

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Bc. Petra Halušková

Studium sekrečních granul buněčných linií a tkání produkujících insulin

Study of secretory granules from insulin-producing tissues and cell lines

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Žáková, PhD.

Praha 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Lenky Žákové, PhD. a všechny použité informační zdroje a literaturu jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Žákové, PhD. za odborné vedení, velkou trpělivost, ochotu a neocenitelné rady v průběhu tvorby této práce. Děkuji také Mgr. Ireně Selicharové, PhD. a Mgr. Martině Chrudinové za pomoc a užitečné rady při realizaci této práce. Dále se chci poděkovat Dr. Romaně Hadravové z Laboratoře transmisní elektronové mikroskopie ÚOCHB AV ČR za pořízení snímků buněk a Mgr. Stanislavě Matějkové ze servisní Laboratoře atomové emisní spektroskopie ÚOCHB AV ČR za stanovení množství zinečnatých kationtů v buňkách. Ráda bych poděkovala i Mgr. Pavlovi Šáchovi, PhD. za pomoc při práci s průtokovým cytometrem a konfokálním fluorescenčním mikroskopem a Mgr. Lucii Kosinové za pomoc při izolaci Langerhansových ostrůvků z potkanů. Moje díky patří určitě i RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. za cenné rady při sepisování práce, stejně jako celému kolektivu skupiny Dr. Jiráčka na ÚOCHB AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposledním řadě bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za nekonečnou podporu a lásku.

Abstrakt

Slinivka břišní (pankreas) je místem tvorby mnohých významných exokrinních a endokrinních látek, mezi které patří i insulin. Tento hormon je v těle tvořen téměř výhradně v specializovaných β -buňkách Langerhansových ostrůvků, kde je skladován v sekrečních granulích. β -buňky jsou plné těchto sekrečních váčků, čímž je umožněna rychlá reakce organismu na stimul glukosy. Správně upravený, zralý insulin se pravděpodobně vyskytuje v sekrečních granulích ve formě hexameru insulinu koordinovaném okolo dvou zinečnatých iontů. Adekvátní reakce β -buněk na zvýšenou hladinu glukosy v krvi a následná sekrece insulinu, jsou jedním z klíčových pochodů regulace metabolismu v těle. Při studiu tvorby insulinu, jeho účinků nebo procesu sekrece se mimo primárních buněk z pankreatických ostrůvků využívají jako biologický model permanentní pankreatické buněčné linie.

Tato diplomová práce se zaměřila na buněčné linie INS-1E a BRIN-BD11. Zjišťovali jsme schopnost těchto buněk tvořit proinsulin a insulin a obsah jejich zinečnatých iontů, které mohou mít na tvorbu a zpracování insulinu velký vliv. Ve všech metodách, které jsme používali, jsme linie porovnávali navzájem a posléze také s β -buňkami potkaních Langerhansových ostrůvků. Také se nám podařilo izolovat insulinové sekreční granule ze všech tří používaných buněčných typů a vytvořit tak čistou granulovou frakci, která se bude dále používat pro další studium těchto buněk. Ze získaných výsledků studia insulinových sekrečních granulí jsme usoudili, že buněčná linie INS-1E je lepším a vhodnějším modelem pankreatické β -buňky než linie BRIN-BD11 ve všech ohledech. Linie INS-1E tvoří více insulinu, má více zinečnatých iontů a je schopna glukosou indukované sekrece insulinu, která odpovídá fyziologickým podmínkám. Přesto se tato linie svými vlastnostmi jen málo přibližuje β -buňkám Langerhansových ostrůvků získaných přímo z organismu. Je vidět, že používání buněčných linií jako biologického modelu na studium a výzkum přináší s sebou na jedné straně dobrou reprodukovatelnost výsledků a neplýtvání hůře získatelným živočišným materiálem, ale na druhou stranu nebezpečí v pozmeněných nebo nedostatečných vlastnostech původních buněk.

Klíčové slova: insulin, sekreční granule, izolace proteinů, beta-buňky, zinek

Abstract

Pancreas is known to be an organ producing a variety of exocrine and endocrine substances, where also insulin belongs. This hormone is produced in the body almost solely by specialized β -cells of the Langerhans islets and is stored here in secretory granules. As the β -cells contain large number of these vesicles, an organism can quickly respond to the glucose stimulation. Completely processed insulin is formed in the secretory granules probably as a hexamer, where six insulin molecules are coordinated along two zinc bivalent cations. Appropriate β -cell response to higher glucose level and following insulin secretion is one of the key processes that regulate metabolism in the body. In order to study insulin production, its effects or secretion, permanent pancreatic cell lines are often used as biological models, out of primary cells from islets of Langerhans.

This diploma thesis is focused on two permanent cell lines INS-1E and BRIN-BD11. We searched for the ability of the cells to produce insulin, if the hormone is fully processed, as well as zinc content, which could have a great influence on insulin's processing. Using different methods we compared these two cell lines with cells from the Langerhans islets. We succeeded in isolation of secretory granules from all three cell types and we plan to use these granule fractions in further studies. According to our findings from the study of secretory granules we came to the conclusion that the cell line INS-1E is a better and more eligible model of the pancreatic β -cell than the cell line BRIN-BD11 in all studied aspects. INS-1E cells produce more insulin, have higher zinc content and are able of glucose stimulated insulin secretion. In spite of that, these INS-1E cells' features can be hardly compared to β -cells, which were obtained directly from an organism. It shows us that using cell lines as a model for the research brings advantages like reproducibility of outcomes, scientists do not have to waste animal material, but on the other hand possibility of varied or insufficient features according to original cells.

Key words: insulin, secretory granules, protein isolation, beta-cells, zinc

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Seznam použitých zkratek	8
1 Teoretický úvod.....	10
1.1 Úloha insulínu v těle	10
1.1.1 Pankreas jako místo tvorby insulínu a jeho další funkce.....	10
1.1.2 Produkce insulínu v Langerhansových ostrůvcích pankreatu.....	11
1.1.3 Skladování insulínu v β -buňkách Langerhansových ostrůvků	12
1.1.4 Sekrece insulínu z β -buněk Langerhansových ostrůvků.....	15
1.2 Úloha zinečnatých kationtů v β -buňkách Langerhansových ostrůvků	20
1.2.1 Homeostaze zinečnatých iontů v buňce – zinkové přenašeče	20
1.2.2 Popis hexameru insulínu.....	22
1.3 Tvorba insulínu v pankreatických buněčných liniích	24
1.3.1 Buněčné linie sekretující insulín.....	25
2 Cíl práce.....	26
3 Materiál.....	27
3.1 Chemický materiál	27
3.2 Biologický materiál.....	28
3.3 Použité přístroje	28
4 Metody.....	30
4.1 Práce s buněčnými liniemi INS-1E, BRIN-BD11 a s potkaními Langerhansovými ostrůvkami.....	30
4.1.1 Charakteristika a práce s buněčnou linií INS-1E.....	30
4.1.2 Charakteristika a práce s buněčnou linií BRIN-BD11.....	30
4.1.3 Izolace a práce s potkaními Langerhansovými ostrůvkami	31
4.2 Vizuální porovnání buněčných linií INS-1E a BRIN-BD11 a Langerhansových ostrůvků transmisí elektronovou mikroskopií.....	31
4.3 Určení množství zinečnatých iontů a proteinů v INS-1E, BRIN-BD11 buňkách a buňkách Langerhansových ostrůvků.....	32
4.3.1 Příprava INS-1E, BRIN-BD11 buněk a Langerhansových ostrůvků na atomovou emisní spektroskopii	32

4.3.2	Stanovení množství zinečnatých iontů v buněčném materiálu metodou indukčně vázaného plazmatu s optickou emisí	32
4.3.3	Stanovení množství proteinů v INS-1E, BRIN-BD11 buňkách a v Langerhansových ostrůvcích metodou dle Bradfordové	34
4.4	Suplementace média INS-1E buněk zinečnatými ionty	35
4.5	Průkaz přítomnosti pro/insulinu v INS-1E, BRIN-BD11 buňkách a v Langerhansových ostrůvcích tricínovou-SDS elektroforézou	35
4.5.1	Příprava lyzátů buněk pro elektroforetickou separaci	35
4.5.2	Tricínová-SDS elektroforéza	36
4.5.3	Imunochemická detekce proteinů	37
4.6	Stanovení množství Zn^{2+} v buňkách INS-1E, BRIN-BD11 a buňkách Langerhansových ostrůvků průtokovou cytometrií	38
4.6.1	Příprava zásobních roztoků fluorescenční značky pro průtokovou cytometrii..	38
4.6.2	Příprava buněk na průtokovou cytometrii	38
4.7	Detekce Zn^{2+} v buňkách INS-1E, BRIN-BD11 a buňkách Langerhansových ostrůvků konfokální fluorescenční mikroskopií.....	40
4.8	Izolace insulinových sekrečních granulí	41
4.9	Stanovení insulinu tzv. „dot blotem“	42
4.10	Stanovení množství sekretovaného insulinu INS-1E buňkami radioimunoesejí (RIA)	43
5	Výsledky.....	44
5.1	Porovnání vzhledu buněk INS-1E, BRIN-BD11 a Langerhansových ostrůvků transmisí elektronovou mikroskopií.....	44
5.2	Množství zinečnatých iontů a proteinů v buňkách INS-1E, BRIN-BD11 a v Langerhansových ostrůvcích určeno atomovou emisí spektroskopií.....	46
5.3	Suplementace média INS-1E buněk zinečnatými ionty	46
5.4	Stanovení přítomnosti pro/insulinu v buňkách tricínovou-SDS elektroforézou a imunochemickou detekcí	49
5.5	Stanovení množství Zn^{2+} v buněčných liniích INS-1E a BRIN-BD11 a v buňkách Langerhansových ostrůvků průtokovou cytometrií	50
5.6	Detekce přítomnosti Zn^{2+} v buňkách konfokální fluorescenční mikroskopií	54
5.7	Izolace insulinových sekrečních granulí a detekce této frakce tzv. „dot blotem“	56
5.8	Množství sekretovaného insulinu INS-1E buňkami stanoveno radioimunoesejí (RIA)	57

5.9	Sledování změn konformace insulinového hexameru při interakci se serotoninem, dopaminem a argininem	59
6	Diskuse	60
7	Souhrn.....	64
8	Reference.....	65
	Příloha.....	75

