

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Květoslava Křížková

*Příprava a charakterizace GlnB22-insulinu, mutantu přirozeně se vyskytujícího
u diabetických pacientů*

*Preparation and characterization of GlnB22-insulin, a naturally occurring mutant
in diabetic patients*

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce/ Školitel:

RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.

Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci sepsala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Lenky Žákové, Ph.D. a garanta Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. Všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyly předloženy k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne :

Podpis:

ABSTRAKT

Diabetes mellitus je onemocnění rozšířené po celém světě. Postihuje jedince všech věkových kategorií, od novorozenců po seniory. Diabetes nemá jednotnou příčinu. Jedná se o souhru několika faktorů, které vedou k poruše regulace hladiny glukózy v krvi. Ve většině případů se jedná o několik genetických defektů ve spojení se špatným životním stylem. Nedávno byl ale objeven diabetes, způsobený mutací v jednom genu, tzv. monogenní diabetes, kdy chyba pouze v jediném genu způsobí propuknutí nemoci. Mezi těchto několik důležitých genů patří i gen kódující primární strukturu prekurzoru insulinu, preproinsulinu. Každá záměna v peptidovém řetězci je specifická a způsobuje trochu jinou formu nemoci. Odhalení pacientů s touto mutací vede k upřesnění jejich léčby a často ke zlepšení jejich životních podmínek.

Projev mutací v insulinovém genu je různý. Některé záměny vedou k neonatálnímu diabetu a pacienti jsou od narození plně závislí na insulinu. Jiné se nemusejí nikdy projevit nebo se dají léčit pouze dietou. O závažnosti nemoci rozhodují vlastnosti původní aminokyseliny a její úloha při biosyntéze insulinu či interakci s insulinovým receptorem stejně tak jako vlastnosti nově vložené aminokyseliny.

Patogenní mutant QB22-insulin byl nalezen u několika jedinců v České republice a v Norsku a způsobil propuknutí monogenního diabetu typu MODY. V molekule je původní arginin na pozici 22 B-řetězce nahrazen glutaminem. Guanidinylová skupina argininu se podílí na stabilizaci terciální struktury a pravděpodobně svým kladným nábojem stabilizuje i přechodový stav při formování disulfidických můstků mezi řetězci A a B. Ztrátou argininu klesne stabilita monomeru, pravděpodobně se prodlouží čas potřebný ke správnému sbalení molekuly, odhalí se nové části řetězce a tím se zvýší riziko vzniku nežádoucích reakcí s ostatními okolními molekulami. Ve výsledku pak dochází k skladování špatně „sbalených“ molekul uvnitř endoplasmatického retikula (ER), stresu ER a inhibici současně produkovaného, přirozeného insulinu.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a widespread disease which can be diagnosed in all age groups from newborns to seniors. Diabetes has multiple causes. The final disorder of blood glucose regulation is caused by a complex of factors and agents, in many cases by genetic defects connected with an unhealthy lifestyle. Moreover, a recently discovered form of diabetes, referred to as the monogenic diabetes, results from a gene mutation whereby only a single gene defect causes the onset of disease. The gene encoding the insulin primary structure belongs to several fundamental genes. Each change in a peptide chain is unique and leads to variation in this disease. Diagnosing patients with this mutation results in more detailed specification of their treatment and often also in the improvement of their living conditions.

Mutations of the insulin gene have various symptoms. Some of the changes lead to the neonatal diabetes and patients are fully addicted to insulin since their birth. Other variations will never break out at their carriers. Seriousness of the disease course depends on characteristics of an original amino acid, its function in the insulin biosynthesis, its interaction with the insulin receptor, and on characteristics of a newly inserted amino acid and its influence on natural processes.

The pathogenic mutant, QB22-insulin, has been diagnosed in several cases in the Czech Republic. The molecule of arginine in the 22B-chain position in the insulin molecule is substituted by the molecule of glutamine. The guanidine group of arginine is important for stabilisation of the insulin tertiary structure; and a guanidine group positive charge is likely to stabilise a transient state within the formation of disulphide bonds between A and B chains.

The monomer stability decreases with the change the arginine residue for glutamine. Consequently, the time required for normal folding of molecule will be longer and new parts of the chain will be exposed. This effects leads to a higher risk of adverse reactions with other molecules contained in the ambient environment. Improperly folded molecules are subject to retention in endoplasmic reticulum (ER), they cause an ER stress, and they inhibit production of wild-type insulin. (In Czech)

Úvodem bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Lence Žákové, PhD. za odborné vedení, velikou vstřícnost a trpělivost během tvorby mé bakalářské práce a vedoucí práce paní Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za vstřícnost a umožnění tvorby této práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. za laskavost a cenné rady, zejména v experimentální části této práce. Stejně tak děkuji celému kolektivu skupiny Dr. Jiráčka ÚOCHB AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji své rodině za umožnění studia a velkou podporu při něm.

Obsah

Abstrakt.....	2
Abstract.....	3
Seznam použitých zkratek.....	7
1. Úvod	8
1.1. Historie výzkumu insulínu.....	8
1.2. Molekula insulínu.....	9
1.2.1. Vlastnosti molekuly a její struktura.....	9
1.2.2. Kvarterní struktura insulínu.....	10
1.3. Insulinový receptor.....	12
1.4. Interakce insulínu s insulinovým receptorem.....	13
1.5. Biosyntéza insulínu.....	13
1.6. Sekrece insulínu z β -buněk a jeho osud po sekreci.....	16
1.7. Diabetes mellitus.....	18
1.7.1. Typy diabetu	18
1.7.2. Monogenní diabetes mellitus.....	19
1.7.2.1. Neonatální diabetes mellitus.....	20
1.7.2.2. Diabetes dospělého typu, projevující se u mládeže, MODY.....	21
1.8. Stres endoplasmatického retikula.....	22
1.9. Mutantní QB22-insulín.....	23
1.10. Příprava insulínu a jeho analogů.....	24
1.10.1. Celková chemická syntéza.....	24
1.10.2. Biosyntéza metodami genového inženýrství.....	25
2. CÍL PRÁCE.....	26
3. MATERIÁL.....	27
4. METODY.....	28
4.1. Příprava A-řetězce a QB22-B-řetězce lidského insulínu.....	28
4.2. Štěpení řetězců z pevné fáze a konverze na S-sulfonáty.....	28
4.3. Gelová chromatografie.....	29
4.4. Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi.....	29
4.4.1. Využití RP-HPLC k analytickému stanovení.....	29
4.4.2. Využití RP-HPLC k preparaci vzorků.....	30
4.5. Hmotnostní spektrometrie.....	30
4.6. Rekombinace řetězců.....	31
4.6.1. Redukční fáze.....	31
4.6.2. Oxidační fáze.....	31
4.7. Vazebné testy analogu vůči insulinovému receptoru <i>in vitro</i>	32
4.7.1. Příprava buněk pro vazebné testy.....	32
4.7.2. Příprava roztoku lidského insulínu a QB22-insulínu.....	32
4.7.3. Testování vazebné afinity insulinového analogu vůči receptoru <i>in vitro</i>	33

4.8. Testování biologické aktivity insulinového analogu QB22-insulinu <i>in vivo</i>	33
5. VÝSLEDKY.....	35
5.1. Příprava S-sulfonátu A-řetězce a S-sulfonátu QB22-B-řetězce.....	35
5.1.1. Purifikace a identifikace řetězců.....	36
5.2. Rekombinace řetězců.....	38
5.3. Analýza čistoty a zhodnocení výtěžků QB22-B-řetězce.....	40
5.4. Testování vazebné afinity QB22-insulinu <i>in vitro</i>	41
5.5. Testování biologické aktivity QB22-insulinu <i>in vivo</i>	42
6. DISKUSE.....	44
7. SOUHRN.....	47
Reference.....	48

Seznam použitých zkratek

ACN - acetonitril

Boc - *tert*-butyloxykarbonylová skupina

BSA - hovězí sérový albumin

DMC - dichlormethan

Dipea - *N,N*-diisopropylethylamin

DMF - *N,N*-dimethylformamid

DTT - dithiotreitol

EDT - ethandithiol

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina

ER - endoplasmatické retikulum

Fmoc - 9-fluorenyl-methyloxykarbonylová skupina

GuaHCl - guanidin-hydrochlorid

Gly/NaOH pufr - glycinový pufr

HBTU - 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonová kyselina

HOBt - *N*-hydroxybenzotriazol

IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

RP-HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

*t*Bu - *tert*-butylová skupina

TFA - trifluoroctová kyselina

TIS - triisopropylsilan

Tris - *tris*-(hydroxymethyl)-aminomethan

Trt - tritylová skupina

Dále jsou užívány třípísmenné a jednopísmenné zkratky aminokyselin podle doporučení IUPAC-IUB. Pokud není uvedeno jinak, jedná se o aminokyseliny v *L*-formě.

1. ÚVOD

1.1. Historie výzkumu insulínu

Výzkum insulínu a jeho nepostradatelnosti pro život sahá hluboko do naší historie. Nedostatek insulínu nebo schopnost těla na insulín reagovat je příčinou nemoci známé jako diabetes mellitus. Před objevením insulínu se diabetičtí pacienti léčili pouze striktní dietou, obsahující co nejnižší množství cukrů. Tím se jen zpomalil postup nemoci a pacienti stále umírali, ať už na následek samotného diabetu či kachexie vyvolané léčbou.(1)

Již ve starověku lidé věděli, že nemocný cukrovkou vylučuje sladkou moč. V období Římské říše získala cukrovka své jméno diabetes. Pojmenování je odvozené od řeckého diabainein (vyplavovat, protékat) a souvisí s velkým množstvím moči, které diabetičtí pacienti produkují.(2)

První objev v léčbě diabetu učinil německý student medicíny Paul Langerhans v roce 1869. Zjistil, že uvnitř slinivky se nacházejí shluky buněk s neznámou funkcí a popsal je. Shluky buněk byly později pojmenovány jako Langerhansovy ostrůvky. Roku 1889 fyziolog Oskar Minkowski a lékař Paul von Mering dokázali, že slinivka má minimálně dvě funkce. Mimo známé produkce trávicích šťáv produkuje ještě látku, jež reguluje množství glukózy v krvi (insulín).(3)

Počátkem 20. století se k léčení diabetu začaly, ne zcela účinně, používat extrakty z pankreatu. Pokrok přišel s Frederickem Bantingem a Charlesem Bestem v laboratoři Johna Macleoda na univerzitě v Torontu v létě 1921. Směs získanou ze slinivky nejprve nazvali jako "isletin". Nejprve směsí z pankreatu léčili diabetické psy a pozitivní výsledky vedly k tomu, že se Banting se svým týmem odhodlal pankreatickým extraktem léčit 14-ti letého chlapce. Zdravotní stav chlapce se léčbou stabilizoval a jeho život se prodloužil o 13 let. V roce 1923 získali Frederick Banting a John Macleod Nobelovu cenu.(1,3,4)

Roku 1922 byl všeobecně přijat názor, že insulín je protein. Díky své nepostradatelnosti v léčbě diabetických pacientů s čímž souvisí i ekonomická perspektiva výzkumu, se stal insulín "proteinem 20. století".(1) Byl modelem pro objasnění různých vlastností proteinů jako celku. Připisuje si také několik prvenství. Je to první protein,

u kterého byla zjištěna primární sekvence aminokyselin. Tu objasnil v roce 1955 Frederick Sanger, který zároveň vynalezl univerzální metodu stanovení primární struktury proteinů (5), za což v roce 1958 získal Nobelovu cenu. Insulin je také prvním proteinem, který byl kompletně syntetizován – nezávisle v laboratořích Helmuta Zahna v Německu, Panayotise Katsoyannise v USA a Yu Can Dua a Zhang You Shanga v Číně.(6,7,8)

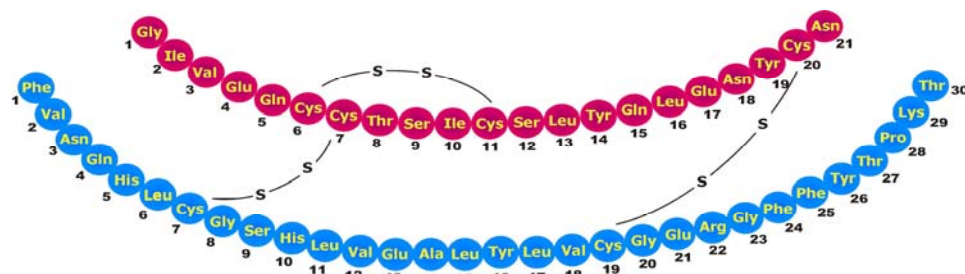
Krystalizaci insulínu poprvé provedl John Abel roku 1929 v Baltimoru. Později ho následoval Jörgen Schlichtkrull, který zlepšil podmínky krystalizace a definoval v roce 1958 dvě možnosti hexamerního uspořádání v přítomnosti buď dvou nebo čtyř zinečnatých iontů. Na jeho práci navázala Dorothy Crowfoot Hodgkinová. Se svými kolegy v Oxfordu pomocí X-paprskové krystalografie stanovila 3-rozměrnou strukturu insulínu.(9) Dorothy Crowfoot Hodgkinová získala za rentgenostrukturní analýzu v roce 1964 Nobelovu cenu.

V neposlední řadě byl insulin jako první protein syntetizován v mikroorganismech pomocí metody rekombinantní DNA.(3)

1.2. Molekula insulínu

1.2.1. Vlastnosti insulínu a jeho struktura

Insulin je globulární protein složený ze dvou řetězců A a B. Řetězec A obsahuje 21 aminokyselin a má spíše kyselý charakter. B-řetězec má spíše bazický charakter a je složen z 30 aminokyselin. V A-řetězci jsou čtyři cysteiny v pozicích A6, A7, A11 a A20 a v B-řetězci jsou dva cysteiny v pozicích B7 a B19. Cysteiny se oxidují za vzniku tří disulfidických můstků, z nichž jeden je intrachinární mezi cysteiny v pozicích A6 a A11. Další dva vytvářejí interchinární můstky A7-B7 a A20-B19 a propojují tak řetězec A s řetězcem B.(10)



Obr. 1. : Primární struktura lidského insulínu. A-řetězec je znázorněn červenou barvou a B-řetězec modrou barvou. Převzato (15).

