

JE HYPERGLYCINEMIE JEDINOU PŘÍČINOU GLYCINOVÉ ENCEFALOPATIE?

Dedikováno Ing. Jiřímu Šafandovi, CSc. (1933–2015)

J. Kotyza

Ústav lékařské chemie a biochemie LF UK v Plzni

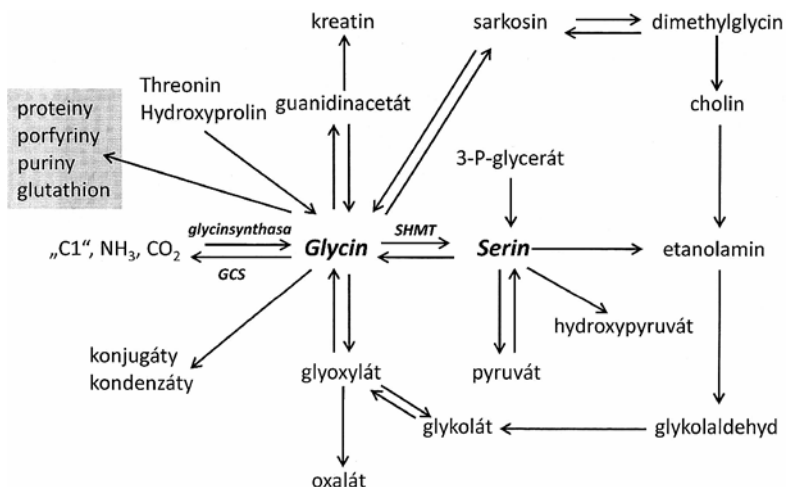
BIOLOGICKÝ VÝZNAM GLYCINU

Glycin je jedinečný svou minimalistickou strukturou – je prostým alfa-aminoderivátem octové kyseliny, $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, postrádajícím jak postranní řetězec, tak příslušnost k L- nebo D-třídě aminokyselin. Název glycin, stejně jako alternativní název „glykokol“ se vztahuje k jeho sladké chuti. Látkové množství v krvi je u člověka na druhém místě po kyselině glutamové, u některých živočichů však glycin zaujímá prvé místo (2). Glycin je tradičně pokládán za neesenciální aminokyselinu, což je v souladu s řadou endogenních zdrojů, ze kterých může být vytvořen. Glycin může vznikat ze serinu, threoninu, glyoxylátu, sarkosinu, případně z hydroxyprolinu (8). Výsledky bilančních pokusů na zvířatech i dobrovolnících však naznačují, že metabolická hotovost glycinu, jmenovitě v časném postnatálním období, nemusí vždy krýt jeho potřebu. Zdá se tedy realističtější pokládat glycin za aminokyselinu podmíněně esenciální (10, 15). Je třeba také zohlednit, že zhruba 1/3 alimentárního glycinu je odbourávána střevními bakteriemi na amoniak a oxid uhličitý.

Glycin je z 50–80 % využíván na biosyntézu proteinů, stejně důležitá je však účast glycinu nebo jeho štěpných produktů při biosyntéze serinu, purinů, kreatinu, porfyrinů, konjugačních produktů a glutathionu, hlavního buněčného redukčního pufru (obr. 1). Glycin také zasahuje do methylačních procesů vzhledem k tomu, že část jednouhlíkových rozkladových produktů se po redukci zúčastní regenerace methioninu z homocysteinu.

Pokud posuzujeme glycin jako stavební jednotku proteinů, je nutno uvést, že je klíčovou aminokyselinou pro syntézu kvantitativně nejvýznamnějšího proteinu lidského těla, kolagenu. V kolagenových řetězcích zaujímá každé třetí aminokyselinové místo, což je předpokladem pro vznik trojšroubovicové sekundární struktury.