Seznam použitých zkratk

β HC	β -hyperplastické buňky
β TC	β -tumorové buňky
ADP	Adenosindifosfát
APS	Persulfát amonný
ATP	Adenosintrifosfát
BRIN-BD11	potkaní pankreatická buněčná linie
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CMRL	Médium vytvořené v Connaught Medical Research laboratořích
dER	Drsné endoplasmatické retikulum
DMSO	Dimethylsulfoxid
ETV	Elektrotermické odpařování
FBS	Fetální hovězí sérum (z angl. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FCS	Přímý rozptyl (z angl. <i>Forward Scatter</i>)
GA	Golgiho aparát
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GIP	Gastrický inhibiční polypeptid (z angl. <i>Gastric Inhibitory Polypeptide</i>)
GLUT	Glukosový přenašeč
GTPasa	Enzym hydrolyzující guanosintrifosfát
HBSS	Komerční pufr (z angl. <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-piperazinylethansulfonová kyselina
HIT	Křeččí pankreatické β -buňky
ICP-OES	Metoda indukčně vázaného plazmatu s optickou emisí
IGF2	Růstový faktor 2 podobný insulinu (z angl. <i>Insulin-like Growth Factor 2</i>)
INS-1	potkaní insulinomární buněčná linie
ISG	Insulinová sekreční granule
K_{ATP} kanál	ATP-senzitivní draselný kanál
KRBH	Krebs-Ringer HEPES pufr (z angl. <i>Krebs-Ringer HEPES Buffer</i>)
LO	Langerhansové ostrůvky
MIN	Myší insulinomární buněčná linie
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina
MT	Metalothionein
PBS	Fosfátový pufr (z angl. <i>Phosphate-buffered Saline</i>)

PC1, PC2	Prohormon konvertasa 1 a 2 (z angl. <i>Prohormone Convertase 1 and 2</i>)
PM	Plasmatická membrána
PNS	Postnukleární supernatant
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIA	Radioimunoesej
Rim	Rab3-interagující molekula
RIN	Potkaní insulinomární buněčná linie
RPMI-1640	Médium vytvořené v Roswell Park Memorial institutu
RRP	z angl. <i>Readily Releasable Pool</i>
SDS	Dodecylsulfát sodný
SMT	Pufr 0,27M sacharosa, 10mM MOPS, 1M Tris, pH 6,8
SNAP	z angl. <i>Synaptosomal-associated Protein 25</i>
SNARE	SNAP (z angl. <i>Soluble NSF Attachment Protein</i>) receptor
SRP	Protein rozeznávající signální sekvenci (z angl. <i>Signal Recognition Particle</i>)
SSC	Příčný rozptyl (z angl. <i>Side Scatter</i>)
Tag	SV40 velký T onkoprotein
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TGA	<i>trans</i> -Golgiho aparát
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethyléndiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
T-TBS	Tris/HCl pufr obsahující chlorid sodný a detergent Tween (z angl. Tween Tris-buffered saline)
VAMP	Synaptobrevin (z angl. <i>Vesicle-associated Membrane Protein</i>)
ZIP	Zinkový přenašeč (z angl. <i>Zrt/Irt-like Protein</i>)
ZnT	Zinkový transportér

1 Teoretický úvod

Insulin je klíčovým hormonem v regulaci energetické rovnováhy v těle, kde snižuje hladinu glukosy v krvi. Za normálních podmínek je produkován v značném množství jenom v β -buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu (slinivka břišní)¹. Tyto specializované buňky věnují až polovinu svojí proteinové produkci právě výrobě insulinu², který je skladován v tzv. sekrečních granulích.

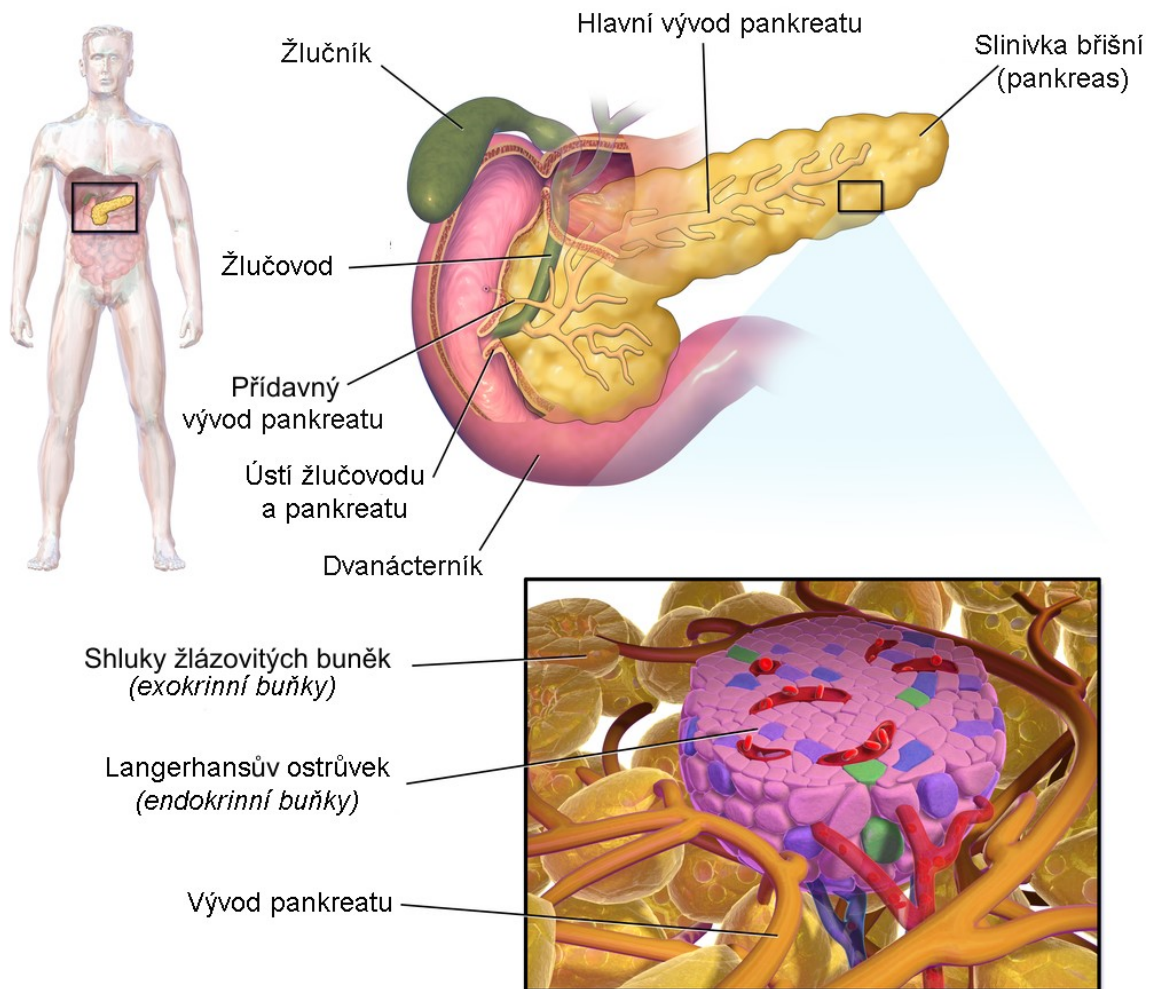
1.1 Úloha insulinu v těle

1.1.1 Pankreas jako místo tvorby insulinu a jeho další funkce

Pankreas savců je orgánem důležitým hlavně pro trávení a homeostázu glukosy, která je zdrojem energie, a jeho poškození může vést k onemocnění diabetes mellitus. Pankreas je složen z exokrinních, endokrinních a duktálních buněk, které se díky krevnímu oběhu podílejí na regulaci nutriční rovnováhy (*obrázek 1*, strana 11). Exokrinní funkci pankreatu zabezpečují shluky žlázovitých buněk, které tvoří různé enzymy, jako například trypsin, chymotrypsin, atd., a jejich obsah je transportován do tenkého střeva. Za endokrinní funkci jsou zodpovědné Langerhansovy ostrůvky, kompaktní, oválné útvary složené ze 4 typů buněk; α -, β -, γ - a δ -buněk. Tyto buňky byly objeveny německým lékařem Paulem Langerhansem v roce 1869³.

Většinu Langerhansových ostrůvků (asi 80% hmotnosti ostrůvků) tvoří β -buňky, které sekretují insulin, jeho antagonistu amylin a jiné peptidy⁴. Jedná se o polyhedrální buňky plné sekrečních granulí⁵ (*obrázek 3*, strana 15). Ostatní buňky ostrůvků sekretují glukagon (α -buňky), somatostatin (δ -buňky) a pankreatický polypeptid (γ -buňky). Tyto buňky se vyskytují na okrajích ostrůvků a obklopují větší β -buňky. Endokrinní buňky tvořící hormony ostrůvků najdeme i v jiných částech organismu, hlavně v střevě, ale buňky tvořící insulin se nacházejí jenom v pankreatu⁶.

Uvolnění insulinu je stimulováno zvýšenou hladinou glukosy, dále glukagonem, adrenalinem, gastrickým inhibičním polypeptidem (GIP) a zvýšenou koncentrací některých aminokyselin, jako je například arginin³ nebo serotonin a dopamin.



Obrázek 1: Pankreas a Langerhansovy ostrůvky. Pankreas je orgánem regulujícím metabolismus, obsahuje exokrinní a endokrinní buňky (Langerhansové ostrůvky). Převzato a upraveno z cit.⁷.

1.1.2 Produkce insulínu v Langerhansových ostrůvcích pankreatu

Exprese insulínu je v savčím organismu vyhrazena pro β -buňky endokrinní části pankreatu¹. Za normálních podmínek β -buňky setrvávají v stavu, kdy je neustále „pool“ insulínu připraven na sekreci na základě vnějšího stimulu. Jakékoliv uvolnění insulínu je kompenzováno jeho opětovnou tvorbou, aby β -buňky byly vždy připraveny odpovědět na další impuls. Celkově je teda biosyntéza insulínu vysoce regulovaným a dynamickým procesem³.

