intramembrane Proteolysis: Identification of a Recognition Motif in Rhomboid Substrates. *Mol. Cell* *36*, 1048–1059.

Tan, Y., Zhang, Q., and Hua, S.G.W. and Q. (2016). Anti-Alzheimer Therapeutic Drugs Targeting γ -Secretase.

- Tsai, Y.C., and Weissman, A.M. (2012). A Ubiquitin-Binding Rhomboid Protease Aimed at ERADication. *Dev. Cell* 23, 454–456.
- Urban, S., and Shi, Y. (2008). Core principles of intramembrane proteolysis: comparison of rhomboid and site-2 family proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 432–441.
- Urban, S., Lee, J.R., and Freeman, M. (2001). *Drosophila* Rhomboid-1 Defines a Family of Putative Intramembrane Serine Proteases. *Cell* 107, 173–182.
- Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M.K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Turco, D.D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., et al. (2004). Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science* 304, 1158–1160.
- Velcicky, J., Bodendorf, U., Rigollier, P., Epple, R., Beisner, D.R., Guerini, D., Smith, P., Liu, B., Feifel, R., Wipfli, P., et al. (2018). Discovery of the First Potent, Selective, and Orally Bioavailable Signal Peptide Peptidase-Like 2a (SPPL2a) Inhibitor Displaying Pronounced Immunomodulatory Effects In Vivo. *J. Med. Chem.* 61, 865–880.
- Wang, Y., Zhang, Y., and Ha, Y. (2006). Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease. *Nature* 444, 179–180.
- Waris, G., Felmlee, D.J., Negro, F., and Siddiqui, A. (2007). Hepatitis C Virus Induces Proteolytic Cleavage of Sterol Regulatory Element Binding Proteins and Stimulates Their Phosphorylation via Oxidative Stress. *J. Virol.* 81, 8122–8130.
- Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003). Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol.* 13, 71–78.
- Weihofen, A., Lemberg, M.K., Ploegh, H.L., Bogyo, M., and Martoglio, B. (2000). Release of Signal Peptide Fragments into the Cytosol Requires Cleavage in the Transmembrane Region by a Protease Activity That Is Specifically Blocked by a Novel Cysteine Protease Inhibitor. *J. Biol. Chem.* 275, 30951–30956.
- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M.K., Ashman, K., and Martoglio, B. (2002). Identification of Signal Peptide Peptidase, a Presenilin-Type Aspartic Protease. *Science* 296, 2215–2218.
- Wilson, K.J., Gilmore, J.L., Foley, J., Lemmon, M.A., and Riese, D.J. (2009). Functional Selectivity of EGF Family Peptide Growth Factors: Implications for Cancer. *Pharmacol. Ther.* 122, 1–8.
- Wolfe, M.S. (2009). Intramembrane Proteolysis. *Chem. Rev.* 109, 1599–1612.
- Wunderle, L., Knopf, J.D., Kühnle, N., Morlé, A., Hehn, B., Adrain, C., Strisovsky, K., Freeman, M., and Lemberg, M.K. (2016). Rhomboid intramembrane protease RHBDL4 triggers ER-export and non-canonical secretion of membrane-anchored TGF α . *Sci. Rep.* 6.
- Yangngam, S., Plong-On, O., Sripo, T., Roongpraiwan, R., Hansakunachai, T., Wirojanan, J., Sombuntham, T., Ruangdaraganon, N., and Limprasert, P. (2014). Mutation Screening of the Neurexin 1 Gene in Thai Patients with Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorder. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 18, 510–515.
- Ye, J., Davé, U.P., Grishin, N.V., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2000). Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by Site-2 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5123–5128.

Zhou, S., Zhou, H., Walian, P.J., and Jap, B.K. (2005). CD147 is a regulatory subunit of the γ -secretase complex in Alzheimer's disease amyloid β -peptide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7499–7504.

Zhou, Y., Moin, S.M., Urban, S., and Zhang, Y. (2012). An Internal Water-Retention Site in the Rhomboid Intramembrane Protease GpG Ensures Catalytic Efficiency. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *20*, 1255–1263.