Glycin je nezastupitelný také ve své volné, molekulární podobě, a to jako regulátor aktivity inhibičních míšních receptorů a mozkových glutamátových receptorů NMDA typu. Kromě své neuromodulační funkce ovlivňuje volný glycin i chování buněk imunitního systému, kde reguluje chloridový kanál podobně jako v nervové tkáni (3). Jeho účinek se uvádí do souvislosti s útlumem zánětových reakcí a protekcí vůči následkům ischemie. Navýšení glycinu snížilo reperfuční poškození krysího mozku (16), byly zveřejněny i údaje o potlačení nádorového růstu u hlodavců (1).



Obr. 1 Schéma metabolického zapojení glycinu sestavené z literárních údajů (Kotyza 1990, 7).
 Užité zkratky: „C1“ – částečně oxidovaný jednouhlíkový fragment, GCS – Glycine Cleavage System,
 SHMT – serinhydroxymethyltransferasa

GLYCINOVÝ ŠTĚPNÝ SYSTÉM (GCS/GLYCINSYNTHASA) A JEHO REGULACE

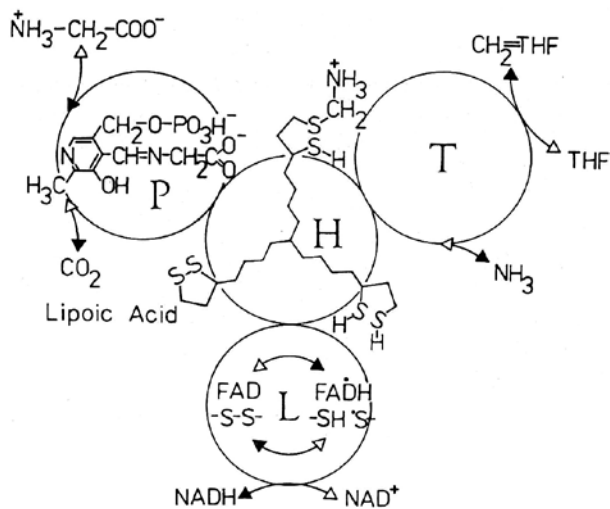
V mitochondriích je přítomen enzymový komplex schopný za určitých podmínek vytvářet glycin z jednoduchých zdrojů jaké představuje amoniak, oxid uhličitý a oxidovaný jednouhlíkový fragment („C1“). V enzymové klasifikaci mu byl přidělen název *glycylsynthasa*, a to přesto, že glycylsynthasa se na biosyntéze glycinu výrazněji podílí jen v anaerobních podmínkách, zatímco ve fyziologických, aerobních podmínkách, je hlavním zdrojem glycinu serin (4). Vznik glycinu touto cestou proto nemůže v žádném případě nahradit glycin z jiných zdrojů (10). Popsaná syntéza tedy představuje minoritní aktivitu reverzibilního enzymového systému, nasměrovaného téměř výhradně katabolicky. Jeho funkci proto lépe vystihuje pojem „glycinový štěpný systém“ („glycine cleavage system, GCS“). U člověka je GCS funkční především v játrech, ledvinách a mozku. Myokard například schopnost štěpit glycin postrádá.

Svou strukturou je glycylsynthasa heterotetramer, s jasně vyhraněnými funkcemi jednotlivých subjednotek (obr. 2). Protein „P“ je na pyridoxylfosfátu závislá dekarboxyláza glycinu. Na protein „H“ se váže prostřednictvím kyseliny lipové dekarboxylovaný fragment glycinu, aminomethylová skupina. Aminomethyl-protein H je substrátem pro enzym „T“, závislém na tetrahydrofolátu (THF). Na tomto stupni dochází k uvolnění amoniaku a vazbě C1 fragmentu na THF. Závěrečná dehydrogenační reakce je katalyzována proteinem „L“, který je příkladem *dihydrolipoamidové dehydrogenasy* vyžadující flavinový a nikotinamidový koenzym. Takové zakončení mají i jiné mitochondriální dehydrogenasy, jmenovitě pyruvátdehydrogenasový komplex a alfa-ketoacyldehydrogenázy větvených

aminokyselin. Bylo zjištěno, že dihydrolipoamidová dehydrogenasa je translační produkt jediného genu a jako mobilní jednotka spolupracuje se všemi uvedenými dehydrogenasovými komplexy. Jmenované enzymy sdílejí i regulační principy. Jsou shodně stimulovány oxidovanými a inhibovány redukovanými formami koenzymů (12). Tyto vztahy by mohly vysvětlit pozorování, podle kterých jsou aktivity jednotlivých komplexů potlačovány substráty komplexů ostatních.