Už od roku 1955 je známo, že insulín je dvouřetězcový protein⁸. To, že je tvořen z prekursoru, jednořetězcového proinsulínu, se zjistilo později, v roce 1967 díky práci

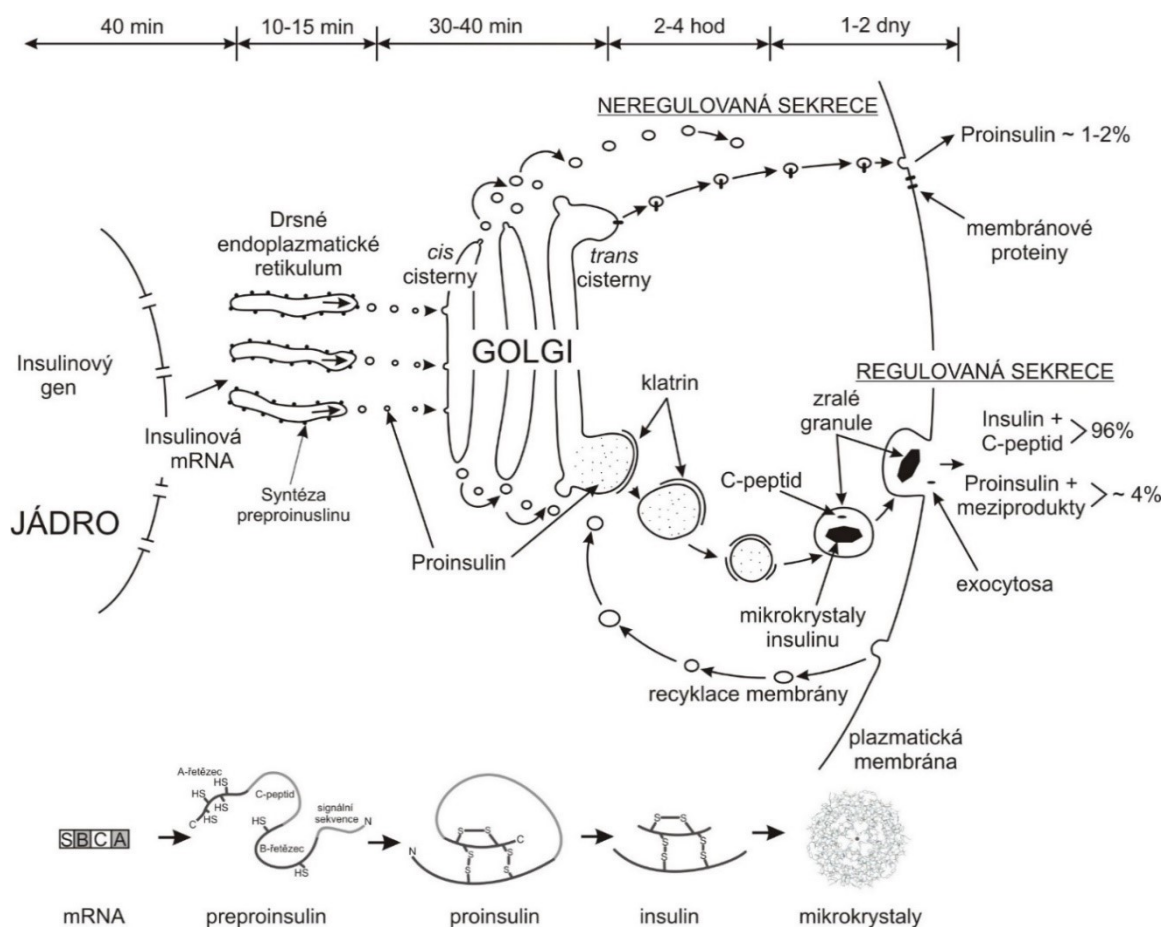
Donalda Steinera a kol.⁹. Proinsulin má svůj proteinový prekursor, preproinsulin, jehož prvních 24 aminokyselin tvoří signální peptid¹⁰. Signální peptid preproinsulinu se váže na SRP protein, protein rozeznávající signální sekvenci (z angl. *signal recognition particle*), a po jeho navázání na příslušný receptor dochází k translokaci proteinu do drsného endoplasmatického retikula¹¹. Následně je signální peptid odštěpen a vzniká proinsulin³. V endoplasmatickém retikulu je proinsulin složen do správné konformace, vytvoří se 3 disulfidické můstky v A- a B-řetězcích, spojených tzv. C-peptidem. Když je proinsulin správně složen, transportuje se do *cis*-Golgiho aparátu^{12,13}. Tento proces vyžaduje neporušenou mikrotubulární síť buňky¹⁴, vápenaté ionty¹⁵, guanosin trifosfát^{15,16} a určité cytosolické proteiny¹⁵⁻²⁰. Následuje transport proinsulinu do *trans*-Golgiho aparátu, kde je tento polypeptid od ostatních proteinů separován²¹. Poté dochází k transportu proinsulinu v klatrinovém váčku, který je zárodkem sekreční granule, až k membráně. Postupně se pH uvnitř váčku snižuje a dochází k zrání insulínu štěpením proinsulinu 3 různými proteasami: prohormon konvertasami (PC1 a PC2) a karboxypeptidasou E²². Prohormon konvertasy s endopeptidasovou aktivitou odštěpí z proinsulinu fragment, C-peptid, karboxypeptidasa E s exopeptidasovou aktivitou dva páry bazických aminokyselin, které byly v blízkosti C-peptidu, konkrétně Lys-64, Arg-65, a Arg-31 a Arg-32²³. Nakonec v sekreční granuli zůstává insulin, 6 kDa protein složený ze dvou řetězců, A a B, které jsou stabilizovány 3 disulfidickými můstky, které se nacházejí mezi cysteiny v pozicích A7 a B7, A20 a B19, A6 a A11.

1.1.3 Skladování insulínu v β -buňkách Langerhansových ostrůvků

Insulin je v těle, konkrétně v β -buňkách Langerhansových ostrůvků, skladován v sekrečních insulinových granulích, váčcích pučících z *trans*-Golgiho aparátu (TGA), viz *obrázek 2* na straně 13. Odhaduje se, že v jedné β -buňce je okolo 10 000 insulinových sekrečních granulí s průměrem přibližně 300 nm²⁴. Granule obsahují kromě jiných rozpustných proteinů a látek hlavně insulin pravděpodobně ve formě hexameru stabilizovaného koordinačními vazbami kolem dvou zinečnatých iontů²⁵. Insulinové granule mohou setrvat v buňce po dobu pár dní, než na základě vnějšího stimulu dojde k jejich exocytose. Odhadovaný poločas života granulí je přibližně 3 dny a poté se jich buňka zbaví různými lysosomálními degradačními mechanismy²⁶. Existují 2 hypotézy o procesu třídění proteinů do insulinových granulí. První hypotézou je „třídění na základě vstupu“ (z angl. *sorting by entry*), kde se spoléhá na to, že proteiny jsou tříděny do různých specifických váčků přímo v TGA. Podle druhé hypotézy,

„třídění na základě zadržení“ (z angl. *sorting by retention*), jsou proteiny v TGA inkorporovány do nezralých váčků, ze kterých jsou dále tříděny při zrání jednotlivých proteinů²⁷⁻²⁹. Na základě vícero studií se zdá druhá hypotéza pro β -buňky více pravděpodobná^{28,30}.

Nezralá granula dozrávají během jejich postupu z TGA směrem k plasmatické membráně. Snižování pH uvnitř granule vede také k aktivaci prohormon konvertas a karboxypeptidasy E, díky čemu dochází ke konverzi proinsulinu na insulin^{31,32}. Proces zrání zahrnuje i postupné odstranění klatrinového obalu z povrchu váčku^{33,34}. Pro ilustraci vzniku insulinové sekreční granule, viz *obrázek 2*.



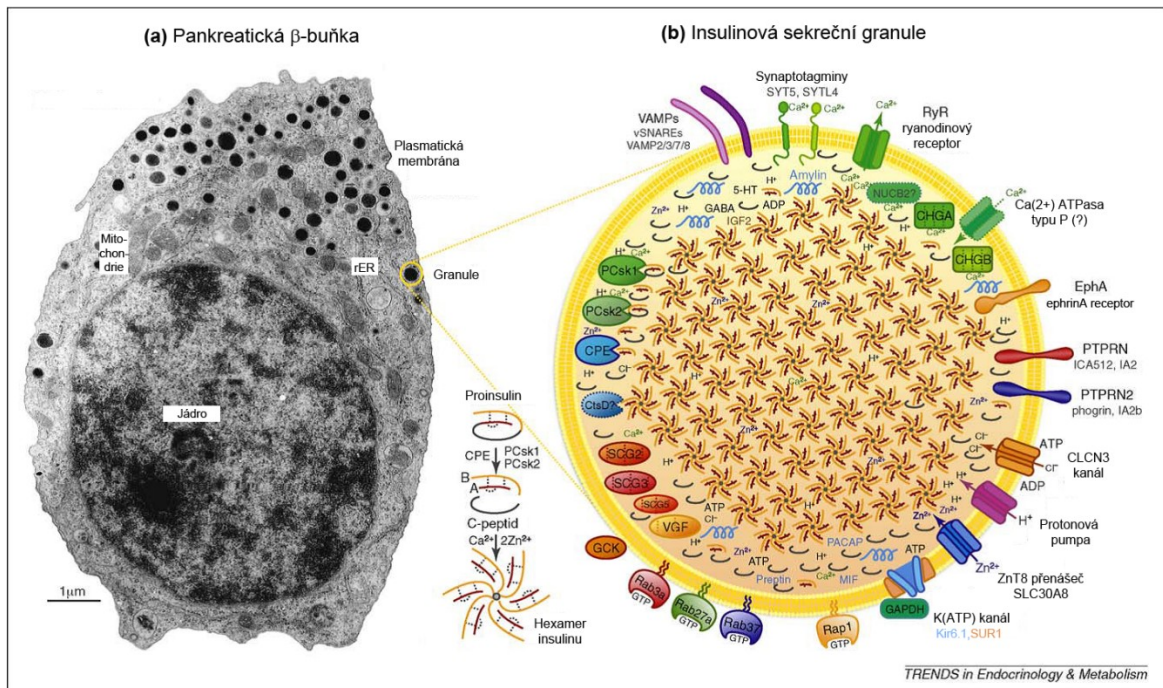
Obrázek 2: Vznik insulinových sekrečních granulí a proměny insulinu v průběhu tohoto procesu. V horní části obrázku je orientační časová osa, v dolní části schéma biosyntézy a úprav insulinu. Většina proinsulinu je exocytována z buňky regulovanou sekrecí, při které dochází ke konverzi, zrání proteinu na insulin. Malé množství (okolo 1-2%) proinsulinu je uvolněno tzv. neregulovanou sekrecí váčků vytvořených v různých částech Golgiho aparátu. Převzato z cit.³⁵.