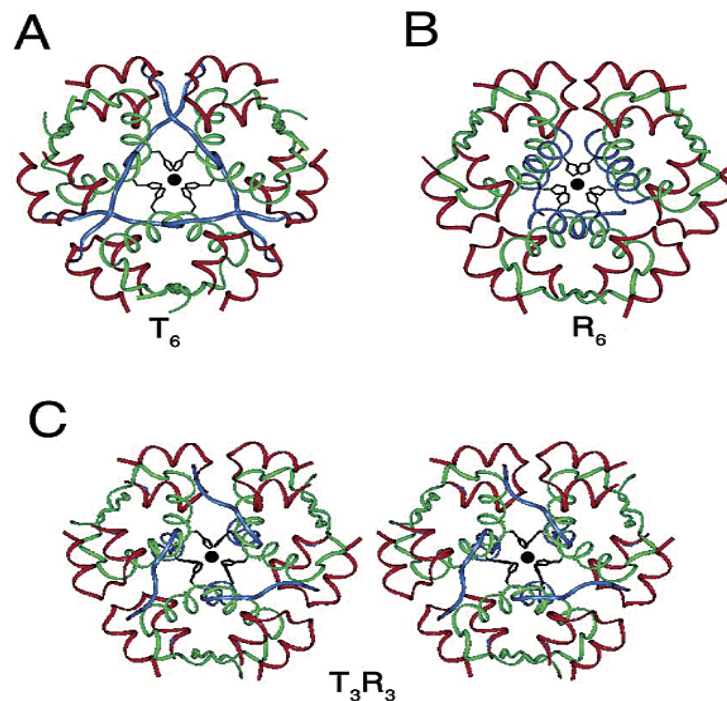
Molekula insulínu obsahuje oblasti, které snadněji podléhají mutacím a u různých druhů živočichů a evolucí jednoho druhu se liší, a naopak oblasti, které jsou evolučně i druhově neměnné. Evolučně konzervované oblasti mají důležitou strukturní a funkční úlohu a jejich změnou by došlo k poškození až neschopnosti správné funkce insulínu v organismu. První z těchto oblastí jsou nepolární aminokyseliny tvořící jádro molekuly a napomáhající správnému složení obou řetězců v monomeru. Sem patří všechny cysteiny, leuciny A16, B6, B11 a B15, valin B18 a glyciny B8 a B23.(11,12) Druhou invariantní oblastí jsou aminokyseliny, podílející se na agregaci monomeru na vyšší formy, jako jsou dimer a hexamer. Tam patří hlavně aminokyseliny histidiny B5 a B10, valin B12, kyselina glutamová B13, tyrosin B16 a aromatický triplet z řetězce B fenylalaniny B24 a B25 a tyrosin B26. Tyto aminokyseliny se nejspíše podílejí i na vazbě insulínu na jeho receptor. Poslední skupinu tvoří aminokyseliny na povrchu molekuly, které se účastní různých stádií agregace, udržují správnou terciální strukturu a podílejí se při vazbě na receptor. Je to glycin A1, isoleucin A2, valin A3, glutamin A5, tyrosin A19 a asparagin A21.(11,12, 13,14,16)

V řetězci A se nacházejí dvě α -šroubovicové oblasti. První je mezi aminokyselinami A2-A8 a druhá A13-A19. Tyto šroubovicové oblasti jsou spojené β -otáčkou A9-A12. B řetězec obsahuje centrální α -šroubovici, jež tvoří aminokyseliny B9 až B19. Za ním následuje β -otáčka B20-B23. C-konec B řetězce je ve struktuře β -skládaného listu. N-konec B-řetězce může zaujímat dvě různé konformace T a R. V T-konformaci (z anglického tense, napnutý) nemá konec řetězce (B1-B8) pevnou strukturu a je volně natažený. V R-stavu (z anglického relax, uvolněný) prodlužuje N-konec B-řetězce centrální α -šroubovici B9-B19 a vytváří α -šroubovici B1-B19.(17, 18,19)

1.2.2. Kvartérní struktura insulínu

Insulin v těle cirkuluje ve formě monomeru.(18) Tato forma insulínu je biologicky aktivní. V mikromolárních koncentracích asociuje do dimerních struktur a v přítomnosti zinečnatých nebo jiných bivalentních iontů kovu vytváří hexamery. Hexamerní struktura může vzniknout koordinací okolo dvou zinečnatých iontů, kdy jsou všechny molekuly insulínu v T-stavu a tato struktura se nazývá T_6 (obr.2A, str.11). V přítomnosti malých

cyklických alkoholů je N-konec B-řetězce v R-stavu a hexamer zaujímá konformaci R_6 (obr.2B). Při vysoké koncentraci chloridových aniontů a dostatečné koncentraci zinečnatých iontů vytváří insulin hexamery okolo čtyř molekul Zn^{2+} (obr.2C). Přičemž tři monomery jsou v konformaci T a tři v konformaci R a struktura je označována jako T_3R_3 .(20) Za schopnost insulinu koordinovat okolo zinečnatých iontů a vytvářet hexamery je odpovědný hlavně histidin v pozici B10. Někteří živočichové, jako jsou někteří mořští živočichové či hlodavci, histidin v B-řetězci na pozici 10 nemají a nejsou schopni hexamery vytvářet.(21)

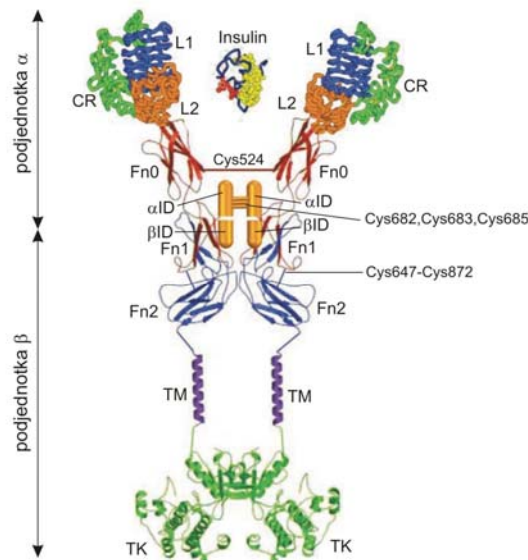


Obr. 2.: Krystalové struktury insulinu. Zn^{2+} ionty jsou znázorněny černými kuličkami uprostřed. (A) T_6 konformace hexameru, která váže 2 atomy zinečnatých iontů. (B) R_6 konformace, do které přechází insulin hlavně v přítomnosti malých cyklických alkoholů. (C) stereozobrazení T_3R_3 konformace, která váže 4 atomy zinečnatých iontů; červeně je znázorněn A-řetězec, zeleně B-řetězec mimo část B1-B8, která je znázorněna modře; převzato (75).

1.3. Insulinový receptor

Insulinový receptor je transmembránový glykoprotein, který se skládá ze dvou podjednotek α a β , propojených čtyřmi disulfidickými můstky. Pro navázání insulinu na receptor musí vzniknout heterotetramer, skládající se ze dvou extracelulárních α -podjednotek a ze dvou částečně extra- a částečně intracelulárních β -podjednotek. α - a β - podjednotky jsou kovalentně spojeny disulfidickými můstky mezi cysteiny v pozicích 647 a 872 (obr.3).(22,23)

Heterodimer receptoru je složen z několika domén. V extracelulární oblasti jsou to na N-konci receptoru velké homologní L1 a L2 domény. Mezi nimi je umístěna menší oblast bohatá na cystein, označovaná jako CR doména. Extracelulární oblast receptoru uzavírají tři domény fibronektinu typu III Fn0, Fn1 a Fn2. Následuje transmembránová doména TM a v intracelulární části receptoru tyrosinkinázová doména, označována TK. Tyrosinkinázová doména je nejvíce evolučně konzervovaná oblast a vyznačuje se tyrosinkinázovou aktivitou. To řadí receptor do rodiny tyrosinkinázových receptorů. (24,25)



Obr. 3.: Strukturální model heterotetrameru insulinového receptoru s vyznačenými disulfidickými můstky. L1, L2 označují homologní domény; CR - domény bohaté na cysteiny; Fn0, Fn1, Fn2 - domény fibronektinu typu III; TM - transmembránová doména; TK - tyrosinkinázová doména; upraveno z (25).

1.4. Interakce insulínu s insulínovým receptorem

Vazba insulínu na jeho receptor byla a stále je předmětem výzkumu. Jeho plné objasnění by bylo ceněné zejména v boji s nemocí diabetes mellitus. Přesnou znalostí vazebných míst a mechanismu působení by bylo možné pozvednout požadované vlastnosti syntetizovaných analogů a potlačit vlastnosti nežádoucí.

Dlouholetým výzkumem a záměrnými záměnami aminokyselin v obou řetězcích insulínu bylo objasněno, jaké části molekuly se na vazbě podílejí. Jedná se hlavně o evolučně konzervované aminokyseliny - z A-řetězce jsou to glycin A1, isoleucin A2, valin A3, tyrosin A19 a asparagin A21 v B-řetězci jde o leucin B6, glycin B8, valin B12, tyrosin B16, glycin B23, fenylalanin B24 a B25 a tyrosin B26.(24,25)

Velmi významnou roli při vazbě insulínu na receptor má C-konec B-řetězce, konkrétně aminokyseliny v pozicích B23-B26. Zde nejspíše dochází k primárnímu kontaktu s hydrofóbním místem na receptoru. Po jeho navázání prochází B-řetězec rozsáhlými konformačními změnami. Pravděpodobně se C-konec B-řetězce odkloní od centra molekuly a tím dojde k odhalení dalších, dříve skrytých částí, jako jsou aminokyseliny A1-A3.(26) Další významná konformační změna je pravděpodobně na N-konci B-řetězce, kde přeměna mezi T a R stavy bude patrně výrazně ovlivňovat interakci s receptorem.

Insulínový receptor byl zkoumán různými metodami, cílenými záměnami v analogích insulínu, afinitním značením či elektronovou mikroskopií.(24,25) Prokázalo se, že insulín se může vázat různými částmi své molekuly nejméně na dvě místa v heterodimerní podjednotce. Díky tomu, že kompletní molekula receptoru je složena ze dvou stejných částí, a je tedy dvojčetně souměrná, vznikají dvě možná místa pro vazbu hormonu.

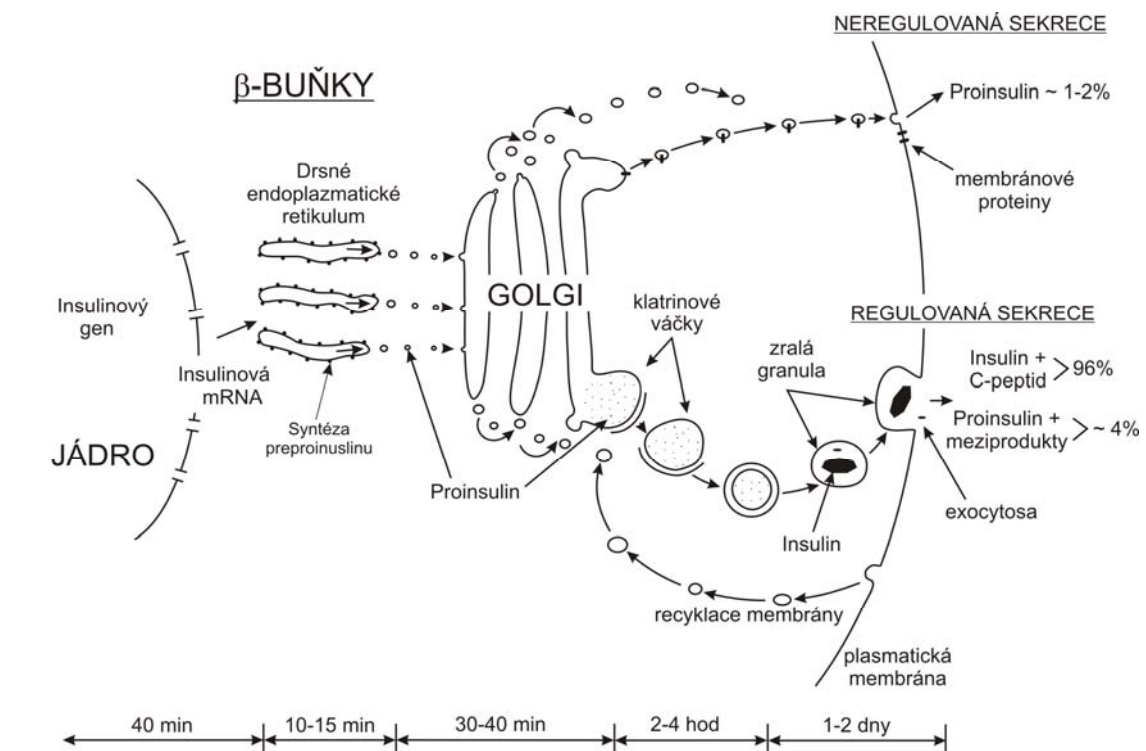
1.5. Biosyntéza insulínu

Biosyntéza insulínu začíná uvnitř pankreatu v β -buňkách Langerhansových ostrůvků na ribosomech endoplasmatického retikula. Pouze v β -buňkách se vyskytují proteinové faktory, které dokáží rozpoznat specifické úseky DNA a spustit transkripci genu

pro insulin.(10) Lidský insulinový gen se nalézá na krátkém raménku chromozomu 11.(27)

Insulin se v buňkách vytváří v podobě zymogenu. Primární prekurzor je preproinsulin. Ten se od svého následovníka, a stále zymogenu, proinsulinu liší sekvencí 24 aminokyselin na N-konci řetězce, tzv. signální sekvencí.(28).

Sekvence 24 aminokyselin připojení k N-konci B-řetězce u preproinsulinu je výrazně hydrofóbní. Její hlavní úloha spočívá v přenosu vzniklé molekuly přes membránu do lumen endoplasmatického retikula. Během přenosu či těsně po něm dochází k odštěpení signální sekvence peptidázou a její následné degradaci.(29) Vzniklý proinsulin se skládá ze 3 částí: budoucího A řetězce, C-peptidu a budoucího B-řetězce. C-peptid spojuje C-konec B-řetězce s N-koncem A-řetězce (obr.5, str.16). Hlavní úlohou C-peptidu je zajištění vzniku správné terciální struktury molekuly insulinu. U různých savců se C-peptid liší délkou i složením, z čehož se usuzuje, že nemá další významnou fyziologickou funkci.(30,31,32)



Obr.4.: Znárodnění putování insulinu od jeho vzniku až po sekreci z buňky. Převzato (10).

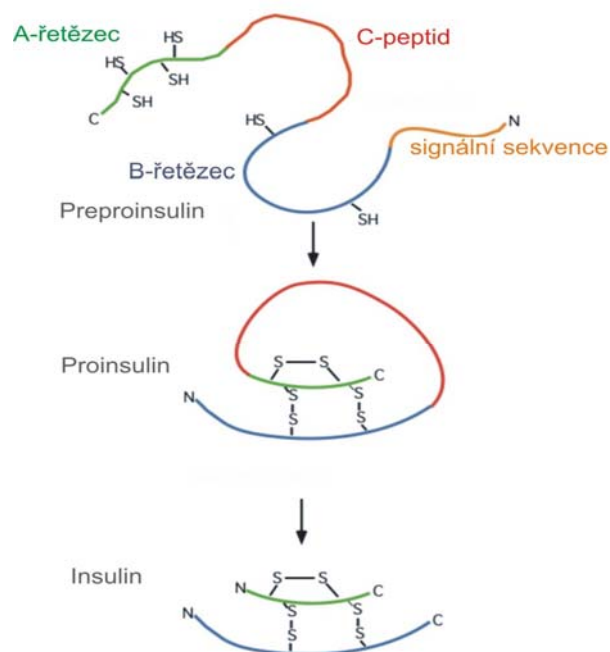
Uvnitř endoplasmatického retikula se molekula proinsulinu rychle, spontánně sbalí

do správné konformace a vytvoří disulfidické můstky. Odtud proinsulin putuje v transportním váčku, který ho chrání před cytosolickým prostředím, k cisternám Golgiho aparátu (obr.4.,str.14).(10) V trans-cisternách Golgiho aparátu, se proinsulin shlukuje v sekrečních granulích, pučících z Golgiho aparátu.(33) Už v trans cisternách Golgiho aparátu a dále i v sekrečních granulích probíhá přeměna proinsulinu v insulin. Konverze je doprovázena změnou vlastností sekrečních granulí. Nově vzniklé granule mají nižší hustotu obsahu a jsou pokryta klatrinem.(10, 34) Klatrin je protein, který obaluje sekreční váček na cytosolické straně. Mimo jiné brání předčasnému splynutí váčku s membránou, neboť je k membráně váčku připojen proteiny, nutnými k integraci s plasmatickou membránou při sekreci, adaptiny. Zvýšení hustoty proteinu spolu s dozráváním granulí umožní vznik mikrokrytalů insulinu v hexamerním uspořádání. Krystalické uspořádání má hned dvě výhody. Jednak chrání insulin před degradujícími enzymy a jednak pomáhá efektivitě konverze fakt, že krystalky vytváří pouze insulin oproti nekrytalizujícímu proinsulinu.(35) S postupující konverzí mizí i pokrytí klatrinem. Předpokládá se, že další důležitou úlohou klatrinu je zbavení zralých granulí enzymů, umožňujících konverzi.(36)

Konverze proinsulinu na insulin znamená vyštěpení C-peptidu. C-peptid má na obou koncích pár bazických aminokyselin.(37) Mezi C-koncem B-řetězce a N-koncem C-peptidu jsou to Arg31 a Arg32 a mezi C-koncem C-peptidu a N-koncem A-řetězce se nacházejí Lys64 a Arg65. K úplnému odstranění C-peptidu jsou zapotřebí 2 enzymy. První je endopeptidáza se specifitou podobnou trypsinu, která štěpí proinsulin za páry bazických aminokyselin. Druhou proteázou je exopeptidáza se specifitou podobnou karboxypeptidáze B, která na C-konci B-řetězce už z částečně odštěpeného C-peptidu odstraňuje dvě bazické aminokyseliny. (38,39)

Zralé sekreční granule s insulinem putují od Golgiho aparátu k membráně, se kterou ochranný membránový váček splyne a dojde k vylití jeho obsahu ven z buňky do krevního řečiště.