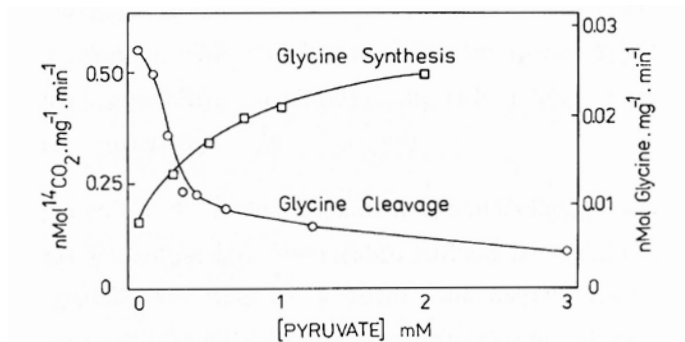
V Šafandově neurobiochemické laboratoři, zaměřené na regulaci aktivity GCS mozkových mitochondrií krys, bylo prokázáno, že stoupající koncentrace pyruvátu, substrátu pyruvátdehydrogenasy, výrazně inhibují funkci GCS, měřenou jako produkcí C^{14} CO_2 z glycinu radioaktivně značeného na C-1 (13). Biosyntéza glycinu byla naproti tomu antidromně stimulována (6) (obr. 4). Ukázalo se, že aktivita GCS mozkových mitochondrií novorozeneckých krys je poměrně nízká, v postnatálním období se však začíná exponenciálně zvyšovat (5).

Jak již bylo uvedeno, je metabolismus glycinu úzce propojen s metabolismem serinu. Serin odštěpením C1 fragmentu vytváří glycin, glycin naopak po přijetí C1 fragmentu z glycinového štěpného systému přechází na serin (obr. 1, 3). Když byl ^{15}N glycin perorálně podán dospělým dobrovolníkům, polovina značky se zabudovala do serinu, zbytek do močoviny a ostatních aminokyselin (9).

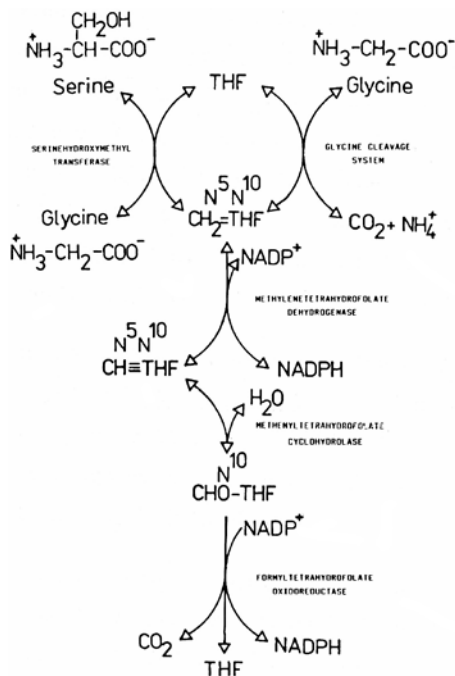


Obr. 2 Organizace glycinového štěpného systému (GCS) v mitochondriích (upravil Šafanda a spol. dle Olsona (12))

GCS obsahuje čtyři proteinové složky. Protein „P“ je na pyridoxylfosfátu závislá dekarboxyláza glycinu. Na protein „H“ se váže prostřednictvím kyseliny lipoové dekarboxylovaný fragment glycinu, aminomethylová skupina. Aminomethyl-protein H je substrátem pro enzym „T“, závislém na tetrahydrofolátu (THF). Na tomto stupni dochází k uvolnění amoniaku a vazbě C1 fragmentu na THF. Protein „L“ je dihydrolipoamidová dehydrogenasa, využívající flavinový a nikotinamidový koenzym.