Kombinace okyselování vnitřku granule a konverze proinsulinu na insulin umožňuje krystalizaci insulinu ve zralé sekreční granuli. Je známo, že insulin je schopný dimerizace, a v přítomnosti Zn^{2+} iontů může asociovat do hexamerů³⁶. Zn^{2+} je koordinován histidylovými zbytky v pozici 10 řetězce B insulinů v hexameru. Krystalizace insulinu je závislá na vysoké lokální koncentraci insulinu, koncentraci zinečnatých iontů a kyselém prostředí uvnitř granule^{36–38}. I když krystalizace insulinu uvnitř granulí nebyla zatím *in vivo* dokázána, předpokládá se, že prostředí uvnitř granule vznik mikrokrytallků insulinu umožňuje^{14,38}.

Insulinové sekreční granule obsahují relativně vysoké množství různých proteinů a nízkomolekulárních látek (kolem 150)³⁹, viz *obrázek 3* na straně 15. Nejdůležitější a nejhojnější molekulou granulí β -buněk je hormon insulin, který tvoří 50-60% celkového proteomu granule³⁹. Druhou nejčastější molekulou je C-peptid, který je uvolňován při štěpení proinsulinu, a zralé granule s krystalickým „jádrem“ mají tento peptid na okraji lumenu granule. Bylo prokázáno, že C-peptid urychluje disociaci hexameru insulinu⁴⁰ a snižuje možnost apoptózy β -buňky⁴¹. V sekrečních granulích dále najdeme malé množství peptidových hormonů, jako je amylin⁴², preptin⁴³ nebo růstový faktor 2 podobný insulinu, IGF2⁴⁴. Mimo jiné je jejich úlohou regulovat do určité míry sekreci insulinu^{43,45}, nebo proliferaci β -buňky⁴⁶. Dalšími látkami vyskytujícími se v sekrečních granulích jsou neurotransmitery, které mohou mít přímý efekt na β -buňky, nebo okolní buňky. Příkladem je γ -aminomáselná kyselina (GABA), klasický inhibiční neurotransmitter nervového systému. Na základě společné sekrece s insulinem GABA redukuje sekreci glukagonu z α -buněk, což bylo ukázáno na izolovaných ostrůvcích hlodavců⁴⁷. Protože glukagon je antagonistou insulinu, jeho inhibice neurotransmiterem GABA zvyšuje efekt insulinu. Insulinové sekreční granule obsahují také ATP a ADP, které jsou při sekreci s insulinem zpětnovazebným signálem pro β -buňku⁴⁸. Extracelulární ATP například zvyšuje sekreci insulinu díky vazbě na P2X receptor, který transportuje vápenaté ionty⁴⁹. Tato molekula je ale rychle degradována na adenosin, schopný v izolovaných ostrůvcích snížit sekreci insulinu⁵⁰.

Neodmyslitelnou součástí insulinové sekreční granule jsou iontové kanály a teda i ionty. Zrání granule je zabezpečeno okyselením jejího nitra, jelikož proteasy štěpící proinsulin vyžadují pH 5,5^{31,51}. Import H^+ iontů je umožněn V-ATPasou a transport jen pár protonů přes membránu způsobí rychlou změnu náboje, která zastaví další okyselení. Nitro granule

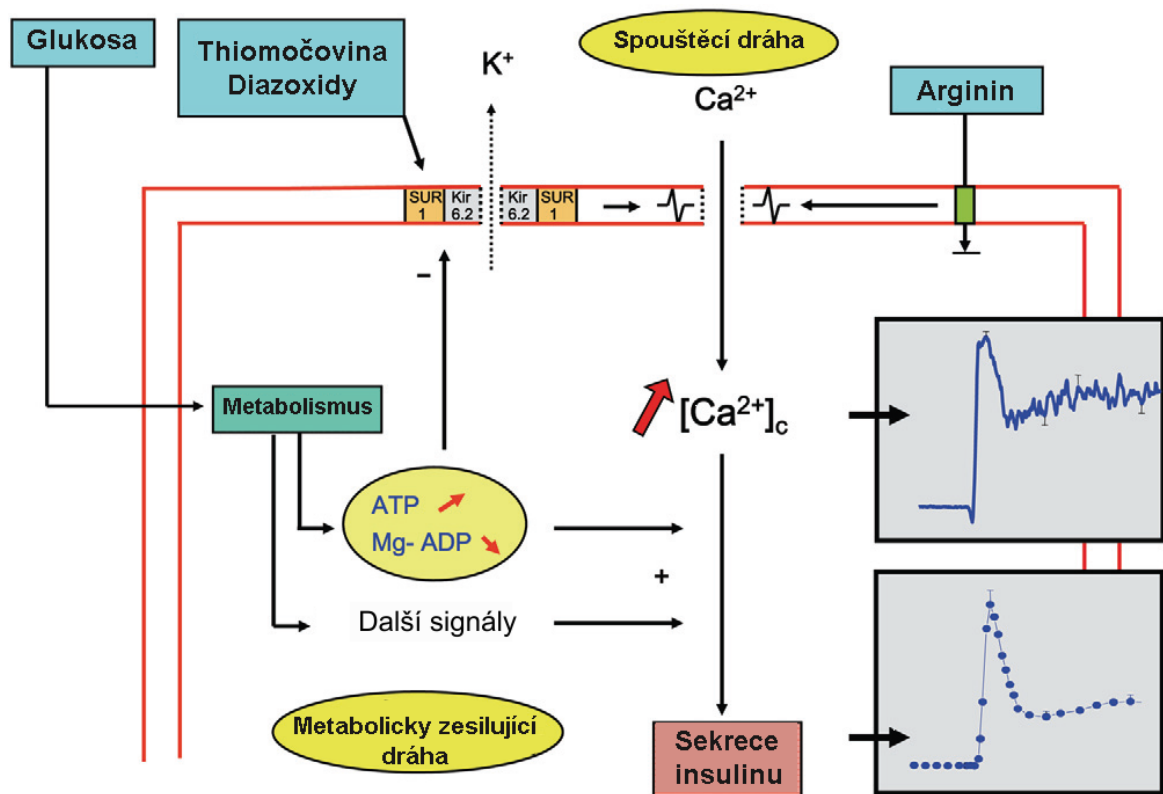
obsahuje pár dalších iontů, mezi kterými vápenaté a zinečnaté jsou nejvýznamnější, přičemž Zn^{2+} jsou pravděpodobně součástí hexameru insulínu.



Obrázek 3: Sekreční granule insulínu. (a) Pankreatická β -buňka zobrazena transmisí elektronovou mikroskopií produkuje (b) membránové vřetky plné insulínu. Kromě této hlavní složky granule obsahují mnoho proteinů, malých molekul a iontů, jako i transmembránových proteinů a kanálů. Převzato a upraveno z cit.¹.

1.1.4 Sekrece insulínu z β -buněk Langerhansových ostrůvků

Sekrece insulínu v optimálním množství a vhodnou rychlostí je nezbytná pro zajištění homeostáze glukosy a také udržení energetické bilance. Tento proces, glukosou stimulovaná sekrece insulínu, je zajištěn dvěma různými cestami - spouštěcí („triggering“) a metabolicky zesilující („metabolic amplifying“), viz *obrázek 4* na straně 16.



Obrázek 4: Schéma spouštěcí a metabolicky zesilující dráhy sekrece insulinu v β -buňce Langerhansových ostrůvků. Zpracováním glukosy (více ATP) se zavřou K_{ATP} kanály, které umožní depolarizaci a vtok Ca^{2+} iontů. To vede k zvýšení koncentrace cytosolického vápníku (spouštěcí dráha). Zpracování glukosy produkuje také další signály, které už nezvyšují koncentraci Ca^{2+} v cytosolu díky depolarizaci membrány, ale přesto zvyšují Ca^{2+} -indukovanou exocytosu insulinových sekrečních granulí (metabolicky zesilující dráha). Grafy vpravo ukazují zvýšení cytosolického vápníku a sekrece insulinu. Arginin může aktivovat spouštěcí dráhu vstupem do β -buňky v protonované formě a tak ji depolarizovat, ale neaktivuje metabolicky zesilující dráhu, protože tato aminokyselina není metabolizována. Převzato a upraveno z cit.⁵².

1.1.4.1 Spouštěcí dráha glukosou indukované sekrece insulinu

Glukosa spouští sekreci insulinu zvýšením koncentrace volných vápenatých iontů v cytosolu β -buňky. Po stimulaci buňky vysokou koncentrací glukosy dochází ke glykolyse a také se urychlí metabolismus mitochondrií. To vede k zvýšení ATP a snížení ADP koncentrací v cytosolu, což slouží jako vnitrobuněčný druhý posel pro zavření ATP-senzitivních draselných (K_{ATP}) kanálů na plasmatické membráně⁵³. Důsledkem toho je depolarizace membrány, otevření napětově ovládaných vápenatých kanálů a vtok Ca^{2+} do buňky. Napětově ovládané Ca^{2+} kanály ve vnější membráně β -buňky tvoří mikro prostředí „vodivé“

na exocytosu⁵⁴. To umožňuje buňce dosáhnout vysokou lokální koncentraci vápenatých iontů s jenom malým množstvím kanálů.

K_{ATP} kanály jsou komplexní struktury a vazba různých látek na jejich podjednotky (Kir6.1 a SUR1 – viz *obrázek 4* na straně 16) má vliv na sekreci insulínu. Například thiomocovina se váže na SUR1 podjednotku K_{ATP} kanálu, dochází k zavření K_{ATP} kanálů, β-buňka se depolarizuje, zvýší se koncentrace cytosolického vápníku a spustí se sekrece insulínu. Na druhou stranu látky jako diazoxidy interakcí se SUR1 podjednotkou způsobí otevření K_{ATP} kanálů a inhibují tak sekreci insulínu hyperpolarizací β-buňky^{55–58}.