Procesem konverze prochází naprostá většina insulinu. Pouze malá část proinsulinu je vylučována neregulovanou sekrecí (obr.4, str. 14).(40) Proinsulin má asi 3-5% biologické aktivity insulinu. Nízká aktivita je způsobena neschopností, díky přítomnému C-peptidu, přejít do aktivní konformace a navázat se na receptor.(41,24)



Obr. 5. : Znázornění změn, kterými prochází molekula insulínu během svého vzniku. Převzato (15).

1.6. Sekrece insulínu z β -buněk a jeho osud po sekreci

Langerhansovy ostrůvky jsou složeny ze stovek buněk různého tvaru, mezi nimiž jsou nejčetněji zastoupeny β -buňky produkující insulín. Buňky jsou odděleny četnými kapilárami, které zajišťují kontakt s krevním oběhem a kam jsou sekretovány produkované hormony.(43)

Langerhansovy ostrůvky jsou obklopeny intestinální tekutinou. Složení intestinální tekutiny je hlavní regulací sekrece insulínu, přičemž nejdůležitějším aktivátorem sekrece je koncentrace glukózy v krvi. Některé jiné látky, přijímané organismem, mohou také stimulovat biosyntézu insulínu, k jeho sekreci je však nutná přítomnost glukózy. Mezi látky stimulující biosyntézu patří některé *L*-aminokyseliny, mastné kyseliny či ketonové látky.(44)

Klíčovou roli k vyplavení insulínu mají vápenaté ionty. Zvýšením hladiny glukózy v intestinální tekutině dochází sledem dějů ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytosolu β -buněk. Zvýšené množství vápenatých iontů aktivuje různé proteinkinázy, což následně

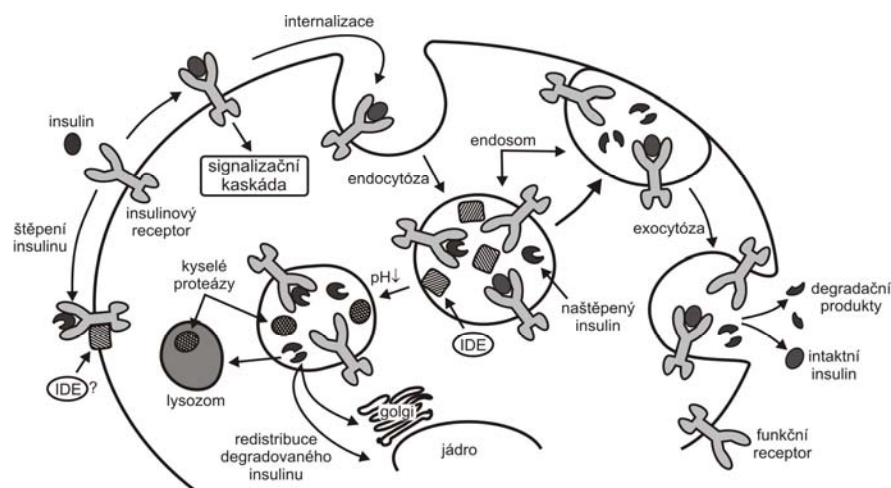
vede ke kontrakcím mikrotubulů a mikrofilament, které přemístí sekreční granule s insulinem k plasmatické membráně a umožní uvolnění insulinu do krve.(45)

Insulin se v sekrečních váčcích bohatých na Zn^{2+} nachází ve formě hexameru. Po uvolnění do krve, kde je vyšší pH, dochází k deprotonaci karboxylové skupiny kyseliny glutamové v pozici B13. Protonovaná $-COOH$ skupina se podílí na koordinaci histidinů v pozicích B10 okolo Zn^{2+} iontů a její deprotonací dochází k destabilizaci vazeb v hexamerním uspořádání, které vedou k jejich rozpadu. Insulin krví cirkuluje ve formě biologicky aktivního monomeru.

Insulin doputuje k cílové buňce, která má na svém povrchu insulinový receptor a naváže se na něj (obr.6.,str.18).(46) Vazba insulinu na jeho receptor způsobí kaskádu dějů, které vedou ke vstupu molekul glukózy do nitra buňky. Vazbou na receptor se současně spustí degradační procesy, které vedou ke zničení molekuly insulinu. Insulinový receptor s navázaným insulinem internalizuje do nitra buňky za vzniku endosomu. Ihned po vzniku endosomů začíná na insulin navázaný na receptor působit enzym degradující insulin (IDE), jež je hlavním enzymem odbourávajícím insulin. Mimo něj se působením protonových pump značně sníží pH uvnitř endosomového váčku. Insulin disociuje z receptoru a na jeho další destrukci se podílí kyselá proteázy.(47,48) Takto je degradována asi polovina insulinu.(49) Zbylá část je transportována do lysozomů, Golgiho aparátu či jádra, kde je proces odbourání dokončen.

Malá část insulinu se i po degradujících procesech v buňce vrací zcela nebo částečně aktivní zpět do krevního oběhu, kde se dále podílí na metabolismu glukózy.(50)

Nejvíce insulinu je degradováno v játrech. Druhým významným místem jsou ledviny, kde se jednak odbourává insulin, ale i proinsulin a C-peptid. Třetím významným místem odbourání insulinu je sval.(51)



Obr. 6.: Osud insulínu po navázání na insulínový receptor. Převzato (10).

1.7. Diabetes mellitus

1.7.1. Typy diabetu

Diabetes mellitus je onemocnění spojené s nedostatkem insulínu či neschopností organismu insulín správně využívat. Nemá-li onemocnění léčeno, dochází k těžkému poškození různých orgánů a může skončit i smrtí.(52) V roce 2011 postihoval diabetes asi 366 milionů lidí, žijících převážně v hůře či středně ekonomicky prosperujících zemích. Za uplynulý rok (2011) zemřelo na jeho následek 4,6 milionů nemocných.(53)

Cukrovka (diabetes mellitus) nemá jednotnou příčinu. Jde o souhru několika faktorů, které vedou k poruše regulace hladiny glukózy v krvi - hyperglykémie (zvýšená hladina krevního cukru) či hypoglykémie (nízká hladina krevního cukru).

Odhaduje se, že lidský organismus obsahuje 21 tisíc genů. Mezi nimi je 300 genů, ve kterých dojde-li k mutaci, zvyšuje se riziko vzniku či vzniká diabetes. Změny ve více genech způsobují polygenně podmíněný diabetes mellitus. Sem patří oba nejvýznamnější typy: diabetes mellitus 1. typu (DM1) a diabetes mellitus 2. typu (DM2). DM1 je způsoben autoimunitním poškozením β -buněk, jež nejsou schopné produkovat insulín a udržovat optimální hladinu krevního cukru a zpravidla postihuje mladší pacienty. DM2 se vyznačuje dostatečnou produkcí insulínu, ale β -buňky nejsou schopny optimální sekrece a tkáň

postižených jedinců vykazují sníženou citlivost vůči působení insulinu. Tento typ diabetu zpravidla postihuje starší pacienty.(54)

Mezi výše zmíněnými 300 geny existuje 19 genů, které mají výluční postavení, a změny v nich dávají vzniknout diabetu samy o sobě. Mutace v těchto genech způsobují takzvaný monogenní diabetes mellitus.(54)

1.7.2. Monogenní diabetes mellitus

Mutace v každém z výsádních devatenácti genů způsobuje trochu jinou formu nemoci. Mutace mohou být heterozygotní, kdy je postižena jen jedna kopie genu nebo homozygotní, kdy jsou mutovány obě kopie.

Změny v insulinovém genu spočívají v záměně některé aminokyseliny v peptidovém řetězci prvního produktu translace mRNA pro lidský insulin, kterým je 110-aminokyselinový preproinsulin (obr.7, str.20). Míra ovlivnění procesů, při nichž vzniká z preproinsulinu insulin, záleží na pozici zaměněné aminokyseliny v peptidovém řetězci stejně jako na jejích vlastnostech. Mutace identifikované v signální sekvenci preproinsulinu zhoršují funkci této domény, uplatňující se hlavně v přenosu vznikající molekuly do lumen ER. Zhorší se prostupnost molekuly membránou nebo se signální sekvence nemusí od proinsulinu oddělit.

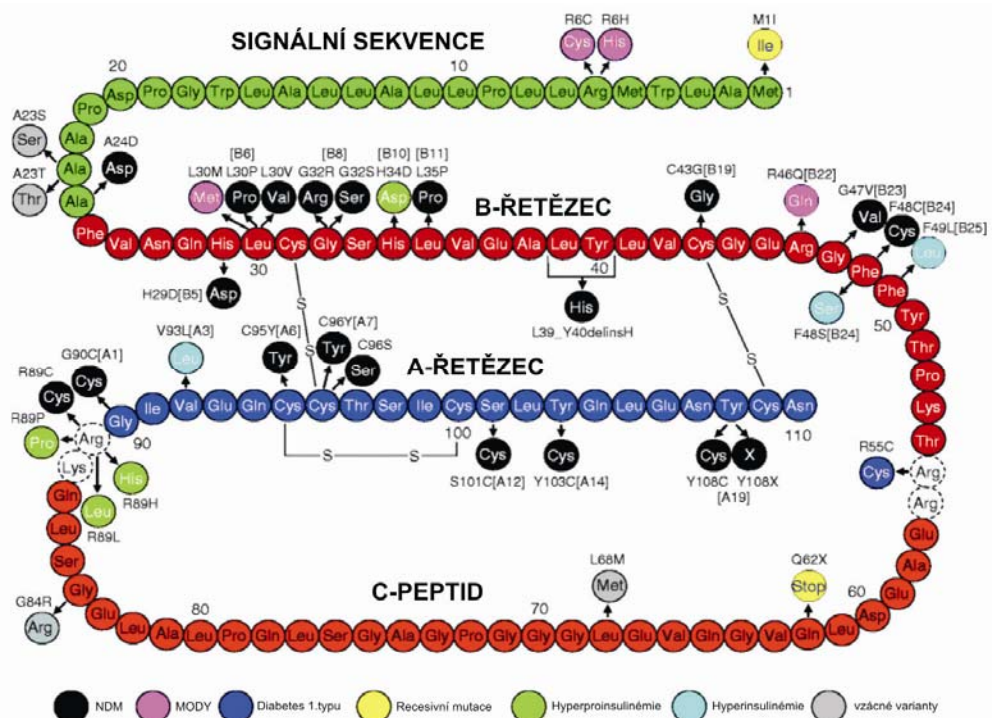
Dopad genetické změny v proinsulinu více než kde jinde závisí na místě modifikace. Zohledňuje vlastnosti a význam, vzhledem k terciální struktuře či interakci insulinu s receptorem, původní a nahrazující aminokyseliny. Od tohoto faktu se odvíjí závažnost a typ projeveného diabetu. Obecně oblasti budoucího A- a B-řetězce jsou silně evolučně konzervované a jakákoliv záměna v nich vede k větším či menším komplikacím ve správném „sbalení“ do terciální struktury či zhoršení interakce insulin–insulinový receptor. Mezi nejzásadnější aminokyseliny patří cysteiny, které zprostředkovávají intramolekulární a intermolekulární kovalentní disulfidické vazby. Snížení či zvýšení počtu přítomných cysteinů, popřípadě záměna pozice oproti nativnímu stavu vede k neschopnosti molekuly vytvořit správnou terciální strukturu.(55)

Monogenního diabetu je více typů, přičemž naprostá většina se rozděluje do dvou

hlavních kategorií - neonatální diabetes, označován jako NDM, a diabetes MODY (z anglického maturity-onset diabetes of the young).

Neonatální diabetes způsobují mutace v genech důležitých pro vývoj slinivky, faktorech ovlivňujících apoptózu β -buněk či zásadní mutace ve faktorech, ovlivňujících tvorbu a zpracování insulinu. Příčinami diabetu MODY jsou mutace v jaderných transkripčních faktorech či změny v genu, kódujícím glukokinázu. (56,57,58,59) MODY i neonatální diabetes může navíc způsobit mutace v insulinovém genu (obr.7).

Genetické odchylky se přenášejí z generace na generaci. V rodině pacienta s monogenním diabetem lze často nalézt jedince, kteří měli podobnou formu diabetu.



Obr. 7.: Znárodnění primární struktury molekuly preproinsulinu. Na částech řetězce jsou znázorněny patogenní mutace, vedoucí k jednotlivým typům diabetu. Upraveno podle (69).

1.7.2.1. Neonatální diabetes

Jedná se o diabetes, který se projeví během prvních 6 měsíců maximálně do jednoho roku života. Může jít o přechodnou formu, označovanou jako TNDM

(z anglického transient neonatal diabetes mellitus), jež během několika týdnů či měsíců odezní nebo o mnohem závažnější formu, označovanou jako PNDM (z anglického permanent neonatal diabetes mellitus), a postižený jedinec je od doby diagnózy plně závislý na léčbě.(60) I když, jak už bylo zmíněno, se diabetes projeví v neonatálním období, existují i rozdíly ve věku, kdy nemoc propukne mezi nositeli stejné genetické vady a dokonce mezi členy jedné rodiny. To dává prostor dalším - genetickým i negenetickým faktorům, hrajícím určitou roli ve vzniku a průběhu nemoci.(61)

1.7.2.2. Diabetes dospělého typu, projevující se u mládeže, MODY

Onemocnění MODY se vyznačuje typickými rysy. Diabetes se projeví během dospívání či rané dospělosti před 25. rokem života. Projev nemoci není spojen s obezitou. V historii rodiny se vyskytuje alespoň jeden jedinec, u kterého byla diagnostikována stejná forma diabetu. Diabetes není ketotický a u většiny pacientů lze i po delší době od projevu diabetu detekovat zbytkovou funkci β -buněk, která se stanovuje na základě přítomnosti C-peptidu v krevním oběhu. C-peptid je při sekreci insulinu vylučován v ekvimolárním množství jako insulin.(62,63,64,65)

MODY diabetes, jak bylo již výše uvedeno, je způsoben změnami v genu kódujícím glukokinázu, v genech kódujících jaderné transkripční faktory exprese insulinu či proteinů, podílejících se na transportu a metabolismu glukózy, a v neposlední řadě změny v insulinovém genu. Mutace genu u MODY diabetických pacientů jsou heterozygotní, tudíž postihují jen jednu alelu genu a druhá alela vede k produkci přirozeného insulinu.

Glukokináza je enzym zodpovědný za schopnost β -buněk určovat koncentraci glukózy v krvi. Mutace může mít aktivující i deaktivující účinek. Při aktivující genetické změně se vyplavuje přebytek insulinu a jedinec trpí hypoglykemií. Ve druhém případě, kdy dojde k deaktivující genetické změně, naopak β -buňky vyplavují malé množství insulinu a v krvi je neustále zvýšená koncentrace glukózy, hyperglykémie.(66) Ke snížené schopnosti nebo neschopnosti regulace hladiny glukózy v krvi vedou i změny v genech kódujících jaderné transkripční faktory.

1.8. Stres endoplasmatického retikula

Endoplasmatické retikulum je membránová organela podílející se na biosyntéze asi jedné třetiny proteinů produkovaných buňkou. V ER se proteiny „balí“ do své nativní konformace a dochází k některým posttranslačním modifikacím. Správnému „balení“ proteinů pomáhají proteiny označované jako „chaperony“. Správně „sbalené“ proteiny jsou transportovány a dále zpracovávány v Golgiho aparátu.