Obr. 3 Postavení glycinového štěpného systému v přeměnách glycinu, serinu a v metabolismu jednonuhlíkových fragmentů (upravil Šafanda a spol. dle Olsons (12))
 Tetrahydrofolát (THF) váže C1 fragment ve formě N⁵, N¹⁰-metylen-THF. Na úrovni THF může dojít k dehydrogenaci methylenové skupiny na „methenyl“-THF, případně CO₂. C1 glycinového původu může být také přenesen na další molekulu glycinu za vzniku serinu. Metylen-THF může být navíc redukován na N⁵-methyl-THF (na obrázku není vyznačeno), který se může podílet na regeneraci methioninu (viz text).



Obr. 4 Štěpení a syntéza glycinu v mozkových mitochondriích v závislosti na koncentraci pyruvátu (Šafanda a spol. (6, 13))
 Funkce glycinového štěpného systému byla měřena jako produkce C¹⁴ CO₂ z glycinu radioaktivně značeného C¹⁴ na C-1, glycinová syntéza jako inkorporace C¹⁴-hydrogenkarbonátu do nově vytvářeného glycinu.

SOUČASNÉ NÁZORY NA PATOGENEZI GLYCINOVÉ ENCEFALOPATIE

Selhání funkce glycinového štěpného systému se projevuje jako hyperglycinemie provázená závažnou poruchou funkce CNS. Proto byl tento stav nazván *glycinová encefalopatie*. Molekulární příčinou blokády GCS jsou vrozené defekty subjednotek glycinsynthasy. Alternativní název *neketotická hyperglycinemie* odráží skutečnost, že hyperglycinemii způsobují i poruchy metabolismu jiných molekul, především větvených aminokyselin, doprovázené ketoacidózou. Glycinová encefalopatie se vyznačuje hypotonií, apnoickými stavy a záchvaty křečí. Pokud se projeví již v časném postnatálním období, končívá letálně, při pozdějším nástupu vyúsťuje v těžkou psychomotorickou retardaci. Glycinová encefalopatie je druhou nejčastější vrozenou poruchou metabolismu aminokyselin po fenylketonurii.

Podobně jako u fenylketonurie je molekulární podstata glycinové encefalopatie zjevná, patogenese však stále není uspokojivě osvětlena. Hypoteticky by nežádoucí projevy mohly být vyvolány 1) toxickým působením glycinu samotného, 2) nedostatkem C-1 fragmentů glycinového štěpného systému, případně 3) kombinací obou uvedených mechanismů.

Co se týče povšechného vlivu glycinu na živočišný organismus, užitečnou informaci přináší i standardní *dietologické studie*. V předchozích letech byla například intenzivně studována suplementace glycinem *per os* u selat, obdobně byl sledován vliv glycinu podaného různými cestami potkanům. Praktickou součástí výzkumu bylo stanovení bezpečné hranice přídávků. Zatímco navyšování glycinu uvnitř tohoto pásma (například do 4,5 g glycinu/kg hmotnosti potkanů/den) mělo blahodárné účinky v mnoha ohledech, překročení této hranice vyvolávalo různorodé příznaky včetně poruch růstu, zvýšení intrakraniálního tlaku, morfologických změn gliových buněk a poruch myokardu (15). Tyto jevy lze však také diskutovat jako porušení aminokyselinové rovnováhy, analogicky s porušením rovnováhy mezi jinými nutrienty.