1.1.4.2 Metabolicky zesilující dráha glukosou indukované sekrece insulínu

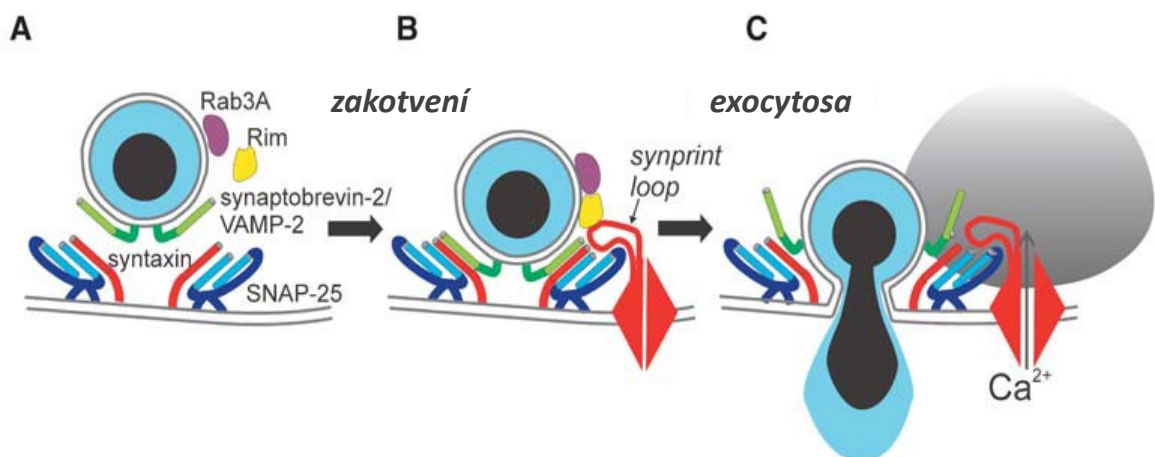
Kromě tvorby spouštěcího signálu (zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺), glukosou indukovaná sekrece insulínu zahrnuje tvorbu signálů, které zesilují působení Ca²⁺ na exocytosu⁵⁹. Tento koncept byl zaveden na základě experimentů, poukazujících na fakt, že glukosa může zvýšit sekreci insulínu i za podmínek, že K_{ATP} kanály zůstávají otevřeny^{60–62}, nebo už jsou plně uzavřeny^{63–65}.

Například když jsou K_{ATP} kanály drženy v otevřeném stavu vlivem diazoxidu a vysoká koncentrace glukosy není schopna zvýšit intracelulární koncentraci vápenatých iontů, nedochází k depolarizaci membrány a teda ani k sekreci insulínu. Zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺ ale může být indukováno (i v prostředí nízké koncentrace glukosy) depolarizací membrány díky velkému množství extracelulárních K⁺ iontů. Dochází k stimulaci sekrece insulínu jednoduše kvůli vzniku spouštěcího signálu. Zvyšování koncentrace glukosy v přítomnosti velkého množství K⁺, když jsou K_{ATP} kanály drženy otevřené diazoxidem, vede k značnému zvýšení (zesilnění) sekrece insulínu, bez dalšího zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺ iontů³.

1.1.4.3 Fúze insulinové sekreční granule s plasmatickou membránou β-buňky

Insulinové sekreční granule po vypučení z TGA a po procesu zrání mohou na základě zvýšení koncentrace cytosolických Ca²⁺ iontů fúzovat s vnější plasmatickou membránou (PM) β-buňky a uvolnit svůj insulinový obsah. Proces sekrece insulínu, exocytosy, je vysoce kontrolovaný a zahrnuje zakotvení, připojení váčku k PM, fúzi váčku s PM a nakonec uvolnění obsahu.

Důležitou úlohu zde mají tzv. SNARE proteiny, schopné tvořit komplexy připevňující váček k PM (*obrázek 5*, strana 18). Patří sem syntaxin a SNAP-25, které jsou na PM, a vezikulární protein synaptobrevin (někdy uváděný i jako VAMP). Podle postulovaného modelu SNARE proteiny zprostředkovávají exocytosu díky tomu, že dostávají do blízkého kontaktu membránu váčku s PM (analogie se zipem)⁶⁶. Čtyři α -helikální domény (jedna ze synaptobrevinu a syntaxinu, a dvě ze SNAP-25) společně vytvoří tzv. „coiled-coil“ strukturu, čímž dojde k spojení váčku s PM. Tvorba SNARE komplexů je regulována synaptotagminem⁶⁷, který se chová jako Ca^{2+} -senzor při fúzi⁶⁷⁻⁶⁹. V celém procesu exocytosu hrají důležitou úlohu také Rab GTPasy a Rab-podobné proteiny, které jsou součástí zakotvení granule na plasmatickou membránu a také tyto kroky regulují⁷⁰. Nejvíce studována isoforma Rab GTPasy je Rab3A⁷¹, přičemž v β -buňce se tento protein nachází na vnější, cytosolické straně membrány sekreční granule. Slouží zřejmě jako „brzda“, a teda limituje uvolňování insulínu^{72,73}. Dalšími regulačními proteiny zahrnutými v sekreci insulínu stimulované glukosou jsou Rim (Rab3-interagující molekula) a jeho isoforma Rim2⁷⁴. Rim interaguje s vícero proteiny a zdá se, že slouží při této interakci jako proteinová podpora („lešení“)^{75,76}. Proces zakotvení sekreční granule v plasmatické membráně a její exocytosa je znázorněna na *obrázku 5*.

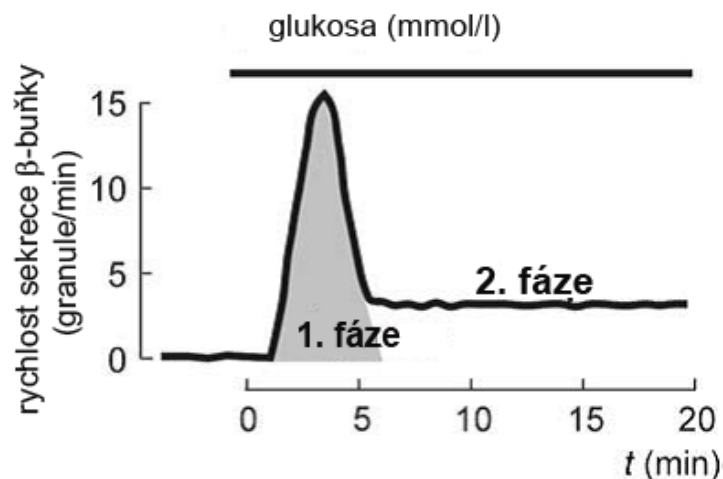


Obrázek 5: SNARE proteiny, zakotvení granule a exocytosa sekreční granule. V průběhu zakotvení (A), se granule přiblíží k plasmatické membráně a vesikulární protein synaptobrevin/VAMP-2 se spojí s partnery na PM syntaxinem a proteinem SNAP-25, čímž vzniká pevný komplex, který přiváže granuli k PM, a v β -buňce^{54,77} k Ca^{2+} -kanálu (B). Po fúzi dvou membrán následuje lokální zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů, které nastává díky otevření Ca^{2+} -kanálů (C). Jak je naznačeno v A a B, procesu se zúčastňují i GTP-vážící protein Rab3A a jeho interakční partner Rim. Převzato a upraveno z cit.⁷⁸.

1.1.4.4 Dvoufázový charakter sekrece insulinu

Sekrece insulinu nezávisí jenom na okolní koncentraci glukosy, ale i na rozsahu (stupni) změny této koncentrace. Když množství glukosy stoupá pomalu, zvýšení sekrece insulinu je paralelní. Ale když se koncentrace glukosy zvýší rapidně a zůstane na vysoké úrovni, sekrece insulinu vykazuje dvoufázový charakter (obrázek 6).

První fáze je rychle iniciovaná, poměrně rychle odezní a vrcholí kolem páté minuty od začátku sekrece. Po ní následuje druhá fáze, která je stálá, sekrece insulinu pokračuje, ale v menším množství, po dobu přibližně 18 minut⁷⁹⁻⁸². Ve snaze zabezpečit okamžitou dostupnost, některé zralé insulinové granule jsou přichyceny na plasmatickou membránu a představují tzv. „readily releasable pool“ (RRP)^{24,77,83}. V první fázi je insulin uvolněn z tohoto RRP a v druhé fázi je sekrece insulinu zabezpečena nově získanými granulemi ze zásoby^{24,77,84}.



Obrázek 6: Schéma dvoufázové sekrece insulinu na základě glukosového stimulu. Zvýšení extracelulární koncentrace glukosy na 10 mmol/l způsobí spuštění uvolnění insulinu z buňky s přibližně minutovým zpožděním (čas potřebný na metabolizování glukosy) a má dvoufázový charakter. Převzato z cit.⁷⁸.

Jenom část insulinového obsahu β -buňky je uvolněna během stimulace. Jak už bylo zmíněno, jedna β -buňka obsahuje přibližně 10 000 sekrečních granulí. Během první fáze se uvolňuje odhadem jenom 15 granulí a během druhé fáze 5 granulí za minutu a jednu β -buňku⁸².

Zájem o studium této kinetiky pramení z klinických pozorování, protože narušení první fáze sekrece insulinu jako odpověď na přítomnost glukosy je časným znakem nefunkčnosti β -buněk v diabetu mellitus typu 2⁸⁵.

1.2 Úloha zinečnatých kationtů v β -buňkách Langerhansových ostrůvků

Zinek je esenciálním prvkem pro zdraví člověka a jeho nedostatek může mít potenciálně fatální následky. Ovlivňuje funkci vícero orgánů z gastrointestinálního, imunitního, centrálního nervového nebo reprodukčního systému^{86,87}. Všechny buněčné typy potřebují zinečnaté ionty kvůli jeho katalytické, strukturní a regulační úlohy v proteomu, přičemž se odhaduje, že zinečnaté ionty vyžaduje pro svou funkci u člověka až kolem 3 000 proteinů⁸⁸. Intoxikace tímto kovem je vzácná v porovnání s jinými, ale i tak musí být koncentrace intracelulárních volných Zn^{2+} iontů pod kontrolou, hlavně kvůli důležité roli, kterou hrají zinečnaté ionty s cysteinem v redoxní homeostazi⁸⁹.