Špatně sbalené proteiny a peptidy zůstávají uvnitř ER a svojí dlouhodobou akumulací mohou způsobovat stres ER. Při naplnění ER chybně „sbalenými“ proteiny dojde k utlumení translace mRNA. Spouštějí se stresové signalizační dráhy označované jako UPR (z anglického unfolded protein response), které skrze různé procesy snižují stres ER a zabraňují další akumulaci chybných proteinů. Je-li množství chybných proteinů příliš velké a UPR není schopno stres odbourat, dojde ke spuštění apoptických signálů z endoplasmatického retikula.(67)

Jedna z teorií je, že mutantní molekuly insulínu, které nejsou schopné přejít do správné terciální struktury, se shromažďují v ER, čímž způsobují chronický stres ER vedoucí až k zániku β -buněk. Ztrátou β -buněk přichází organismus o zdroj insulínu a dochází k rozvoji diabetu.

Další poznatky mohou být s touto teorií v rozporu. Některé studie ukázaly, že v době rozvoje nemoci je patrná vysoká tvorba β -buněk a zároveň nedostatečná produkce insulínu.(64) Dále je třeba zmínit, že u několika jedinců byla prokázána funkční jen jedna insulinová alela a přesto se u nich příznaky spojené s diabetem neprojeví.(61)

Otázkou, proč v β -buňkách dochází k zamezení sekrece přirozeného, současně exprimovaného insulínu, se v roce 2010 zabývaly výzkumné týmy univerzit v Michiganu a Ohio. Produkci insulínu bez cysteinových zbytků, neschopného dosáhnout terciální struktury, tzv. DelCys insulínu, bylo prokázáno, že vyvolaný stres ER není schopen dostatečně snížit produkci přirozeného insulínu.(69) Uvnitř ER během přechodu molekuly do správné konformace dochází k reakcím s ostatními sekretovanými molekulami. V případě β -buněk se jedná hlavně o insulín, jehož tvorba výrazně převládá nad ostatními sekretovanými proteiny.(70)

Při tvorbě proteinů se až jedna třetina všech nově syntetizovaných molekul poprvé „sbalí“ nesprávně a musí být „sbalena“ znovu nebo dokonce eliminována.(71) V případě mutantních analogů je dosažení správné terciální struktury ještě ztíženo. Nepochopitelné konce nebo nepárové thiolové skupiny znamenají dostatečné riziko vzniku nežádoucích intermolekulárních interakcí za vzniku abnormálních komplexů.(55)

1.9. Mutantní QB22 - insulin

Mutace v pozici B22 způsobuje lehčí typ diabetu MODY. Byla objevena u dvou rodin, v Norsku a České republice.(63,65) U norského mladíka propukl diabetes ve 20. roce života, z počátku byl léčen jen dietou, poté požíval nízké dávky insulinu a v současnosti je opět léčen pouze dietou. Stejná mutace insulinového genu byla nalezena i u jeho otce, u kterého se diabetes objevil v 18-ti letech. Do 20-ti let byl léčen jen dietou, v současnosti je závislý na malých dávkách insulinu. Posledním nositelem mutace v rodině je teta z otcovy strany, která je stále léčena pouze striktní dietou.(63)

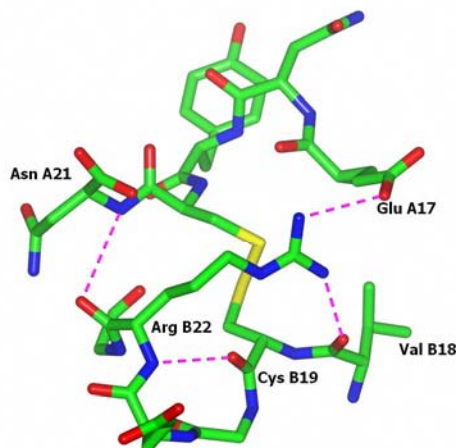
U nás se mutace QB22 vyskytla u 13-ti leté dívky léčené nyní na Pediatrické klinice Fakultní nemocnice v Motole. Dívka je od propuknutí nemoci léčena insulinem. Mutace se potvrdily i u její matky a babičky z matčiny strany. U matky se diabetes rozvinul ve 14-ti letech a stejně jako její dcera je od té doby léčena insulinem. V případě babičky byl diabetes diagnostikován ve 35. roce života. Je léčena orálními antidiabetickými agens či insulinem.(65)

V nativním insulinu je na pozici B22 silně bazický Arg. V mutantu QB22, jak udává název, je arginin nahrazen glutaminem. Analog se vyskytuje pod názvem QB22 či R46Q.

Arginin B22 je jedna z nejdůležitějších aminokyselin, ovlivňujících tvorbu a stabilitu monomerního uspořádání.(72) Arginin (obr.7, str.24) vytváří vodíkové vazby s okolními aminokyselinami AsnA21, CysB19 a ValB18 a dále guanidinylová skupina tvoří solný můstek s karboxylovou skupinou kyseliny glutamové v pozici A17. Tyto vazby se pravděpodobně významně podílejí na stabilizaci terciální struktury insulinové molekuly.(63)

Záměnou bazického argininu za polární glutamin zanikají výše jmenované

interakce, čímž se naruší stabilita molekuly.(73,74)



Obr.7.: Interakce argininu B22 v přirozené molekule insulínu. Nekovalentní interakce jsou vyznačeny růžově. Důležitý je solný můstek vedoucí od guanidinylové skupiny argininu vedoucí ke karboxylu kyseliny glutamové na pozici 17 v A-řetězci. Molekuly dusíku jsou znázorněny modře, molekuly kyslíku červeně, uhlíkový skelet zeleně a disulfidické propojené obou řetězců žlutě. Vytvořeno v programu CCP4MG.

1.10. Příprava insulínu a jeho analogů

1.10.1. Celková chemická syntéza

Počátkem 60. let 20. století se poprvé podařilo výzkumným týmům laboratoří Katsoyannise na Univerzitě v Pittsburgu (75) a H. Zahna na RWTH Aachen Univerzitě v Německu (77) připravit insulín kompletní chemickou syntézou. V 80. letech 20. století došlo k vylepšení metody přípravy peptidů a byl syntetizován insulín a jeho analogy k vědeckým i léčebným účelům.(78)

Celková chemická syntéza má několik fází. Nejprve je nutné připravit zvlášť oba řetězce, A i B. Řetězce se připravují metodou syntézy peptidů na pevné fázi. V syntéze se postupuje od C-konce.(79) C-koncová aminokyselina je svou karboxylovou skupinou připevněna na nerozpustném nosiči, jímž je ve většině případů pryskyřice. K volné aminoskupině se C-koncem připojí následující aminokyselina. Aby nedošlo k nežádoucím reakcím, je nutné aminoskupinu přicházející aminokyseliny chránit chránicí skupinou. K dočasné ochraně α -aminoskupiny se používají acidolabilní skupina *tert*-butyloxykarbonyl

(Boc) nebo bazickolabilní skupina 9-fluorenyl-methyloxykarbonyl (Fmoc).(79,80) Po připojení aminokyseliny je odstraněna N- α -chránící skupina a C-koncem se připojí další aminokyselina v pořadí. K vzájemnému propojení aminokyselin se používají kondenzační činidla - jako je např.: *N*-hydroxybenzotriazol (HOBt), (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU) či různé karbodiimidy. Postupně dojde k syntéze celého řetězce. Obsahují-li postranní řetězce aminokyselin další funkční skupiny, je třeba je chránit příslušnými chránícími skupinami a zabránit tak nežádoucím reakcím.

Po syntéze celého řetězce je peptid odštěpen z nosiče a následně či obvykle zároveň jsou odstraněny chránící skupiny postranních řetězců. Klíčovým krokem syntézy je správné propojení obou řetězců a vznik žádaných disulfidických můstků. V naší studii jsme použili oxidační rekombinaci dle Chance et al. (81) využívající přirozené schopnosti insulinu formovat se do správné terciální struktury a kdy se řetězce připravují a dále se s nimi pracuje ve formě S-sulfonátů, jež jsou stálé vůči oxidaci a nehrozí nežádoucí reakce. Oba řetězce jsou smíchány a jejich S-sulfonátové skupiny jsou stechiometricky redukovány na volné SH-skupiny dithiotreitem. Po redukci následuje pozvolná oxidace vzdušným kyslíkem za spontánní tvorby disulfidických můstků. Touto metodou lze dosáhnout až 60% výtěžku.(15) Největší předností celkové chemické syntézy insulinu a jeho analogů je, že lze do peptidového řetězce začlenit nekódovanou či pozměněnou aminokyselinu.

1.10.2. Biosyntéza metodami genového inženýrství

Biosyntéza metodou genového inženýrství spočívá ve vložení uměle vyrobeného plazmidu s genetickým kódem do mikroorganismu, kde je gen exprimován. Jako mikroorganismus se nejčastěji používají bakterie *E. coli* nebo kvasinky *S. cerevisiae*. Metoda je používána zejména pro průmyslovou přípravu lidského insulinu.(83)

Pomocí genového inženýrství je možné připravit i některé analogy insulinu, ale k záměněm v jejich řetězci lze použít jen přirozené, kódované aminokyseliny. (84,85)

2. CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce byla syntéza a charakterizace insulinového analogu QB22-insulinu, jakožto mutantu přirozeně se vyskytujícího u diabetických pacientů.

1. Příprava analogu QB22-insulinu celkovou chemickou syntézou
2. Zjištění vazebné afinity QB22-insulinu k insulinovému receptoru *in vitro*.
3. Zjištění biologické aktivity QB22-insulinu *in vivo* - za využití myších modelů.

3. MATERIÁL

acetonitril (ACN) - Scharlau Chemie, Sentmenat, Španělsko
hovězí sérový albumin (BSA) - Invitrogen, Carlsbad, California, USA
diethylether - Penta, Chrudim, ČR
N,N-dimethylformamid (DMF) - Fluka, Buchs, Švýcarsko
dithiotreitol (DTT) - Thermo Scientific, Rockford, USA
ethandithiol (EDT) - Fluka, Buchs, Švýcarsko
fenol - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
9-fluorenyl-methoxykarbonyl (Fmoc)-chráněné aminokyseliny - Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko
glukóza - Sigma, St. Louis, USA
glycin - Sigma, St. Louis, USA
guanidinhydrochlorid (GuaHCl) - Sigma, St. Louis, USA
kyselina chlorovodíková (HCl) - Penta, Chrudim, ČR
2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU) - Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyethansulfonová kyselina (HEPES) - Sigma, St. Louis, USA
hydrogenuhlíčan amonný - Sigma, St. Louis, USA
hydroxid sodný - Penta, Chrudim, ČR
chlorid draselný - Sigma, St. Louis, USA
chlorid sodný - Penta, Chrudim, ČR
kyselina octová 99% - Penta, Chrudim, ČR
lidský insulin - Sigma, St. Louis, USA
myši C57BL, AnLab, Praha, ČR
mono-¹²⁵I-A14-lidský insulin - Perkin Elmer, Waltham, USA
octan sodný - Lachema, Neratovice, ČR
Sephadex G10, Sephadex G50 - Pharmacia, Uppsala, Švédsko
siřičitan sodný - Sigma, St. Louis, USA
síran hořečnatý - Fluka, Buchs, Švýcarsko
tetrathionan sodný - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
trifluoroctová kyselina (TFA) - Fluka, Buchs, Švýcarsko
thioanizol - Fluka, Buchs, Švýcarsko
triisopropylsilan (TIS) - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) - Sigma, St. Louis, USA
Wangova pryskyřice - Fmoc-Thr/Asn(tBu) - Wang resin, Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko

4. METODY

4.1. Příprava A-řetězce a QB22-B-řetězce lidského insulinu

Oba řetězce byly připraveny v servisním pracovišti Syntéza peptidů ÚOCHB AV ČR za pomoci automatizovaného syntetizátoru ABI 433A od firmy Applied Biosystems. Příprava byla provedena syntézou na pevné fázi podle Merrielfielda.(79) Na chránění α -aminoskupin byla použita chránicí skupina 9-fluorenyl-methoxykarbonyl (Fmoc), která se odštěpuje v bazickém prostředí. K ochraně funkčních skupin postranních řetězců byly použity skupiny Boc, tBu a Trt, odštěpující se v kyselém prostředí. Jako pevná fáze byla použita komerčně předem substituovaná Wangova pryskyřice. Pro syntézu A-řetězce to byl asparagin a pro syntézu QB22-B-řetězce to byl threonin. Syntéza byla provedena v měřítku 0,1 mmol.

Délka jednoho cyklu trvala 30 min a každý cyklus byl 1- až 2-krát opakován. V každém cyklu byl přidán 10-ti násobek potřebného množství dané N-chráněné aminokyseliny. Jako kondenzační činidla byly použity HBTU, HOBt a Dipea v dimethylformamidu (DMF).

Po dokončení syntézy byla pryskyřice s navázaným peptidem promyta a vysušena dichlormethanem (DCM).

4.2. Štěpení řetězců z pevné fáze a konverze na S-sulfonáty

K odštěpení řetězců z pevné fáze - pryskyřice byla použita směs připravená smícháním 21 ml kyseliny trifluoroctové (TFA), 0,75 ml H₂O, 0,75 ml thianizolu, 0,375 ml ethandithiolu (EDT), 0,75 g fenolu a 0,15 ml triisopropylsilanu (TIS) na 100 μ mol peptidu. Do směsi byl přidán příslušný řetězec připojený k pryskyřici a společně byla směs 2 hodiny míchána za pokojové teploty. Poté byl roztok zfiltrován (přes fritu velikosti S3) do 200 ml vychlazeného diethyletheru. Směs byla po celou dobu chlazena v ledové lázni. V roztoku diethyletheru vznikla sraženina peptidu, která byla přefiltrována (frita velikosti S4), propláchnuta větším množstvím studeného diethyletheru a následně vysušena.

Volné SH-skupiny cysteinů byly převedeny na S-sulfonáty použitím sulfitolyzačního pufru, který se skládal z 100 mM Tris, 250 mM siřičitanu sodného, 80 mM tetrathionanu sodného a 7 M guanidinu hydrochloridu (GuaHCl). Hodnota pH byla upravena na 8,6. Sraženina peptidu byla rozpuštěna ve 25 ml pufru. Směs byla ponechána stát 3 hodiny při pokojové teplotě za stálého míchání.

4.3. Gelová chromatografie

Peptidové řetězce byly přečištěny na chromatografické koloně Sephadex G10 o celkovém objemu 1000 ml. Gelová chromatografie probíhala při laboratorní teplotě a stálého tlaku a průtoku (0,7 ml/min) zaručeného peristaltickou pumpou Gilson Minipuls 3. Jako mobilní fáze byl použit 50 mM hydrogenuhličitan amonný. Frakce byly jímány automatickým sběračem v 15-ti minutových intervalech. Po skončení chromatografie byla proměřena absorbance jednotlivých frakcí pomocí spektrometru Lambda 25 od firmy Perkin Elmer při vlnové délce 276 nm.

Frakce obsahující peptidový řetězec byly spojeny, zmrazeny a lyofilizovány. Lyofylizáty byly rozpuštěny v 50% acetonitrilu (ACN) v 0,1% TFA v deionizované vodě a přečištěny pomocí preparativního provedení RP – HPLC.

4.4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC).

Vysokotlaká kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) byla prováděna na přístrojích společnosti Watrex - čerpadlo Watrex 600, UV/VIS detektor Waters 2487. Data byla zpracovávána chromatografickým programem Clarity Lite společnosti Data Apex.

4.4.1. Využití HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC) k analytickému stanovení reakční směsi

Pro analýzu reakční směsi a stanovení čistoty jednotlivých řetězců či výsledné molekuly analytickým provedením RP-HPLC byla použita analytická kolona Nucleosil

120-5-C18 o rozměrech 250 x 4 mm společnosti Watrex. Gradientová eluce s průtokem 1 ml/min (Tab.1, str.30) byla prováděna v roztoku se stoupající koncentrací ACN v deionizované vodě obsahující 0,1 % TFA. Absorbance eluátu byla měřena při vlnových délkách 218 a 276 nm.