Studium patogenese encefalopatií je tradičně doménou *neurofyziologického výzkumu*. Základním cílem je v tomto případě posouzení vlivu glycinu na funkce *inhibičních míšních receptorů* a/nebo mozkových *glutamátových receptorů NMDA typu*. Je známo, že inhibiční zásahy do funkce míšních receptorů se projevuje křečovými stavy, jak dokládá intoxikace strychninem. Navýšení glycinu pak dle očekávání vyvolá snížení motility kosterních svalů(4). Zvláštní pozornost byla přirozeně věnována účinku na glutamátové receptory NMDA typu. Neuronové dysfunkce by totiž bylo možno vysvětlit masivním průnikem kalciových iontů do nervových buněk následkem otevření kalciových kanálů po stimulaci glycinem. Ukázalo se však, že tento mechanismus není pravděpodobný, protože při zjištěné $K_d = 5,9 \text{ nM}$ pro vazbu glycinu je koncentrace glycinu v tělních tekutinách obnášející 1–2 mM více než dostatečná k saturaci glycinových vazebných míst. K tomu přistupuje i fakt, že zvýšená nabídka glycinu nikterak nenavýšuje funkci receptoru (11).

Zcela nové podněty k osvětlení patogenese encefalopatie však přinesla analýza *metabolických návazností* neketotické hyperglycinemie. Glycin a serin jsou hlavními produkty jednonukleotidových fragmentů, které zasahují nejen do syntéz prekurzorů nukleových kyselin, ale také do transmethylačních procesů nezbytných pro regulaci exprese genetické informace. Je tedy na místě představa, že základní příčinou encefalopatie není nadbytek

glycinu jako takový, ale spíše *nedostatek jeho štěpných produktů, C1 fragmentů*. Je známo, že na biosyntézu každého purinu je kromě molekuly glycinu třeba navíc inkorporace dvou C1 fragmentů. C1 fragmenty jsou rovněž vyžadovány pro biosyntézu deoxythymidylátu z deoxyuridylátu. Zásah do tohoto procesu, stejně jako do regenerace dihydrofolátu, jsou již dlouho využívány v rámci cytostatické terapie. Nedostatečná produkce thymidintrifosfátu postihuje také reparační systémy DNA, které zabraňují apoptotické buněčné smrti působené jednovláknovými zlomy. Nedostatkem C-1 fragmentů utrpí navíc methylační procesy, zprostředkované S-adenosylmethioninem. Methionin je regenerován z homocysteinu THFA vázanými C1 fragmenty redukovanými na methylovou skupinu. Bylo zjištěno, že genetické poruchy methylenetrahydrofolátreduktázy se promítají do celé řady chorob a patologických stavů, včetně poruch vyšších nervových funkcí (4).

Lze uzavřít, že na současné úrovni poznání nelze vyloučit toxické účinky samotného glycinu, mechanismus toxicity však postrádá vysvětlení na molekulární úrovni. Na druhé straně byly předloženy přímé i nepřímé argumenty vysvětlující poruchy CNS zásahem do metabolismu jednovláknových fragmentů a navazujících methylačních procesů. Tím jsou postiženy základní molekulárně biologické procesy ovlivňující životnost mozkových buněk (4).

SOUHRN

Glycin se řadí mezi klíčové aminokyseliny pro svou účast ve specifických proteinech jako je kolagen a strukturách jako puriny, porfyriny, thymin, glutathion a metabolické konjugáty. Glycin rovněž účinkuje jako regulátor inhibičních míšních receptorů a mozkových glutaminergních receptorů NMDA typu. Metabolismus glycinu je určován zejména interakcí se serinem a degradační/syntetickou dráhou zvanou glycinový štěpný systém / glycinsynthasa. Poruchy tohoto multifaktoriálního komplexu se mohou projevit jako hyperglycinemie neketotického typu, známou jako glycinová encefalopatie. Za příčinu tohoto mozek devastujícího onemocnění byl tradičně označován toxický vliv glycinu, postupně však vychází najevo, že stejně závažný by mohl být nedostatek jednovláknových fragmentů, hlavních produktů glycinového štěpného systému.

Is hyperglycinemia a single cause of glycine encephalopathy?