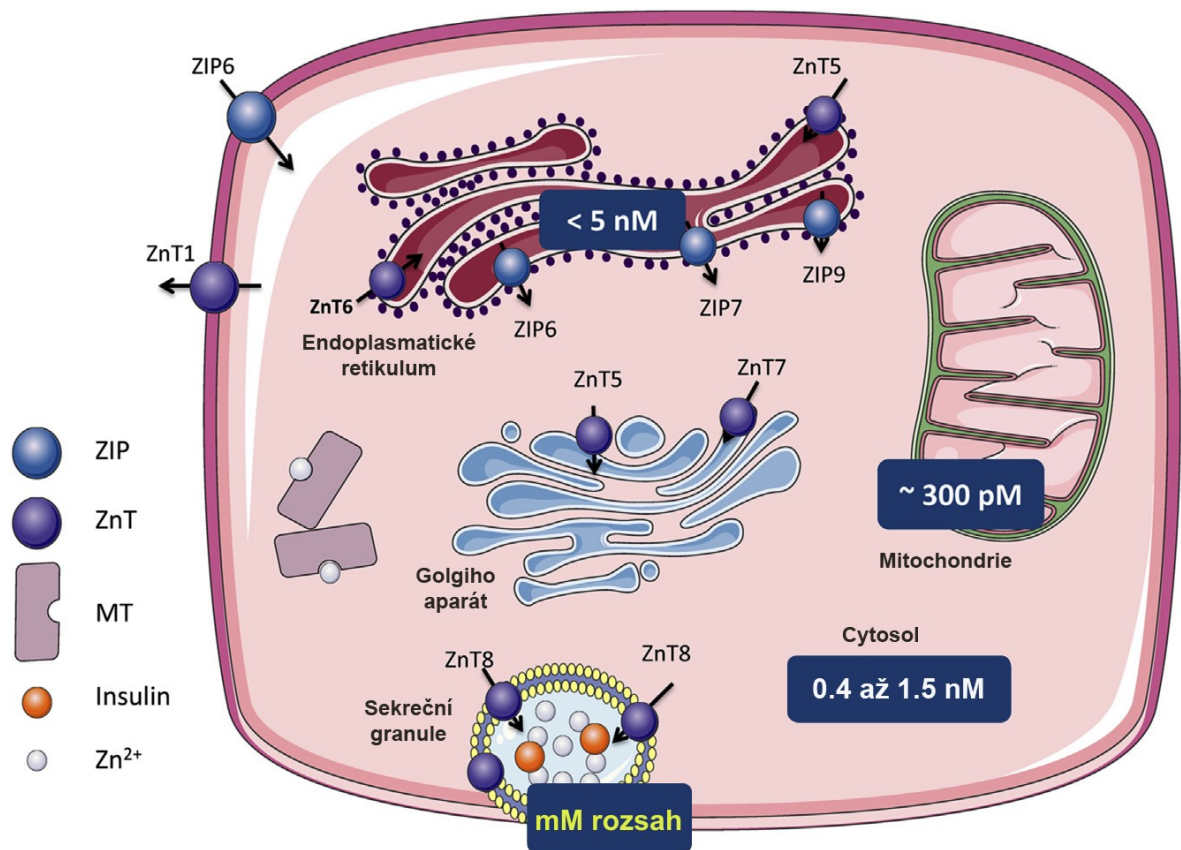
V porovnání s jinými buněčnými typy, pankreatické β -buňky mají výjimečně vysoký obsah zinečnatých iontů⁹⁰, které jsou potřebné pro přípravu, zpracování, skladování a sekreci insulinu⁹¹⁻⁹⁵. V rámci β -buňky je nejvyšší koncentrace Zn^{2+} iontů lokalizována v insulinových sekrečních granulích, které mohou mít až 70% podíl z celkového obsahu tohoto iontu v buňce, a jeho koncentrace zde dosahuje kolem 10-20 mM³⁷. Poměr Zn^{2+} iontů a insulinu v sekreční granuli indikuje, že určitá část zinečnatých iontů je potřebná pro iniciaci krystalizace insulinových hexamerů⁹⁶. Navíc, po stimulaci glukosou, velké množství Zn^{2+} iontů je sekretováno společně s insulinem do extracelulární matrix⁹⁷. Podle některých studií tyto sekretované zinečnaté ionty jsou součástí parakrinní a/nebo autokrinní komunikace buněk Langerhansových ostrůvků – aktivují K_{ATP} kanály⁹⁸ a teda vykonávají negativní kontrolu na sekreční proces⁹⁹, dále regulují uvolňování glukagonu z α -buněk^{98,100}. Zn^{2+} iontů mohou také přispívat k buněčné smrti β -buněk parakrinním mechanismem¹⁰¹.

1.2.1 Homeostaze zinečnatých iontů v buňce – zinkové přenašeče

Množství a lokalizace Zn^{2+} iontů v cytoplasmě je kontrolováno třemi proteiny, konkrétně metalothioneiny a zinkovými přenašeči z rodiny genů *SLC30A* (ZnT) a *SLC39A* (ZIP), které regulují jejich distribuci v buňce¹⁰²⁻¹⁰⁵. Zinkové přenašeče ZIP importují zinečnaté ionty do cytoplasmy z extracelulární matrix, případně z buněčných organel, zatím co ZnT přenašeče

transportují tyto ionty opačným směrem, teda z cytoplasmy do extracelulární matrix a buněčných organel¹⁰⁶. Zatím bylo identifikováno 10 členů ZnT a 14 členů ZIP rodin zinkových přenašečů, kterých exprese je různá v závislosti na tkáni a souvisí se specifickými funkcemi buněk¹⁰⁷. Víceré studie propojují dysfunkci nebo pozměněnou regulaci ZnT a ZIP přenašečů s chronickými nemocmi, jako je obezita (ZIP14), ateroskleróza (ZnT3 a 10), Alzheimerova choroba (ZnT3) a diabetes (ZnT3, 7 a 8)^{108–113}.

V β -buňce Langerhansových ostrůvků se vyskytují víceré zinkové transmembránové přenašeče, viz *obrázek 7* na straně 22. ZnT1 je jediným proteinem této rodiny, který se nachází na plasmatické membráně, kde exportuje Zn^{2+} ionty do extracelulárního prostoru¹¹⁴. Tvoří se zde taky přenašeče ZnT5 a ZnT7, lokalizované na Golgiho aparátu^{115,116}. Nejvýznamnějším zinkovým přenašečem β -buněk je ale ZnT8, který se tvoří výhradně v pankreatu^{117,118}, a je tak jediným proteinem svého druhu s takovou tkáňově specifickou tvorbou¹¹⁹. Jeho úlohou je transport Zn^{2+} iontů z cytosolu do insulinových sekrečních granulí a proto hraje významnou úlohu v skladování insulinu. Jak už bylo zmíněno, druhá rodina zinkových přenašečů, ZIP, transportuje ionty do cytoplasmy z extracelulárního prostoru nebo z organel. Proto většinu těchto proteinů najdeme na plasmatické membráně a dále na membráně jádra, endoplasmatického retikula, Golgiho aparátu (ZIP7, 13, 9); lysosomů a váčků (ZIP13, 3, 8)¹²⁰.



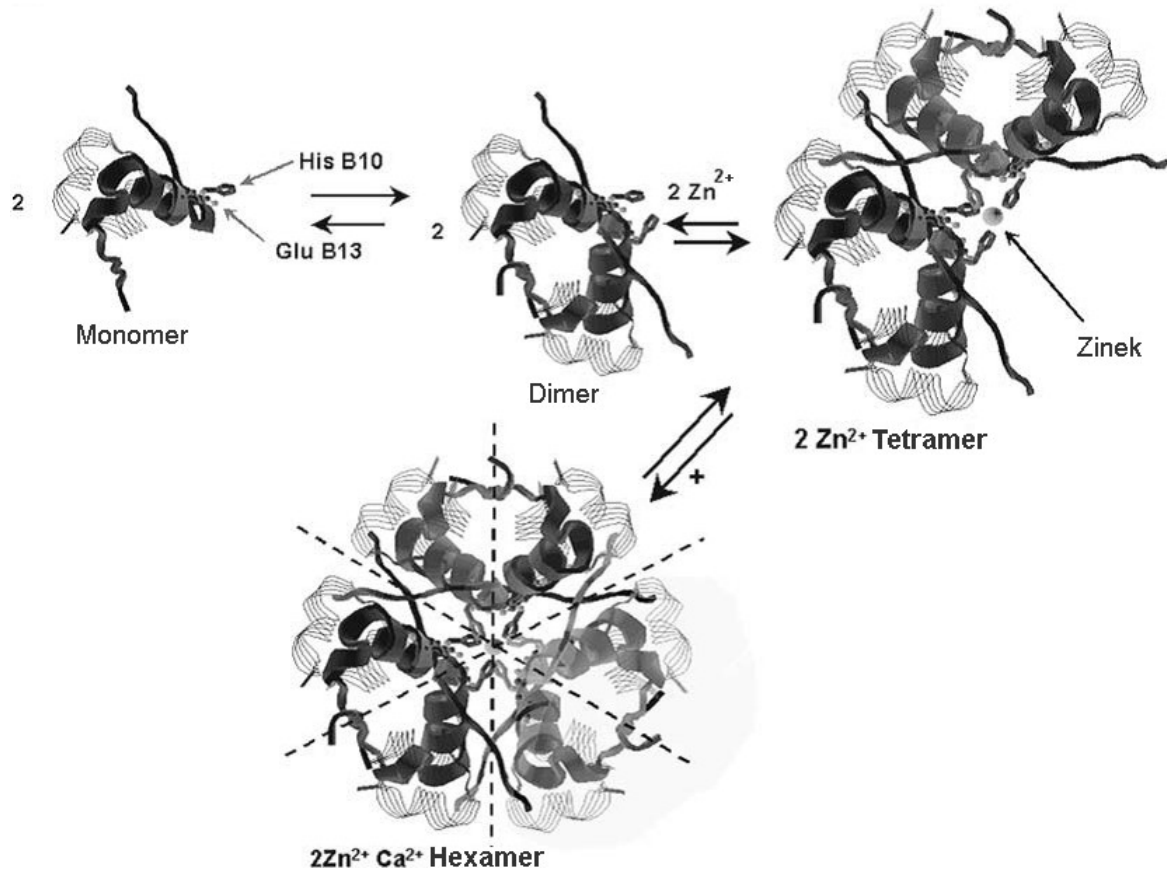
Obrázek 7: Homeostáze Zn^{2+} iontů v β -buňce. Pankreatické β -buňky tvoří vícere zinkové přenašeče ZnT a ZIP, lokalizované na plasmatické membráně nebo v membráně organel, a metalothioneiny (MT) v cytosolu. Obrázek upraven a převzat z cit.¹²¹.

1.2.2 Popis hexameru insulinu

I když je insulin aktivní (ve vazbě na receptor) pouze jako monomer, může tvořit také dimery a v přítomnosti zinečnatých iontů hexamery¹²². V průběhu biosyntézy se nachází ve formě hexameru už proinsulin, konkrétně jako $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Proinsulin})_6$. Tento komplex v sekreční granuli podléhá proteolýze, vyštěpuje se C-peptid, a vzniká tak $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Insulin})_6$. Odstranění C-peptidu mění rozpustnost hexameru a pravděpodobně způsobuje v granuli krystalizaci komplexu $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Insulin})_6$ ¹²³.