4.4.2. Využití RP-HPLC k preparaci vzorku

Po primárním přečištění peptidů gelovou chromatografií, při kterém došlo k oddělení nízkomolekulárních nečistot, především solí, byly oba řetězce a následně i syntetizovaný analog insulinu purifikovány pomocí RP-HPLC. K čištění byly použity preparativní kolony Nucleosil 120-5-C18 společnosti Watrex. Preparace peptidů byla prováděna na koloně o rozměrech 250 x 21 mm za průtoku 9 ml/min. Preparace syntetizovaného analogu proběhla na koloně o rozměrech 250 x 8 mm za průtoku 3 ml/min. Směs byla eluována roztokem o gradientu (Tab.1) stoupající koncentrace ACN v roztoku deionizované vody s obsahem 0,1% TFA za současného měření absorbance při 218 a 276 nm.

Tab.1. Gradientová eluce použité při RP-HPLC. Gradient 1 byl použit pro analytické provedení a při preparaci výsledného analogu. Gradient 2 byl použit pro preparaci jednotlivých řetězců.

Gradient 1							
čas [min]	0	1	21	35	36	37	37,1
φ ACN [% (v/v)]	8	28	36	44	72	72	8
Gradient 2							
čas [min]	0		30		31		
φ ACN [% (v/v)]	8		80		8		

4.5. Hmotnostní spektrometrie

Identifikace jednotlivých řetězců insulinu, A i B, a identifikace výsledného produktu QB22-insulinu byla provedena hmotnostní spektrometrií v Laboratoři hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR za použití přístroje LTQ Orbitrap XL společnosti Thermo

Fisher Scientific. Hybridní hmotnostní spektrometr využívá metod lineární iontové pasti a orbitrapu (elektrostatická past) spolu s využitím Fourierovy transformace.

4.6. Rekombinace řetězců

Při rekombinační reakci dojde ke spojení A- a B-řetězce, mezi nimiž se vytvoří disulfidické můstky, dva mezi oběma řetězci a třetí mezi dvěma cysteiny na A-řetězci. Reakce je rozdělena do dvou fází. V první fázi, redukční, dojde takřka ke stechiometrické redukci S-sulfonátových skupin na cysteinů na volné SH-skupiny. Ve druhé fázi, oxidační, jsou SH-skupiny pomalu oxidovány vzdušným kyslíkem a dochází ke spontánnímu propojení cysteinylových zbytků za vzniku disulfidických můstků.

4.6.1. Redukční fáze

30 mg řetězce A a 15 mg řetězce QB22 bylo rozpuštěno, každý řetězec zvlášť, v 1 ml 0,1M odzdušněném Gly/NaOH pufru o pH 10,5. Spektrometrem Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) při 280 nm (pro řetězec A: $\epsilon_A=3480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, pro řetězec B: $\epsilon_B=3230 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) byla stanovena přesná koncentrace jednotlivých řetězců. Následně byly řetězce smíchány a doplněny odzdušněným pufrem do celkového objemu 3 ml. Dle přesné koncentrace bylo vypočteno potřebné molární množství dithiotreitolu (DTT) tak, aby odpovídalo 1,1 ekvivalentu přítomných S-sulfonátových skupin a přidáno v minimálním množství pufru (asi 30 μl). Reakční směs byla ponechána 45 min míchat za pokojové teploty a bez přístupu vzduchu.

4.6.2. Oxidační fáze

Byly stanoveny optimální parametry reakce: provzdušněný Gly/NaOH pufr : odzdušněný Gly/NaOH pufr = 3:2 a molární množství obou řetězců v μmolech : celkový objem reakce v ml, což činí 1,4.

Redukční fáze byla ukončena přidáním potřebného množství provzdušněného Gly/NaOH pufru o pH 10,5. Reakční směs byla ponechána míchat při teplotě 5°C, za přístupu vzduchu po dobu 3 dnů.

Oxidační fáze byla zastavena přidáním 3,5 ml 99% kyseliny octové. Následně byla směs nanesena na chromatografickou kolonu Sephadex G50 medium o celkovém objemu 500 ml. Mobilní fází byla 1M kyselina octová o průtoku 0,5 ml/min a stálého tlaku zajištěného peristaltickou pumpou Gilson Minipuls 3. Separace probíhala za laboratorní teploty. Frakce byly jímány automatickým sběračem v intervalu 12 min.

Po skončení rozdělení byla proměřena absorbance jednotlivých frakcí na spektrometru (Lambda 25, Perkin Elmer) při vlnové délce 276 nm. Frakce s potenciální přítomností QB22-insulinu byly spojeny a lyofilizovány. Lyofilizát byl rozpuštěn v roztoku obsahujícím asi 50% (V/V) acetonitrilu v 1% (V/V) roztoku TFA v deionizované vodě. Analytickým provedením RP-HPLC byla analyzována přítomnost analogu QB22-insulinu. Použitím RP-HPLC semipreparativní kolonou byl analog izolován a jeho identita ověřena pomocí MS.

4.7. Vazebné testy analogu vůči insulinovému receptoru *in vitro*

4.7.1. Příprava buněk pro vazebné testy

K vazebným testům byla použita buněčná linie lidských lymfocytů IM-9 s vysokou mírou exprese insulinových receptorů. Buněčná linie byla pěstována dle pokynů dodavatele ATCC (Manassas, USA; LGC Standards, Poland). Buňky rostly při teplotě 37°C ve zvlhčené atmosféře se zvýšeným obsahem CO₂ (5%) v mediu RPMI-1640, které obsahuje 10% fetálního hovězího séra, 100 U/ml penicilinu či streptomycinu a 2mM Gln. Použité chemikálie byly od společnosti Invitrogen (Carlsbad, California, USA). Buňky byly třikrát týdně „pasážovány“. Vypěstované buňky byly spočítány a ředěny na koncentraci 2 milióny/ml.

4.7.2. Příprava roztoku lidského insulinu a QB22-insulinu

Zásobní roztoky insulinu a analogů byly připraveny v 0,1% kyselině octové. Koncentrace byly určeny za použití měření absorbance při 280 nm a extinkčních koeficientů ($\epsilon_{280} = 5840 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) pro lidský insulin i pro QB22-insulin. Ředěním vazebným pufrům (složení viz níže) byly následně připraveny roztoky o klesající koncentraci testovaného QB22 - insulinu.

4.7.3. Testování vazebné afinity insulinového analogu vůči receptoru *in vitro*

Testování vazebné afinity analogu vůči insulinovému receptoru probíhá jako kompetice mezi QB22-insulinem a lidským insulinem ve vazbě na insulinový receptor. Insulin je značen radioaktivním ^{125}I ($\tau = 60$ dní) na tyrosinu A14. Testování probíhá za konstantního množství značeného insulinu i buněk IM-9. V jednotlivých vzorcích je vždy rostoucí koncentrace testovaného analogu. Testování bylo provedeno metodou dle De Meytse (87).

Reakční směs byla tvořena buňkami o koncentraci 2 miliony/ml a roztokem vždy s rostoucí koncentrací insulinu popřípadě insulinového analogu a konstantní koncentrací ^{125}I lidského insulinu. Reakce probíhala ve vazebném pufru, jehož složení bylo následující: 100mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM KCl, 1,3mM MgSO_4 , 1mM EDTA, 10mM glukóza, 15mM octan sodný a 1% BSA v celkovém reakčním objemu 500 μl a pH 7,6. Reakce probíhala při teplotě 15°C po dobu 2 hod a 30 min, přičemž každých 30 min byla směs promíchána.

Po uplynutí reakční doby se z každé reakční zkumavky s danou koncentrací insulinu či QB22-insulinu vytvořily duplikáty o objemu 200 μl . Reakce byla zastavena přidáním 200 μl vazebného pufru o teplotě 4°C ke každému z duplikátů. Směs byla centrifugována při 15 000 $\times g$ po dobu 10 min a při teplotě 4°C. Poté byl odsán supernatant a měřena radioaktivita pelety pomocí γ -počítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, USA). Doba měření 1 zkumavky byla 10 minut. Vazebná data se analyzovala programem GraphPad Prism 5,0 metodou analýzy podle modelu vazby jednoho vazebného místa (z anglického one-site fitting model). Dále byla určena hodnota disociační konstanty (K_d) analogu QB22-insulinu vůči receptoru. Použitá koncentrace ^{125}I -radioaktivně značeného insulinu byla 0,01 nM (20000 cpm). Jako K_d ^{125}I -značeného insulinu vůči receptoru bylo použita hodnota 0,3nM.(42)

4.8. Testování aktivity insulinového analogu QB22-insulinu *in vivo*

Na skupině myších samců (kmen C57BL, AnLab Praha) byla testována účinnost QB22-insulinu oproti účinnosti insulinu a kontrolní skupině, již byl místo insulinu podán

fyzilogický roztok. Test byl proveden dle protokolu "Insulin Tolerance Test" provedeném na univerzitě ve Virginii v rámci projektu "Animal Characterization Core". Testování je založeno na protokolu popsáném v časopise Cell 88, ročník 1997 str. 561-572.

K testování byli použiti samci myši kmene C57BL. Myši byly chovány ve zvířetníku ÚMG AVČR, měly volný přístup k potravě (St-1, Mlýn Kocanda, Jesenice, ČR) a vodě a režimu 12h světlo, 12h tma. Protokol pokusu odpovídal zákonu o ochraně zvířat č.246/1992 Sb.). Do pokusu byly použity myši ve věku 2,5 měsíce (hmotnost 23-29 g). Byly vytvořeny tři skupiny, každá o deseti myších. První skupině byl subkutánně (sc) aplikován roztok QB22-insulinu o koncentraci 4,5 nmol na kilogram hmotnosti zvířete, což odpovídá dávce 0,75 U insulinu/kg. Druhé skupině byl sc aplikován roztok lidského insulinu o stejné koncentraci (4,5 nmol/kg = 0,75 U insulinu/kg). Testované látky (insulin, QB22-insulin) byly rozpuštěny ve směsi fyziologického roztoku a 0,1% kyseliny octové v poměru 1:15. Třetí skupina byla kontrolní a byl jí sc aplikován fyziologický roztok.

Tři dny před experimentem byla všechna zvířata rozdělena do samostatných klecí a následující den ráno, 6 hodin před testováním, jim byla odebrána strava. V poledne následujícího dne, t.j. 6 hodin po začátku hladovění, začalo testování. Před aplikací byla každému zvířeti odstřižena špička ocasu a glukometrem (Arkray, Kyoto, Japonsko) změřena hladina glukosy v krvi (v čase 0). Poté byla každému jedinci podkožně (subkutánně) aplikována dávka 0,119 nmol (počítáno na průměrnou hmotnost zvířete 26,5 g) insulinu, QB22-insulinu či fyziologického roztoku. Hladina glukózy v krvi byla měřena v časech t=15, 30, 45, 60, 90, 120 a 150 min od aplikace. Měření bylo opakováno stejným způsobem po 14-ti denní pauze, přičemž testovaná zvířata byla rozdělena tak, aby žádnému nebyla aplikována stejná látka jako v minulém testování. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány programem GraphPad Prizm 5.0 a jsou uvedeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru (SEM).

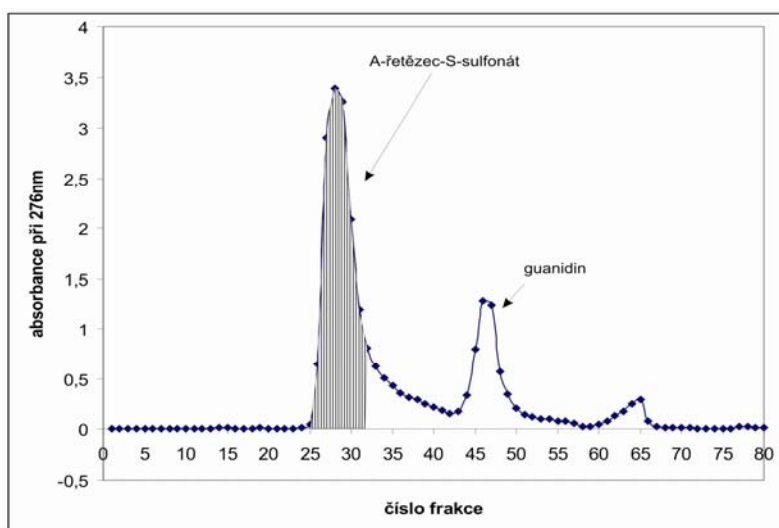
5. VÝSLEDKY

5.1. Příprava S-sulfonátu A-řetězce a S-sulfonátu QB22-B-řetězce

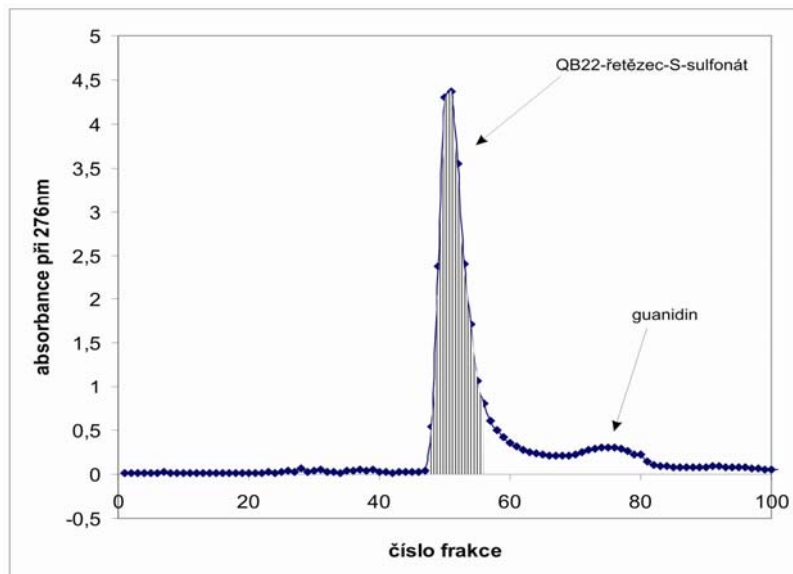
Oba řetězce byly po syntéze na pevné fázi nejprve odštěpeny z pryskyřice a sulfitylozačním puftrem převedeny na S-sulfonáty.