SUMMARY

Glycine is one of the key amino acids due to its incorporation into specific proteins like collagen, or structures like purines, porphyrines, thymine, glutathione, and metabolic conjugates. Glycine also serves as a regulator in spinal cord glycine inhibitory receptors and the brain glutaminergic type NMDA receptors. Metabolism of glycine is primarily determined by a close interaction with serine and by the glycine degradative/synthetic pathway, termed glycine cleavage system/glycine synthase. Disorders of this

multifactorial complex may result in hyperglycinemia of nonketotic type, known as glycine encephalopathy. A putative toxic effect of glycine was traditionally blamed for this brain-wasting condition but it has gradually become apparent that the secondary shortage of one-carbon species, major glycine cleavage products, may provide supplementary plausible explanation.

LITERATURA

1. Amin K., Li J., Chao W. R. et al.: Dietary glycine inhibits angiogenesis during wound healing and tumor growth. *Cancer Biol. Ther.* 2, 2003: 173–178. – 2. Flynn N. E., Knabe D. A., Mallick B. K. et al.: Postnatal changes of plasma amino acids in suckling pigs. *J. Anim. Sci.* 78, 2000: 2369–75. – 3. Froh M., Thurman R. G., Wheeler M. D.: Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, 2002: 856–863. – 4. Kikuchi G., Motokawa Y., Yoshida T., Hiraga K.: Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc. Jpn. Acad.* 84, 2008: 246–263. 5. Kotyza J., Šafanda J., Pešková Z., Sobotka P.: Glycinový metabolismus mozku nezralých kryš při experimentální hyperfenylalaninemii. *Plzeň. lék. Sborn.* 55, 1987: 11–21. – 6. Kotyza J., Šafanda J., Sobotka P.: Glycine cleavage systém kryšich mozkových mitochondrií a jeho inverze. *Sborník Celostátních biochemických dnů 4.–7. září 1989, Olomouc:* 85. – 7. Kotyza J.: Experimentální ovlivnění glycinového metabolismu mozku laboratorních potkanů. *Habilitační práce. Plzeň, 1990.* – 8. Lowry M., Hall D. E., Brosnan J. T.: Hydroxyproline metabolism by the rat kidney distribution of renal enzymes of hydroxyproline catabolism and renal conversion of hydroxyproline to glycine and serine. *Metabolism* 34, 1985: 955–961. – 9. Matthews D. E., Conway J. M., Young V. R. et al.: Glycine nitrogen metabolism in man. *Metabolism* 30, 1981: 886–893. – 10. Melendez-Hevia E., De Paz-Lugo P., Cornish-Bowden A. et al.: A weak link in metabolism: the metabolic capacity for glycine biosynthesis does not satisfy the need for collagen synthesis. *J. Biosci.* 34, 2009: 853–872. – 11. Obrenovitcha T. P., Hardya A. M., Urenjak J.: High extracellular glycine does not potentiate N-methyl-D-aspartate-evoked depolarization in vivo. *Brain Res.* 746, 1997: 190–194. – 12. Olson M. S.: Regulation of the mitochondrial multienzyme complexes in complex metabolic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 573, 1989: 218–229. – 13. Šafanda J., Kotyza J., Sobotka P., Pešková Z.: The regulation of glycine metabolism in the rat brain. *Plzeň. lék. Sborn., Suppl.* 64, 1991: 19–23. – 14. Vettakkorumakankav N. N., Patel M. S.: Dihydropolipamide dehydrogenase: structural and mechanistic aspects. *Indian J. Biochem. Biophys.* 33, 1996: 168–176. – 15. Wu G, Wu Z. L., Dai Z. L. et al.: Dietary requirements of nutritionally nonessential amino acids by animals and humans. *Amino Acids* 44, 2013: 1107–1113. – 16. Zhong Z., Jones S., Thurman R. G.: Glycine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow liver perfusion model in the rat. *Am. J. Physiol.* 270, 1996: 332–338.

Adresa autora: J. K., Karlovarská 48, 30166 Plzeň