Tvorba hexameru (pro)insulinu zahrnuje prvotní formaci dimerů, poté se dva dimery spojí s dvěma Zn^{2+} ionty, čímž vzniká $(\text{Zn}^{2+})_2(\text{Insulin})_4$ tetramer. Připojením dalšího dimeru vznikne hexamer^{124,125}. Monomerní a dimerní insulin nechelatuje silně bivalentní ionty. V tetramerním stavu se to mění, přičemž Zn^{2+} je stabilizován dvěma aminokyselinovými zbytky His B10, v hexameru se přidávají stejné aminokyseliny z posledního dimeru, viz

obrázek 8. Insulin ve formě hexameru má tendenci tvořit mikrokrystalky^{126,127}. Tvorba hexameru a krystalizace stabilizuje insulin a zamezuje tak jeho degradaci v sekreční granuli, kde je skladován²⁵.



Obrázek 8: Schéma složení a rozpadu hexameru insulinu. Struktury jsou zobrazeny podél 3-četné osy symetrie hexameru. Tři pseudo 2-četné osy symetrie hexameru představují přerušované čáry. Převzato z cit.²⁵.

V roce 1989 Kaarsholm a kol. rozpoznali, že hexamer insulinu je alosterickým proteinem, který podléhá ligandem zprostředkovanou konverzí mezi třemi konformačními stavy T_6 , T_3R_3 a R_6 ¹²⁸. Tato konverze je modulována ligandy, nejčastěji malými cyklickými alkoholy jako je například fenol, kresol a resorcinol, ale také již určité ionty jako Na^+ nebo SCN^- dokážou konvertovat hexamer do T_3R_3 stavu¹²⁹. Předpokládá se, že v sekrečních granulích je insulin v T_3R_3 nebo R_6 stavu, které vykazují vyšší stabilitu¹³⁰, ale jak tohoto stavu dosahují, není zatím známo.

Při uvolnění insulinu z β -buňky dochází k zániku krystalu a disociaci hexameru insulinu. Tento proces je zřejmě spuštěný díky (a) změně pH při přechodu ze sekreční granule s pH 5,5 do krve s pH 7,4, která zvyšuje rozpustnost insulinu; (b) ztrátě ligandů kvůli rozředění,

čímž hexamer přechází do méně stabilního T₆ stavu; (c) endogenním chelátorům, kteří odstraní Zn²⁺ ionty a je tak preferována disociace hexameru na monomer²⁵.

1.3 Tvorba insulinu v pankreatických buněčných liniích

Použití primárních β -buněk v biochemickém výzkumu je limitováno dostupností pankreatických Langerhansových ostrůvků a proces izolace homogenní populace β -buněk ještě stále zůstává výzvou. Buněčné linie proto představují příležitost studovat fyziologické a patofyziologické procesy bez použití zvířat a jejich hlavní výhodou je konzistence a reprodukovatelnost výsledků, které se můžou získat použitím skupinky klonálních buněk. Na druhé straně jsou i značné nevýhody stabilních buněčných linií. Například změna vlastností buněk v průběhu dlouhodobé kultivace (schopnost množit se bez limitu díky tumorovému původu); chybí kontakt a tedy interakce buněk navzájem, kterou pozorujeme v normální tkáni; genetická manipulace může pozměnit některé přirozené funkce a odezvy buněk¹³¹.

Většina buněk má konečnou délku života 20-100 generací, ale některé buňky jsou schopny tvořit buněčné linie s nekonečnou životností¹³². Časově ohraničená životnost v kultuře je regulovaná skupinou 10 nebo více genů stárnutí, kterých produkty negativně regulují postup buněčného cyklu. Delece a/nebo mutace v těchto genech, nadměrná exprese nebo mutace jednoho nebo více onkogenů, může dopomoci buňce uniknout negativní kontrole buněčného cyklu a znova exprimovat telomerasu¹³².

Početné transformační přístupy byly použity v posledních 40 letech na překonání stárnutí β -buněk, včetně indukce pankreatických tumorů ozářením¹³³ nebo virovou infekcí¹³⁴, imortalizací β -buněk *in vitro* a vyvinutím transgenních myší s cílenou expresí rekombinantního onkogenů v β -buňkách¹³⁵. Nejúspěšnějším přístupem byla exprese T onkoproteinu viru SV40 (Tag). T antigen viru SV40 je schopný adaptovat primární buňky na kontinuální růst v kultuře a transformovat buňky v kultuře do tumorového stavu¹³⁶.

I když insulinomární buněčné linie mají výhodu bezmezného růstu, mnohé vykazují obrovské rozdíly v jejich schopnosti odpovědět na glukosový stimul sekrecí insulinu v porovnání s normálními β -buňkami. Některé linie produkují značné množství insulinu, až do 30% obsahu klasických β -buněk, a uvolňují ho na základě stimulace glukosou. Ale jenom

pár buněčných linií vykazuje normální reakci na koncentraci glukosy ve fyziologickém rozmezí; většina transformovaných β -buněčných linií je na glukosu hypersenzitivních¹³⁷.

1.3.1 Buněčné linie sekretující insulin

Nejpoužívanější tumorové buněčné linie jsou zářením nebo virem indukované insulinomy. β -hyperplastické buňky odvozené z ostrůvků (β HC) a křeččí pankreatické β -buňky (HIT) byly získané z preneoplastických buněk ostrůvků transformovaných s SV40, poté byly vytvořeny potkaní insulinomární buněčná linie (RIN) a insulinomární linie (INS-1) z ozářených buněk^{138–141}. Ve většině buněčných linií byla sekrece hormonu na začátku vysoká, ale s postupem času se snižovala¹⁴², přičemž kapacita reagovat na glukosu je vysoká pouze při nižších pasážích, tato vlastnost se může později ztratit. Buněčné linie MIN6 (myší insulinomární linie) a INS-1 nejlépe reflektují fyziologické podmínky, když reagují na stimulaci glukosou a exprimují glukokinasu.

Nejrozšířenějšími pankreatickými buněčnými liniemi jsou RIN, MIN, INS-1 a TC. Potkaní insulinomární buněčná linie RINm5F je široce využívaným modelem pro sekreci insulinu a obsahuje kromě tohoto hormonu ještě malé množství glukagonu a somatostatinu. Tyto buňky ale vykazují nepřiměřenou citlivost na glukosu¹⁴³. Další potkaní insulinomární linií je INS-1, která disponuje relativně vysokým obsahem insulinu a schopností odpovědět na glukosový stimul (spojeno s expresí glukosového přenašeče GLUT2 a glukokinasu) v rámci fyziologického rozsahu¹⁴⁴. Myší pankreatická linie MIN6 byla vytvořena z insulinomu transgenních myší exprimujících SV40 T antigen v pankreatických β -buňkách. Tyto buňky sekretují insulin jako odpověď na fyziologický stimul a jsou užitečným nástrojem pro studium mechanismů tohoto procesu¹⁴⁵. Obdobnou technikou jako MIN6 buňky byly vytvořeny i beta-tumorové buňky β TC¹⁴⁶, které mají vlastnosti podobné β -buňkám jen asi do 50. pasáže a nejsou úplně vhodným modelem pro studium sekrece insulinu.

V posledních letech byla snaha vytvořit lidskou pankreatickou buněčnou linii, protože existuje mnoho rozdílů mezi β -buňkami hlodavců a lidí^{147–151}, a model v této podobě dlouho chyběl. V roce 2016 byla publikovaná práce Ravassarda a kol., kteří cílenou onkogenezi v lidské zárodečné pankreatické tkáni vytvořili linií EndoC- β H1, vykazující stabilitu po minimálně 80 pasážích, obsah insulinu 0,48 μ g na milion buněk, tvoří mnohé specifické markery β -buněk a vykazují glukosou indukovanou sekreci insulinu¹⁵². Tato linie by měla být dostupná po dohovoru s autory a zaplacení poplatků. Nám se ovšem linií vyjednat nepodařilo díky nulové odezvě inzerentů.

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo porovnat pankreatické buněčné linie BRIN-BD11 a INS-1E navzájem a s β -buňkami Langerhansových ostrůvků co do množství produkovaného insulinu a obsahu zinečnatých kationtů. Dále bylo cílem izolovat insulinové sekreční granule ze všech tří typů buněk a zjistit, zda INS-1E buňky vykazují glukosou stimulovanou sekreci insulinu.

3 Materiál

3.1 Chemický materiál

Akutasa (Kolagenasa)	Sigma, USA
BSA	Sigma, USA
DMSO bezvodné	Invitrogen, USA
Fetální hovězí sérum	Gibco, USA
Ficoll	Sigma, USA
FluoZin-3AM	Invitrogen, USA
Glukosa	Sigma, USA
HBSS	Sigma, USA
HEPES	Sigma, USA
Hovězí sérový albumin	Invitrogen, USA
Chemiluminiscenční roztok Supersignal [®]	
West FEMTO Max. Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, USA
Kolagenasa	Sigma, USA
Laemmlí vzorkový pufr	Bio-Rad, USA
L-glutamin	Gibco, USA
Médium CMRL	Cellgro, Mediatech, USA
Médium RPMI-1640	Sigma, USA
Médium RPMI-1640 bez glukosy	Gibco, USA
MOPS	Sigma, USA
Nycodenz	Axis-Shield, Norsko
PBS	Invitrogen, USA
Percoll	Sigma, USA
Pluronic F-127	Sigma, USA
PVDF membrána	Millipore, USA
Sacharosa	Sigma, USA
Sensitive Rat Insulin RIA Kit	Millipore, Německo
Serva Blue G	SERVA Electrophoresis, Německo
TPEN	Sigma, USA

Protilátky použité k detekci insulinu:

- Primární protilátka myšního původu Insulin (L6B10) Mouse mAb, Cell Signaling Technology, USA
- Sekundární proti-myší protilátka králičího původu Anti-Mouse IgG (whole molecule) - Peroxidase antibody produced in rabbit, Sigma-Aldrich, Německo

Ostatní běžné chemikálie byly dodány firmami Fluka (Švýcarsko), Invitrogen (USA), Sigma (USA), nebo Thermo Scientific (USA).

Na přípravu pufrů a roztoků byla použita deionizovaná voda MilliQ.

3.2 Biologický materiál

Buněčná linie BRIN-BD11	Darováno Laboratoří Langerhansových ostrůvků, IKEM Praha
Buněčná linie INS-1E	Darováno RNDr. Petrem Ježkem, DrSc. z laboratoře Mitochondriální fyziologie Fyziologického ústavu AV ČR
Potkani Wistar	Darováno Fyziologickým ústavem AV ČR.