5.1.1. Purifikace a identifikace řetězců

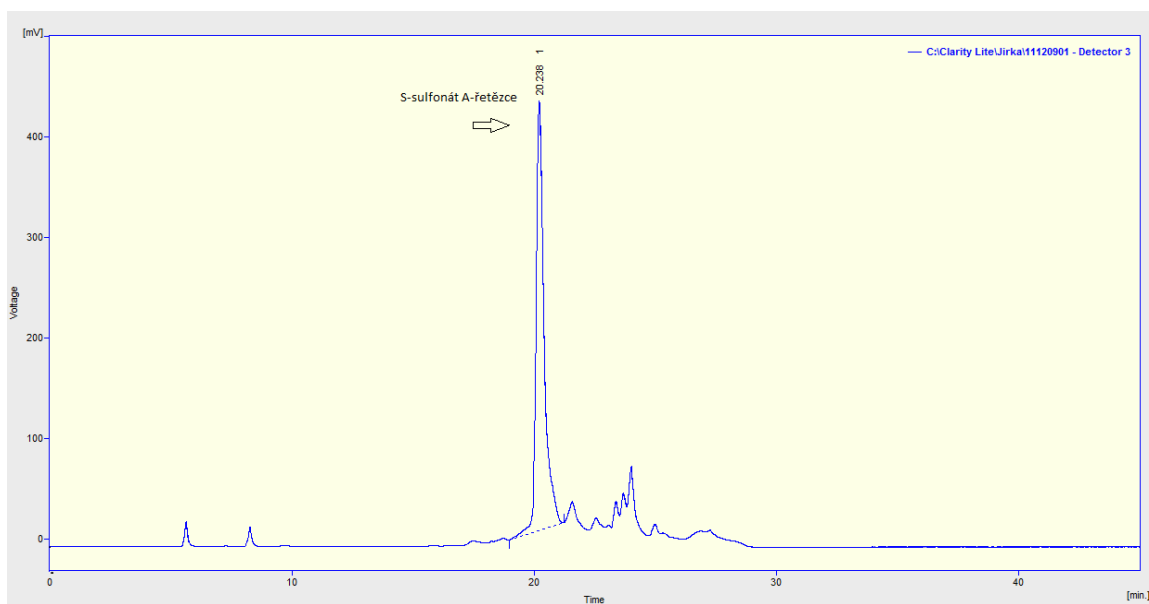
Směs řetězce byla po odštěpení z pryskyřice přečištěna gelovou chromatografií na koloně Sephadex G10 za podmínek popsanych v kapitole 4.3. Eluční profil S-sulfonátu A-řetězce po gelové chromatografii je znázorněn na obr. 9. Eluční profil S-sulfonátu QB22-řetězce je znázorněn na obr. 10. Frakce obsahující příslušný řetězec (v elučních profilech znázorněno šrafováním) byly spojeny, lyofilizovány a přečištěny pomocí RP-HPLC a následně opětovně lyofilizovány. Přečištění pomocí RP-HPLC probíhalo za podmínek popsanych v kapitole 4.4.2. (viz obr.11.,12., str.36,37). Čistota obou řetězců byla ověřena analytickým provedením RP-HPLC, což bylo popsáno v kapitole 4.4.1. Identifikace obou řetězců byla provedena hmotnostní spektrometrií. (obr.13.,14.,str.37,38)



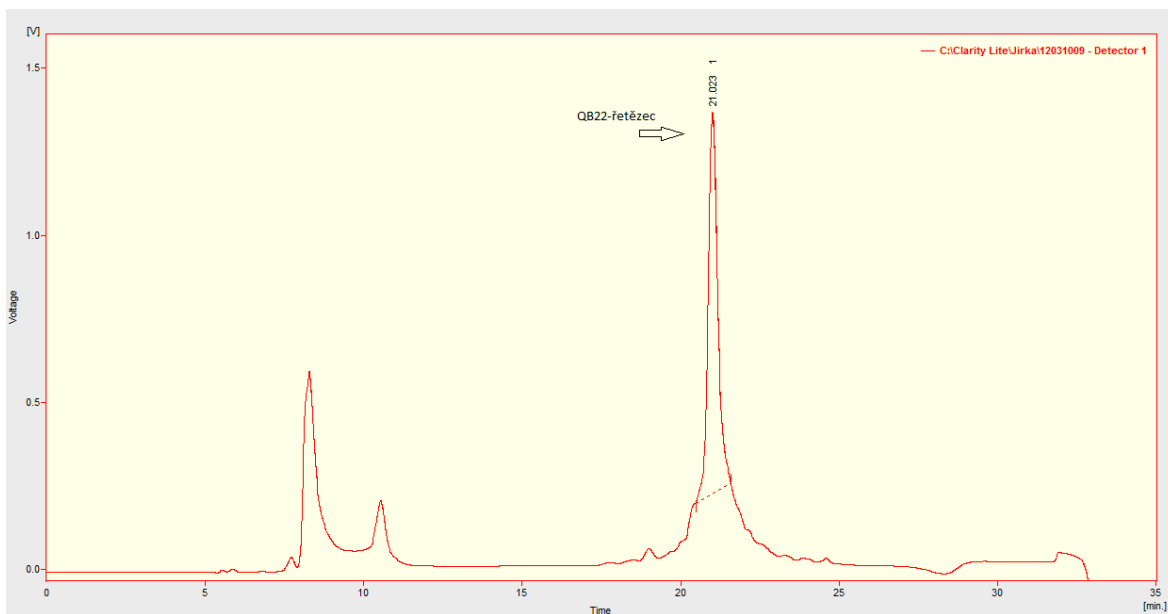
Obr.9. Odsolení S-sulfonátu A- řetězce na koloně Sephadex G10. Eluce byla provedena 50 mM NH₄HCO₃. Frakce 24- 31 obsahovaly čistý A-řetězec. V grafu jsou frakce obsahující A-řetězec vyšrafovány.



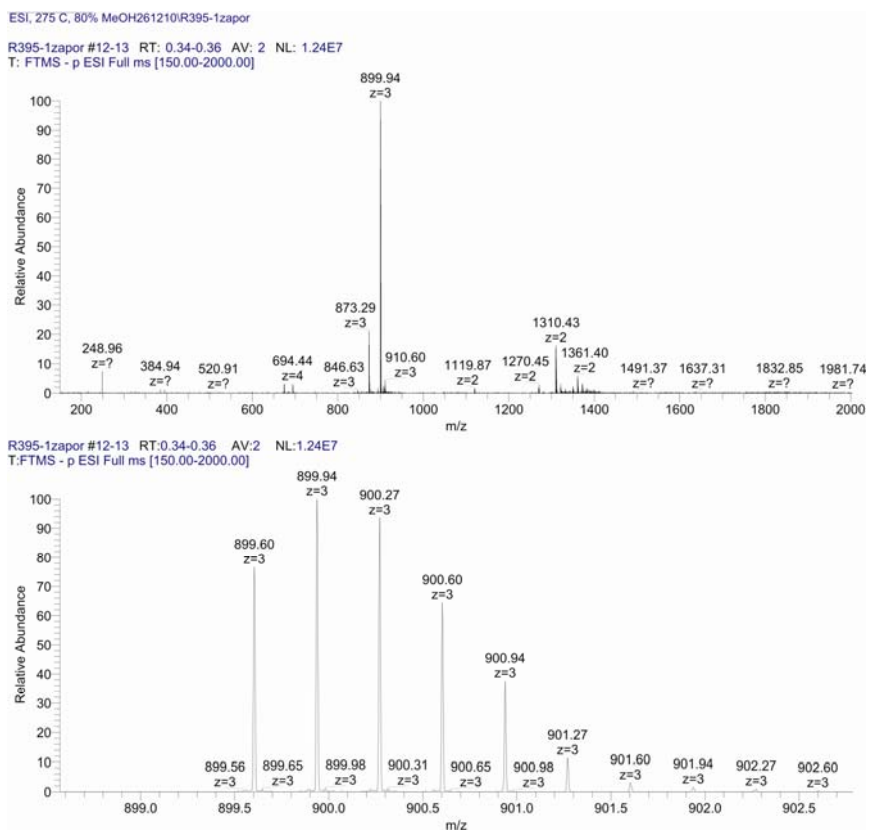
Obr.10.: Odsolení S-sulfonátu-QB22-řetězce na koloně Sephadex G10. Eluce byla provedena 50mM NH_4HCO_3 . Frakce 48-58 obsahovaly QB22-řetězec. Pík obsahující QB22-řetězec je vyšrafován.



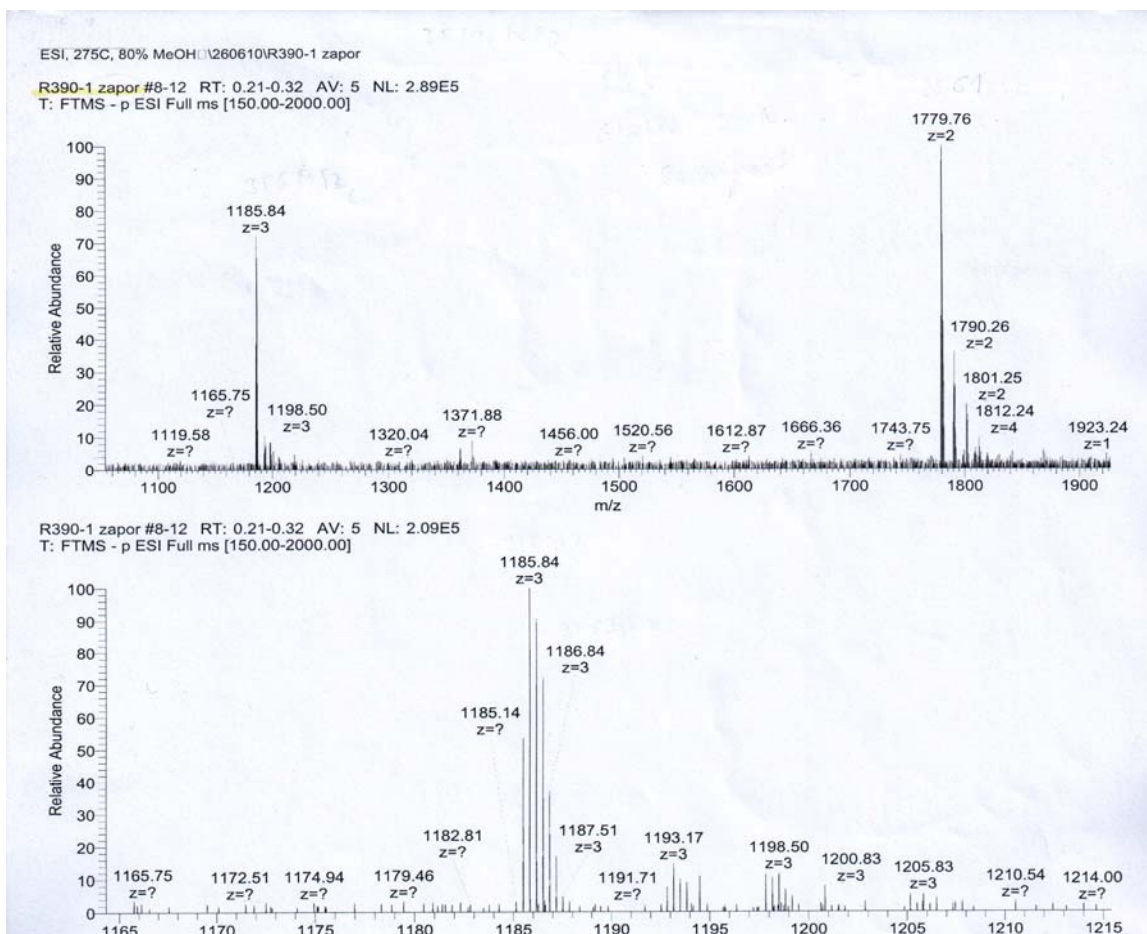
Obr. 11.: Chromatografický záznam RP-HPLC přečištění A-řetězce-S-sulfonátu pomocí RP-HPLC. Pík s retenčním časem 20,238 minut byl ručně sbírán.



Obr. 12.: Chromatografický záznam RP-HPLC přečištění QB22-řetězce-S-sulfonátu pomocí RP-HPLC. Pík s retenčním časem 21,023 minut byl ručně sbírán.



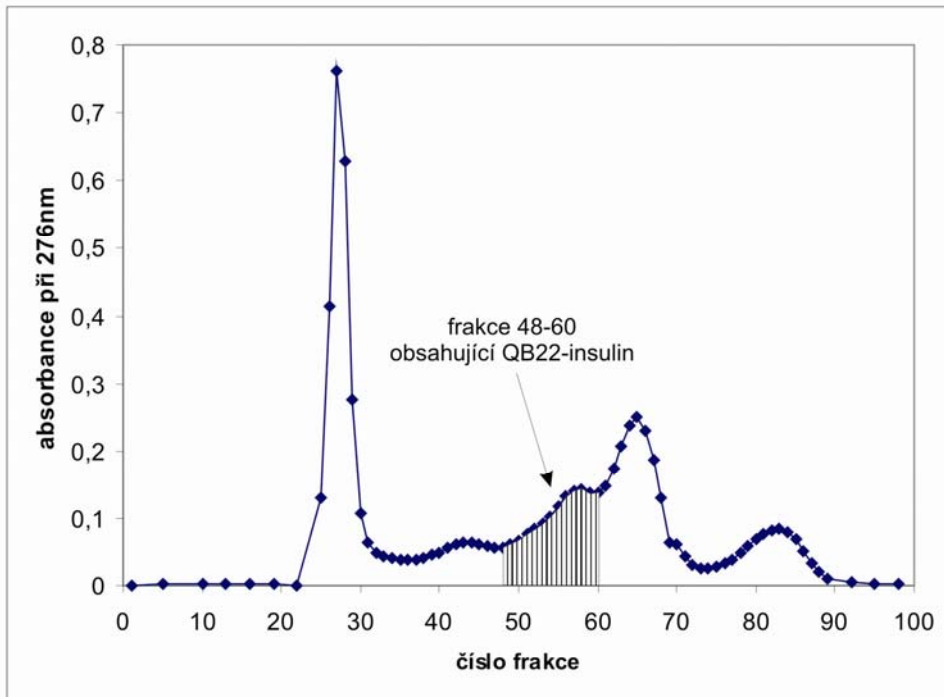
Obr. 13.: Hmotnostní spektrum S-sulfonátu A řetězce v negativním režimu. Naměřená Mr je 2701,8 a monoizotopická vypočtená Mr je 2701,8273.



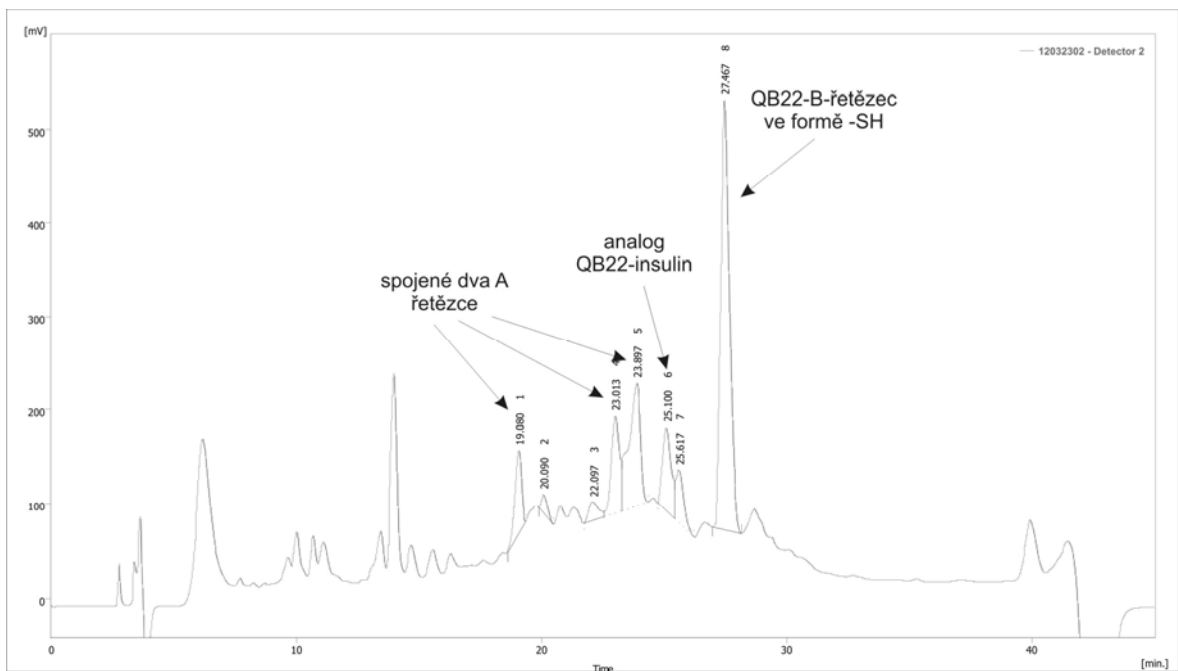
Obr. 14.: Hmotnostní spektra QB22-B-řetězce v negativním režimu. Zjištěná hodnota M_r je 3558,42 a monoizotopická vypočtená M_r je 3559,5382.

5.2. Rekombinace řetězců

Spojením čistého S-sulfonátu A-řetězce s S-sulfonátem QB22-B-řetězce, za podmínek popsanych v kapitole 4.6., došlo samovolně ke správnému propojení obou řetězců a vzniku molekuly QB22-insulinu. Po skončení rekombinace byla směs nanesena na kolonu Sephadex G50 (viz kapitola 4.6.2.), Eluční profil QB22-insulinu po purifikaci na gelové chromatografii je znázorněn na obr. 15., přičemž frakce, obsahující QB22-insulin, jsou vyšrafovány. Na obr. 16. je znázorněn profil chromatografického dělení QB22-insulinu po odsolení gelovou chromatografií a obr. 17. na str. 40 ukazuje konečnou identifikaci výsledného produktu hmotnostní spektrometrií.

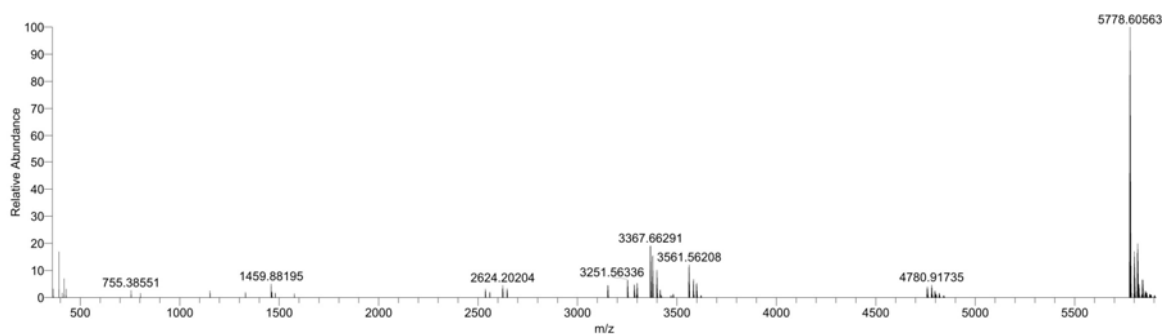


Obr.15.: Eluční profil po rekombinaci A-řetězce a QB22-B-řetězce. Frakce 48-60 obsahovaly výsledný analog, QB22-insulin.

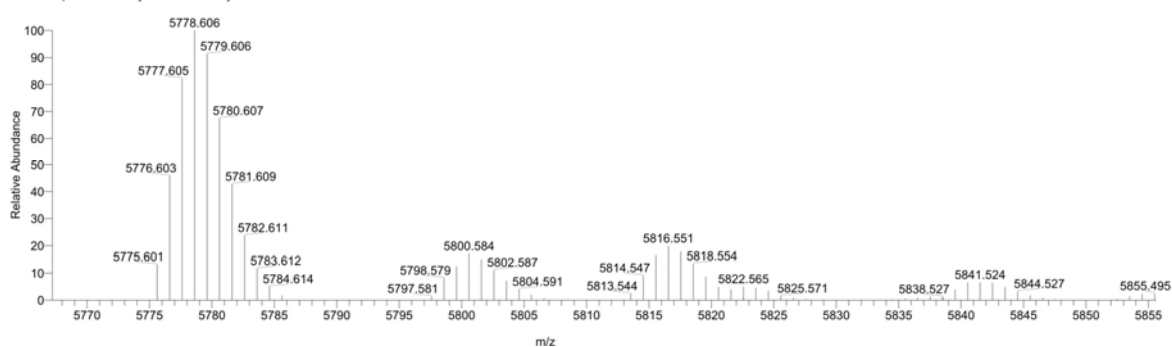


Obr.16.: Chromatografický záznam RP-HPLC spojených frakcí 48-60 získaných gelovou chromatografií. Píky byly ručně sbírány a analyzovány hmotnostní spektrometrií. Pík s retenčním časem 25,1 minut byl výsledný analog QB22-insulin.

R435-III-6_XT_00001_M_#1 RT:1.00 AV:1 NL:8.66E5
T:FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



R435-III-6_XT_00001_M_#1 RT:1.00 AV:1 NL:8.66E5
T:FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]

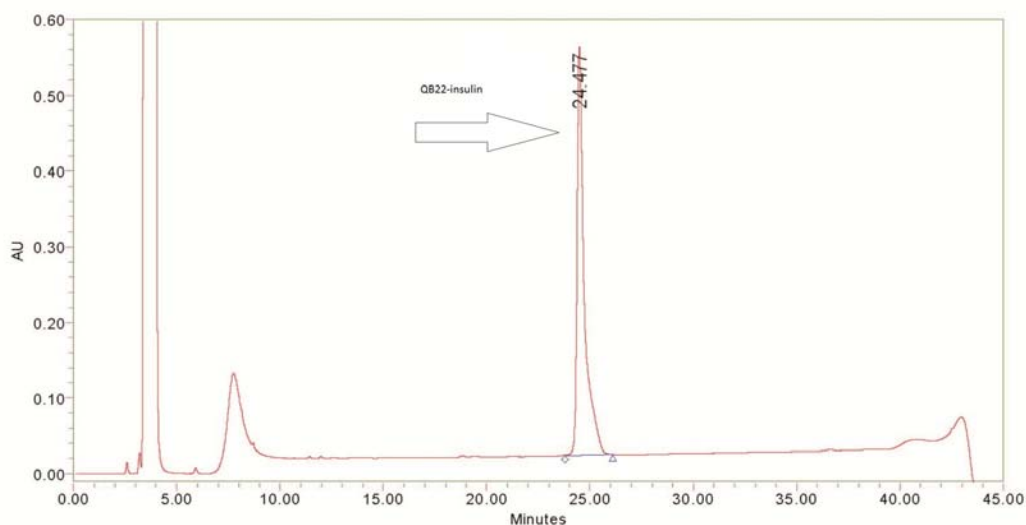


Obr. 17.: Hmotnostní spektra QB22-insulinu. Naměřená Mr je 5775,601 a monoizotopická vypočtená Mr je 5775,595.

5.3. Analýza čistoty a zhodnocení výtěžků QB22-insulinu

Čistota výsledného analogu byla ověřena pomocí analytického provedení RP-HPLC dle kapitoly 4.4.1. 20 μ l vzorku o koncentraci 1 mg/ml bylo nanášeno na kolonu a eluováno gradientem ACN v deionizované vodě obsahující 0,1% TFA (obr.18.,str.41). Z výsledných dat byla zjištěna 95 % čistota analogu insulinu.

Rekombinace byla provedena celkem třikrát s průměrným výtěžkem $2,1 \pm 0,5$ % vzhledem k limitující složce reakce, tj. molární množství QB22-B-řetězce (Tab.2, str.41).



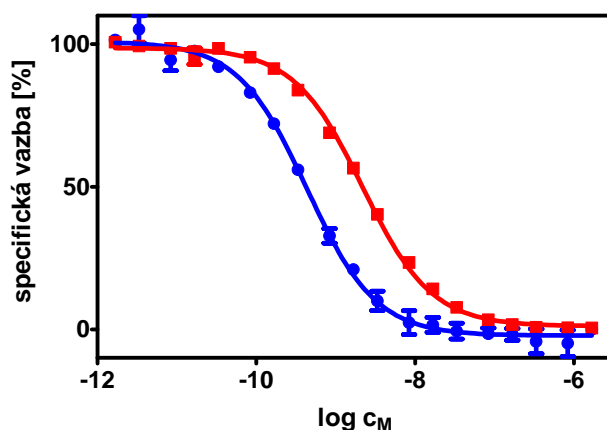
Obr. 18. Chromatografický záznam RP-HPLC čistoty připraveného QB22-insulinu, kterému odpovídá pík s retenčním časem 24, 4477 min. Čistota produktu byla nejméně 95 %.

Tab.2: Účinnost jednotlivých rekombinací

rekombinace	získané množství QB22-insulinu	výtěžek (s ohledem na limitující složku)
1.	$0,3 \cdot 10^{-3}$ g	2,0 %
2.	$0,3 \cdot 10^{-3}$ g	2,4 %
3.	$0,5 \cdot 10^{-3}$ g	2,1 %

5.4. Testování vazebné afinity QB22-insulinu *in vitro* vůči insulinovému receptoru.

Vazebné testy QB22-insulinu byly provedeny v duplikátech celkem 4-krát (Tab. 4), jak bylo popsáno v kapitole 4.7. Výsledky byly zprůměrovány, byla vytvořena výsledná vazebná křivka a určena hodnota disociační konstanty (obr.19, str.42). Ve srovnání s lidským insulinem vykazuje QB22-insulin vazebnou afinitu 19,9 %. Výsledky vazebných testů jsou vyobrazeny v tab. 3. str. 42.



Obr. 19.: Vazebná křivka lidského insulinu a QB22-insulinu. c_M je molární koncentrace lidského insulinu resp. analogu. ● - lidský insulin, ■ - QB22-insulin. Vytvořeno v programu GraphPad Prism 5.0.

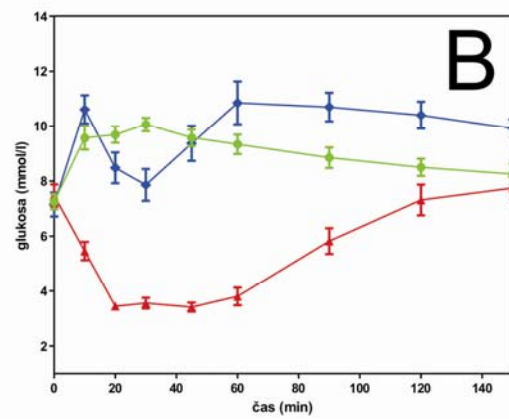
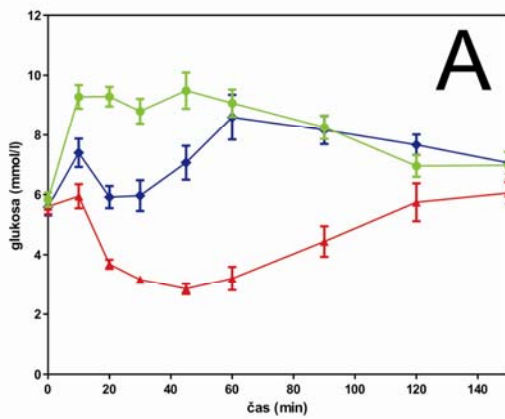
Tab. 3.: Výsledky vazebných testů lidského insulinu a analogu QB22-insulinu.

peptid	$K_d \pm SEM$ [nM]	vazebná afinita [%]	počet měření [n]
lidský insulin	$0,42 \pm 0,03$	100	3
QB22-insulin	$2,11 \pm 0,02$	19,9	4

SEM – střední chyba průměru (z anglického standard error of the mean)

5.5. Testování aktivity QB22-insulinu *in vivo*

Aktivita insulinového analogu byla testována způsobem popsaným v kapitole 4.8. Testování bylo provedeno 2-krát ($n=10$). Koncentrace insulinu a insulinového analogu byla připravena s ohledem na průměrnou hmotnost zvířete určenou v den měření (26,5 g při prvním pokusu, 28,5 g při druhém pokusu). Biologická aktivita QB22-insulinu oproti přirozenému insulinu a kontrolní skupině je znázorněna na obr. 20 (str. 43). V obou případech testování QB22-insulin méně účinně snižoval hladinu glukózy v krvi a působil po kratší dobu vzhledem k lidskému insulinu. Při srovnání výsledků obou experimentů je patrný velmi podobný průběh časové závislosti biologické aktivity jednotlivých analogů.



Obr.20: Biologická aktivita *in vivo* v insulinovém tolerančním testu analogu QB22-insulinu ve srovnání s lidským insulinem a fyziologickým roztokem ve dvou měřeních (A a B). ▲ - lidský insulin, ◆ - QB22-insulin, ● - fyziologický roztok. Vytvořeno v programu GraphPad Prism 5.0.

6. DISKUSE

Jednou z příčin onemocnění diabetes mellitus mohou být bodové mutace v insulinovém genu. Tento typ choroby se označuje jako monogenní diabetes mellitus. Mutace v insulinovém genu, vedoucí k záměně aminokyselin v peptidovém řetězci, byly doloženy ve všech částech prekurzoru insulinu, preproinsulinu (obr.7, str.20). Nejčastěji se jedná o změny v počtu nebo umístění cysteinů, ale významné jsou i záměny jiných aminokyselin, hlavně v evolučně konzervovaných pozicích. Takové mutace byly nalezeny zejména na B-řetězci.(86) Jednou z těchto mutací je záměna argininu za glutamin na pozici B22, která byla nalezena u diabetických pacientů, a jehož příprava a charakterizace byla cílem této práce. Ke studiu patogenních mutantů insulinu vede zejména fakt, že ačkoliv u všech nositelů genetického defektu je mutace heterozygotní, postihuje tedy jen jednu alelu genu, dochází přesto k rozvoji diabetu. Nicméně u několika jedinců byla nalezena funkční pouze jedna alela insulinového genu a k rozvoji nemoci nedošlo.(61)

Studovaný zástupce monogenního diabetu, analog QB22-insulin, byl připraven celkovou chemickou syntézou, oxidační rekombinací A- a QB22-B-řetězce. Průměrný výtěžek rekombinace činil $2,1 \pm 0,5$ % z maximálního získatelného množství s ohledem na limitující složku (QB22-B-řetězec). Metodou celkové chemické syntézy oxidační rekombinací A- a B-řetězců lze získat až 60-ti % výtěžek.(81) Porovnáním s výtěžky rekombinantních reakcí jiných analogů, připravených v laboratoři RNDr. J. Jiráčka CSc., jež se pohybují mezi 8-35 %, byla účinnost rekombinace A- a QB22-B-řetězce nízká.(88)

Arginin na pozici B22 patří mezi pět nejdůležitějších aminokyselin, stabilizujících terciální strukturu molekuly.(72) Jeho guanidinylová skupina vytváří stabilizující interakce s kyselinou glutamovou A17, cysteinem B19, asparaginem A21 a valinem B18 (obr.8, str. 24).(63,19) Je navíc možné, že mimo finální strukturu, stabilizuje guanidinylová skupina i přechodový stav disulfidického párování.(89) Jestliže nedochází ke stabilizaci přechodového stavu, snižuje se rychlost vzniku disulfidického můstku a tedy rychlost „balení“ molekuly celkově. To zvyšuje možnost vzniku nežádoucích interakcí během přechodu do terciální struktury.(55)

Uspořádání terciální struktury QB22-B-řetězce insulinu v důsledku absence

postranního řetězce argininu v poloze B22 vedlo při oxidační rekombinaci ke vzniku většího množství vedlejších produktů. Nejvíce vzniklo disulfidicky různě propojených A-řetězců a dále vznikl velký přebytek redukováného QB22-B-řetězce.

Z průběhu a výtěžku rekombinantní reakce vyplývá, že záměna glutaminu za arginin v pozici B22 má negativní vliv na terciální uspořádání B-řetězce. Postranní řetězec glutaminu bude pravděpodobně vytvářet jiné intramolekulární interakce a tudíž ovlivňovat jak samotný B-řetězec, tak i spojování obou řetězců dohromady. Velmi podobnou úlohu bude pravděpodobně způsobovat tato záměna i v buňce a špatné terciální uspořádání by mohlo být jednou z příčin vzniku MODY diabetu u pacientů s touto genetickou vadou.

Dále byla porovnávána afinita QB22-insulinu na insulinový receptor oproti lidskému insulinu. Afinita analogu k insulinovému receptoru byla měřena testem *in vitro* za použití buněk IM-9 a činila 19,9 % afinity lidského insulinu. Vzhledem k tomu, že jde o heterozygotní mutaci, tj. že organismus mimo mutantu s nízkou afinitou vyrábí i přirozený insulin, nebude nízká afinita analogu pravděpodobně příčinou vzniku diabetu, jelikož produkce obou typů by měla dostatečně pokrýt požadavky organismu na hladinu insulinu.

I když arginin v pozici B22 nepatří mezi aminokyseliny přímo se účastnící vazby na insulinový receptor (82), je součástí β -otáčky C-konce B-řetězce, B20-B23.(19) C-konec B-řetězce má významnou úlohu při vazbě na receptor a je zde patrně prvotní kontakt s hydrofóbním místem na receptoru.(26) Při jiných mutacích v C-konci B-řetězce se ukázalo, že i drobná změna v těchto aminokyselinách citlivě ovlivňuje afinitu k receptoru (88) a tudíž je pravděpodobné, že záměna bazického argininu za polární glutamin v exponované pozici B22 bude mít také vliv na afinitu k receptoru.

Insulinový toleranční test, prováděný na skupinách o 10-ti jedincích (myši kmene C57BL) koreluje s nízkou afinitou mutantu QB22-insulinu. Měření bylo provedeno 2-krát v rozmezí 14-ti dnů. Průběh časové závislosti hladiny glukózy v krvi byl v obou případech jak u insulinu tak u QB22-insulinu velmi podobný. Oproti lidskému insulinu je mutant QB22-insulin méně účinný a doba působení je zkrácená. Kontrolní skupina, již byl aplikován pouze fyziologický roztok, je používána jako negativní kontrola na zjištění odezvy myší na stres při manipulaci a aplikaci látky.

Kombinace vazebného testu *in vitro* a insulinového tolerančního testu *in vivo* by měla dobře charakterizovat připravený mutant QB22-insulin. Zatímco vazebná afinita ukazuje a vyčísluje přesnou disociační konstantu mutantu při vazbě na receptor, test *in vivo* je schopen ukázat skutečný účinek látky v organismu myši a jeho efektivitu při snižování krevní glukózy.

Klíčovým problémem QB22-insulinu je ale patrně dosažení správné konformace uvnitř ER a sekrece do krevního řečiště. Vznik abnormálních komplexů uvnitř ER během biosyntézy insulinu spojených se stresem ER a inhibicí přirozeného insulinu je zdá se hlavním toxickým efektem QB22-insulinu(69), vedoucím ke vzniku diabetu následkem nedostatečné produkce insulinu.

7. SOUHRN

QB22-insulin je přirozeně se vyskytující analog u diabetických pacientů. V této práci byl analog insulinu připraven celkovou chemickou syntézou s průměrným výtěžkem 2,1 % a určeny jeho základní charakteristiky. Při vazebných testech *in vitro* byla prokázána 19,9 % afinita k insulinovému receptoru vzhledem k přirozenému lidskému insulinu. Nakonec byla prokázána i nízká biologická aktivita QB22-insulinu na skupině myších samců (kmen C57BL, AnLab Praha) testy *in vivo* oproti lidskému insulinu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. De Meyts, P., *Bioessays* 26, 1351-1362 (2004)
2. <http://old.lf3.cuni.cz/diabetologie/Historie.htm>; staženo dne 23. 3. 2012
3. [Nobelprize.org: http://www.nobelprize.org/educational/medicine/insulin/discovery-insulin.html](http://www.nobelprize.org/educational/medicine/insulin/discovery-insulin.html); staženo dne 23. 3. 2012
4. [wikipedia.org: http://cs.wikipedia.org/wiki/Inzulín](http://cs.wikipedia.org/wiki/Inzulín); staženo dne 23. 3. 2012
5. Sanger, F., *Ann. Rev. Biochem.* 57, 1-28 (1988)
6. Zahn, H., *J. Pept. Sci.* 6, 1-10 (2000)
7. Katsoyannis, P. G., *Recent Prog. Horm. Res.* 23, 505-563 (1967)
8. Du, Y. C., Zhang, Y. S., Lu, Z. X., Tsou, C. L., *Sci. Sin.* 10, 84-104 (1961)
9. Adams, M. J., Blundell, T. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Vijayan, M., Baker, E. N., Harding, M. M., Hodgkin, D. C., Rimmer, B., Sheat, S, *Nature* 224, 491-495 (1969)
10. Jiráček, J., Žáková, L., *Chem. Listy* 99, 772-781 (2005)
11. Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. C., Mercola, D. A., Vijayan, M., *Nature* 231, 506-511 (1971)
12. Carpenter, F. H., *Am. J. Med.* 40, 750-758 (1966)
13. Hua, Q. X., Nakagawa, S. H., Jia, W., Hu, S. Q., Chu, Y. C., Katsoyannis, P. G., Weiss, M. A., *Biochemistry* 40, 12299-12311 (2001)
14. Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Dodson, G. G., Dodson E. J., Hodgkin, D. C., Mercola, D., *Biochem. J.* 125, 50-51 (1971)
15. Žáková, L.: Nové insulinové analogy modifikované v C-koncové části B-řetězce: Disertační práce PŘF UK v Praze, katedra biochemie a ÚOCHB AV ČR (2004)
16. Hua, Q. X., Hu, S. Q., Frank, B. H., Jia, W. H., Chu, Y. C., Wang, S. H., Burke, G. T., Katsoyannis, P. G., Weiss, M. A., *J. Mol. Biol.* 264, 390-403 (1996)
17. Kaarsholm, N. C., Ko, H. C., Dunn, M. F., *Biochemistry* 28, 4427-4435 (1989)
18. Huml, K., Barth, T., *Chem. Listy* 92, 294-301 (1998)

19. Baker, E.N. Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson G. G., Hodgkin, D. C., Hubbard, R. E., Isaacs, N. W., Reynolds, C. D., Sakabe, K., Sakabe, N., Vijayan N. M., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 319, 369-456 (1998)
20. Whittingham, J. L., Chaudhuri, S., Dodson, E. J., Moody, P. C., Dodson, G. G., *Biochemistry* 34, 15553-15563 (1995)
21. Emdin, S. O., Dodson, G. G., Cutfield, J. M., Cutfield, S. M., *Diabetologia* 19, 174 (1980)
22. Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., *EMBO J.* 5, 2503-2512 (1986)
23. White, M. F., Kahn, C. R., *J. Biol. Chem.* 269, 1-4 (1994)
24. Huml, K., Klasová, L., Barthová, J., *Chem. Listy* 96, 698-700 (2002), citováno dle (10)
25. De Meyts, P., Whittaker, J., *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 769-783 (2002)
26. Kosinová, L.: Syntéza a charakterizace AibB8LysB28ProB29-insulinu za účelem studia významu T a R konformací insulinu: Bakalářská práce PŘF UK v Praze, katedra biochemie (2011)
27. Owerbach, D., Bell, G. I., Rutter W. J., Brown, J. A., Shows, T. B.: *Diabetes* 30, 267 (1981)
28. Chan, S. J., Keim, P., Steiner, D. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1964 (1976)
29. Walter, P., Gilmore, R., Blobel, G.: *Cell* 38, 5 (1984), citováno dle (10)
30. Steiner, D. F., Docherty, K., Carroll, R.: *J. Cell. Biochem.* 24, 121-130 (1984)
31. Liu, M., Ramos-Castaneda, J., Arvan, P.: *J. Biol. Chem.* 278, 14798 (2003), citováno dle (10)
32. Steiner, D. F., Rubenstein, A. H.: *Science* 277, 531 (1977), citováno dle (10)
33. Farquhar, M. G., Palade, G. E.: *J. Cell Biol.* 91, 77s (1981), citováno dle (10)
34. Orci, L., Glick, B. S., Rothman, J. E., *Cell* 46, 171 (1986)
35. Dodson, G., Steiner, D., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 189 (1998)
36. Molinete, M., Dupuis, S., Brodsky, F. M., Halban, P. A., *J. Cell. Sci* 114, 3059 (2001)
37. Steiner, D. F., Cho, S., Oyer, P. E., Terris, S., Peterson, J. D., Rubenstein, A. H.: *J. Biol. Chem.* 246, 1365 (1971), citováno dle (10)
38. Docherty, K., Carroll, R. J., Steiner, D. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4613 (1982), citováno dle (10)

39. Kemmler, W., Steiner, D. F., Borg, J., *J. Biol. Chem.* 248, 4544 (1973), citováno dle (10)
40. Steiner, D. F. The Biosynthesis of Insulin, v knize Handbook of Experimental Pharmacology (Cuatrecasas, P., Jacobs, S., Ed.), str. 67-92, Springer-Verlag, Berlin-NewYork (1990)
41. Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hubbard, R. E., Reynolds, C. D.: *Biopolymers* 22, 281 (1983), citováno dle (10)
42. De Meyts, P. Methods in Receptor Research, (Dekker, M., Ed), str.301-383, New York (1976)
43. wikipedia.org: http://cs.wikipedia.org/wiki/Langerhansovy_ostr%C5%AFvky; staženo dne 20. 4. 2012
44. Hedeskov, C. J., *Physiol. Rev.* 60, 442 (1980)
45. Malaisse, W. J., Orci, L., *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 9, 112-136 (1979), citováno dle (10)
46. Terris, S., Steiner, D. F.: *J. Biol. Chem.* 250, 8389 (1975)
47. Authier, F., Rachubinski, R. A., Posner, B. I., Bergeron, J., *J. Biol. Chem.* 269, 3010 (1994)
48. Hamel, F. G., Mahoney, M. J., Duckworth, W. C., *Diabetes* 40, 436 (1991), citováno dle (10)
49. Seabright, P. J., Smith, G. D., *Biochem. J.* 320, 947 (1996)
50. Levy, J., Olefsky, J. M.: *Endocrinology* 120, 450 (1987), citováno dle (10)
51. Rabkin, R., Ryan, M. P., Duckworth, W. C.: *Diabetologia* 27, 351 (1984)
52. Ganong, W.F.: Přehled lékařské fyziologie, str.287-322, Nakladatelství H&H, Praha-Jinočany (1999)
53. IDF Diabetes Atlas, 2011: <http://www.diabetesatlas.org/content/diabetes-and-impaired-glucose-tolerance>; staženo dne 20. 4. 2012
54. Lebl, J., Průhová, Š.: Monogenní diabetes - dědičné nebezpečí, *SANQUIS* 69, 78-79 (2009)
55. Liu, M., Hodish, I., Haataja, L., Lara-Lemus, R., Rajpal, G., Wright, J., Arvan, P., Trends Endocrinol. Metab. 21, 652-659 (2010)
56. Njolstad, P. R., Sovik, O., Cuesta-Munoz, A., Bjorkhaug, L., Massa, O., Barbetti, F., Undlien, D. E., Shiota, C., Magnuson, M. A., Molven, A., Matschinsky, F. M. Bell, G. I., *N. Engl. J. Med.* 344, 1588-1592 (2001), citováno dle (67)
57. Njolstad, P. R., Sagen, J. V., Bjorkhaug, L., Odili, S. Shehadeh, N., Bakry, D., Sarici, S. U., Alpay, F., Molnes, J., Molven, A., Sovik, O., Matschinsky, F. M., *Diabetes* 52, 2854-2860 (2003), citováno dle (67)

58. Porter, J. R., Shaw, N. J., Barrett, T. G., Hattersley, A. T., Ellard, S., Gloyn, A. L., *J. Pediatr.* 146, 131-133 (2005), citováno dle (67)
59. Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L., Habener, J. F., *Nat. Genet.* 15, 106-110 (1997), citováno dle (67)
60. Temple, I. K., Gardner, R. J., Mackay, D. J. G., Barber, J. C. K., Robinson, D. O., Shield, J. P. H., *Diabetes* 49, 1359-1366 (2000)
61. Stöy, J., Steiner, D. F., Park, S.-Y., Ye, H., Philipson, L. H., Bell, G. I., *Rev. Endocrinol. Metab. Disord.* 11, 205-215 (2010)
62. Edghill, E. L., Flanagan, S. E., Patch, A. M., Boustred, C., Parrish, A., Shields, B., Shepherd, M. H., Hussain, K., Kapoor, R. R., Malecki, M., MacDonald, M., J., Stoy, J., Steiner, D. F., Philipson, L. H., Bell, G. I., Hattersley, A. T., Ellard, S., *Diabetes* 57, 1034-1042 (2008), citováno dle (69)
63. Molven, A., Ringdal, M., Nordbö, A.M., Raeeder, H., Stöy, J., Lipkind, G.M., Steiner, D. F., Philipson, L. H., Bergmann, I., Aarskog, D., Undlien, D. E., Joner, G., Sovik, O., Bell, G. I., Njolstad, P. R., *Diabetes* 57 (4), 1131-1135 (2008)
64. Meur, G., Simon, A., Harun, N., Virally, M., Dechaume, A., Bonnefond, A., Fetita, S., Tarasov, A. I., Guillausseau, P. J., Boesgaard, T. W., Pedersen, O., Hansen, T., Polak, M., Gautier, J. F., Froguel, P., Rutter, G. A., Vaxillaire, M., *Diabetes* 59, 653 - 661 (2010), citováno dle (61)
65. Boesgaard, T. W., Průhová, Š., Andersson, E. A., Cinek, O., Obermannova, B., Lauenborg, J., Damm, P., Bergholdt, R., Pociot, F., Pisinger, C., Barbetti, F., Lebl, J., Pedersen, O., Hansen, T., *BMC Med. Genet.* 11:e42 (2010)
66. Osbak, K.K., Colclough, K., Saint-Martin, C., Beer, N. L., Bellanne-Chantelot, C., Ellard, S., Gloyn, A. L., *Hum. Mutat.* 30, 1512-1526 (2009) citováno dle (68)
67. Nishin M., Nanjo, K., *J. of Diabetes Invest.* 2, 92-100 (2011)
68. Steck, A. K., Winter, W. E., *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 18, 252-258 (2011)
69. Liu, M., Haataja, L., Wright, J., Wickramasinghe, N. P., Hua, Q-X., Phillips, N.F., Barbetti, F., Weiss, M. A., Arvan, P., *PLoS ONE* 5:e13333 (2010)
70. Permut, M.A., Biosynthesis of insulin, v knize *The Islets of Langerhans* (Cooperstein, S. J., Watkins, D., Ed.), Academic Press, New York, str. 75-95 (1981), citováno dle (55)
71. Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., Bennink, J. R., *Nature* 404, 770-774 (2000)
72. Zoete, V., Meuwly, M., *J. Comput. Chem.* 27, 1843-1857 (2006), citováno dle (55)

73. Stoy, J., Edghill, E., L., Flanagan, S. E., Ye, H., G., Paz, V. P., Pluzhnikov, A., Below, J., E., Hayes, M., G., Cox, N., J., Lipkind, G., M., Lipton, R., B., Greeley, S. A. W., Patch, A., M., Ellard, S., Steiner, D., F., Hattersley, A., T., Philipson, L., H., Bell, G., I., *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15040-15044 (2007), citováno dle (55)
74. Liu, M., Hodish, I., Rhodes, C. J., Arvan, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 15841-15846 (2007), citováno dle (63)
75. Katsoyannis, P. G., *Diabetes* 13, 339-348 (1964)
76. Cinek, O., Šumník, Z., Průhová, Š., *Vesmír* 88, 719-721 (2009)
77. Meienhofer, J., Schnabel, E., Bremer, H., Brinkhoff, O., Zabel, R., Sroka, W., Klostermayer, H., Brandenburg, D., Okuda, T., Zahn, H. Z., *Naturforsch. B* 18, 1120-1121 (1963)
78. Katsoyannis, P. G., Ginos, J., Cosmatos, A., Schwart, G., *J. Am. Chem. Soc.* 95, 6427-6434 (1973)
79. Merrifield, R. B., *Biochemistry* 3, 1385-1390 (1964)
80. Fields, G. B., Noble, R. L., *Int. J. Pept. Protein Res.* 35, 191-214 (1990)
81. Chance, R. E., Hoffmann, J. A., Kroeff, E. P., Johnson, M. G., Schirmer, E. W. & Bromer, W. W. *Proceedings of the 7th American Peptide Symposium. Peptides, synthesis, structure and function.* (Rich, D. H., Gross, E., Ed) str. 721-728 Rockford, Illinois, Pierce Chemical Company, (1981)
82. Kristensen, C., Kjeldsen, T., Wiberg, F. C., Schaffer, L., Hach, M., Havelund, S., Bass, J., Steiner, D. F., Andersen, A. S., *J. Biol. Chem.* 272, 12978-12983 (1997)
83. Goeddel, D. V., Kleid, D., G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., Riggs, A. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 106-110 (1980)
84. Talmadge, K., Kaufman, J., Gilbertm W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 3988-3992
85. Chan, S. J., Weiss, J., Konrad, M., White, T., Bahl, C., Yu, S. D., Marks, D., Steiner, D. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 5401-5405
86. Hua, Q. X. et al., *J. Biol. Chem.* 281, 24889-24899 (2006) citováno dle (55)
87. Blecker, M.: *Methods in receptor research*, (Dekker, M., Ed) str. 301-383, New York, (1976)
88. Jiráček, J.: osobní sdělení
89. Xu, B., Huang, K., Chu, Y.-C., Hu, S.-Q., Nakagawa, S., Wang, S., Wang, R.-Y., Whittaker, J., Katsoyannis, P. G., Weiss, M. A., *J. Biol. Chem.* 284, 14597-14608 (2009)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
----------------------------	----------	-----------------	----------