3.3 Použité přístroje

CCD kamera ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad, USA
- ovládací program Image-Lab™ Software	
Centrifuga Hettich Universal 320	Schoeller, Německo
Centrifuga CR3i	Jouan, USA
Inkubátor CO ₂ Incubator MCO 180 AIC	Sanyo, Japonsko
Konfokální fluorescenční mikroskop Zeiss LSM 780	Carl Zeiss Microscopy, Německo
- olejově-imersní objektiv Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DIC M27	
- 0,8% 488 nm argonový laser	
- software ZEN 2011	
Laminární box Envair Eco Safe Comfort	Envair L. E., Velká Británie
Průtokový cytometr BD LSRFortessa™	BD Biosciences, Singapur

Přístroj na měření radioaktivity Wizard 1470 Automatic Gamma Counter	Perkin Elmer, USA
Přístroj na přenos proteinů z gelu na membránu Trans Blot SD Cell	Bio-Rad, USA
Spektrofotometr 6105 UV/VIS. Spectrophotometer	Jenway, UK
Spektrometr ICP-OES Spectro Arcos SOP - ovládací software Smart Analyzer Vision - vyhodnocovací ETV modul Smart ChromPro	Spectro A. I., Německo
Světelný mikroskop	Carl Zeiss Microscopy, Německo
Transmisní elektronový mikroskop JeolJem 1011	JEOL, USA
Ultracentrifuga Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge - rotory SW 28, SW 41	Beckman Coulter, USA
Ultramicroton Leica Ultracent EM UC7	Leica Microsystems, Německo
Zdroj na elektroforézu a přenos proteinů z gelu na membránu POWER PAC 1000	Bio-Rad, USA

4 Metody

4.1 Práce s buněčnými liniemi INS-1E, BRIN-BD11 a s potkaními Langerhansovými ostrůvky

Během posledních 30 let bylo mnoho pokusů o vytvoření permanentní buněčné linie, která by měla normální regulaci sekrece insulínu jako Langerhansovy ostrůvky, ale pouze několik buněčných linií je úspěšných. Mezi nejrozšířenější patří RIN, MIN, INS-1 a TC. Naše práce se zaměřila na dvě pankreatické buněčné linie INS-1E a BRIN-BD11, které byly porovnány svými vlastnostmi navzájem, a také s Langerhansovými ostrůvky.

4.1.1 Charakteristika a práce s buněčnou linií INS-1E

V roce 1992 Asfari a kol.¹⁴⁴ připravili buněčnou linii INS-1 z potkaního insulinomu indukovaného rentgenovým zářením, která projevovala mnohé důležité vlastnosti pankreatické β -buňky, konkrétně relativně vysoký obsah insulínu (20% oproti nativním buňkám) a citlivost na glukosu v rámci fyziologického rozsahu.

Neklonální buněčná linie INS-1 však není při dlouhodobé kultivaci stabilní. Byly z ní proto izolovány klonální INS-1E buňky, které jsou stabilním a vhodným modelem β -buněk Langerhansových ostrůvků¹⁵³.

Pro kultivaci linie bylo použito jako základ médium RPMI-1640 s 10% (v/v) fetálním hovězím sérem (FBS), 200 mmol/ml glutaminem, 1 mM pyruvát sodným, 10 mM HEPES, 0,02% (w/v) NaHCO_3 , 100 IU/ml penicilinem a streptomycinem a 50 μM merkaptoethanolem. Buňky byly kultivovány v 75 cm^2 lahvích při 37 °C a 5% atmosféře CO_2 .

Buněčná linie INS-1E byla darována RNDr. Petrem Ježkem, DrSc. z laboratoře Mitochondriální fyziologie Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i.

4.1.2 Charakteristika a práce s buněčnou linií BRIN-BD11

Buněčná linie BRIN-BD11 je relativně nová, pankreatická klonální potkaní linie, která vznikla elektrofúzí normálních pankreatických β -buněk NEDH s nesmrtelnými RINm5F buňkami¹⁵⁴. Linie vykazuje dobrou citlivost na glukosu, exprimuje glukosový přenašeč GLUT2 a enzym glukokinasu. Navíc, BRIN-BD11 buňky jsou citlivé na různé modulatory β -buněk jako neurotransmitery nebo aminokyseliny.

Pro práci s touto buněčnou linií bylo používáno RPMI 1640 médium s 10% fetálním hovězím sérem (FBS), 200 mmol/ml glutaminem a 100 IU/ml penicilinem a streptomycinem. Buňky byly kultivovány v 75 cm² lahvích při 37 °C a 5% atmosféře CO₂.

Buněčná linie BRIN-BD11 byla darována Laboratoří Langerhansových ostrůvků Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze.

4.1.3 Izolace a práce s potkaními Langerhansovými ostrůvky

Langerhansovy ostrůvky se získávaly vždy čerstvé z potkanů Wistar (6-9 měsíců, 650-850 g) kolagenasovou digescí pankreatu, po které následovala separace na diskontinuálním hustotním gradientu. Do žlučovodu potkanů byla zavedená kanyla za stálé anestezie. Po usmrcení bylo do pankreatu vneseno 10 ml (1 mg/ml) kolagenasy, orgán se vyřízl a inkuboval 10 minut při 37 °C za mírného houpání. Kolagenasa byla vymyta dvounásobným oplachem s 50 ml roztoku Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) s 1% fetálním hovězím sérem (FBS), přičemž suspenze se centrifugovala při 130 x g 4 minuty a při 4 °C, supernatant byl odlit a peleta resuspendována v novém HBSS s 1% sérem. Tkáňová suspenze se přefiltrovala přes 500 µm sítko a opět stočila jako za předchozích podmínek. Peleta byla resuspendována v 10 ml roztoku Ficollu o hustotě 1,107 g/ml. Na tuto první vrstvu byla nalita druhá, 10 ml Ficollu o hustotě 1,096 g/ml, třetí 8 ml o hustotě 1,069 g/ml a čtvrtá 8 ml o hustotě 1,037 g/ml. Po 20 minutové centrifugaci při 600 x g při 4 °C byly ostrůvky odebrány z rozhraní mezi druhou a třetí vrstvou do nové zkumavky s 50 ml HBSS s 1% sérem. Dále proběhla 4 minutová centrifugace na 300 x g při 4 °C, peleta byla resuspendována v 50 ml HBSS s 1% sérem a opět stočena na 130 x g, 4 minuty a při 4 °C. Izolované Langerhansové ostrůvky se nakonec resuspendovaly v 5 ml HBSS s 1% sérem a nechaly sedimentovat. Izolace proběhla v spolupráci s Laboratoří Langerhansových ostrůvků Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze.

Potkaní Langerhansovy ostrůvky byly udržovány pro experimenty po dobu maximálně 3 dní v CMRL médiu s 10% FBS, 10 mM HEPES, 2 mM glutaminem, 100 U/ml penicilinem a 100 µg/ml streptomycinem, při 37 °C a 5% atmosféře CO₂.

4.2 Vizuální porovnání buněčných linií INS-1E a BRIN-BD11 a Langerhansových ostrůvků transmisí elektronovou mikroskopií

Z obou buněčných linií byl nasazen 1 milion buněk do 75 cm² kultivační láhve. INS-1E i BRIN-BD11 buňky byly kultivovány v příslušném médiu a v pátý den fixovány. Po

dvojnásobném promytí čistým RPMI-1640 médiem bylo na buňky naneseo 1,7 ml 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M kakodylátovém pufru, necháno 15 minut působit a seškrabáno škrabkou do 1,5 ml mikrozkuřavky. Obsah byl stočen 5 minut na 800 x g (centrifuga CR3i), supernatant odlit a přidán nový 1 ml 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M kakodylátovém pufru.

V případě Langerhansových ostrůvků se postupovalo stejně, ale bylo použito 100 kusů ostrůvků (přibližně 100 000 buněk) a buňky byly točeny 4 minuty na 120 x g (centrifuga CR3i).

Dále se postupovalo stejně; buňky se odstředily, obarvily roztokem 1% osmia ve veronalovém pufru, po promytí se zalily do roztoku 2,5% agarosy (w/v) a dehydratovaly. Vzorek se pak převedl do pryskyřice a rozřezal na 70 nm ultratenké řezy ultramikrotonem Leica Ultracent EM UC7. Nakonec se přidal uranyl acetát a citrát olova. Řezy buněk byly foceny transmisním elektronovým mikroskopem JeolJem 1011 při urychlovacím napětí 80 000 kV. Foceno bylo ve spolupráci s Laboratoří transmisní elektronové mikroskopie Dr. Romany Hadravové (ÚOCHB AV, ČR, v.v.i.).

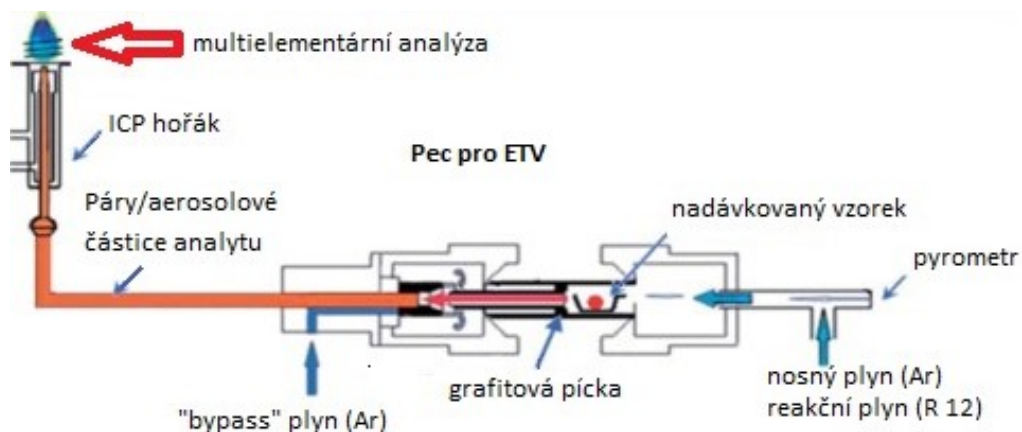
4.3 Určení množství zinečnatých iontů a proteinů v INS-1E, BRIN-BD11 buňkách a buňkách Langerhansových ostrůvků

4.3.1 Příprava INS-1E, BRIN-BD11 buněk a Langerhansových ostrůvků na atomovou emisní spektroskopii

Bylo sklizeno 200 Langerhansových ostrůvků (přibližně 200 000 buněk), 500 000 INS-1E a 500 000 BRIN-BD11 buněk. Všechny buňky byly dvakrát promyty stočením 5 minut při 1000 x g v PBS. Peleta byla resuspendovaná v 100 µl lyzačního pufru (1% TRITON X-100 v 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) a buňky pak lyzovány trojnásobným zmražením a rozmražením v tekutém dusíku. Ve vzorcích bylo určeno množství proteinů a zinečnatých kationtů.

4.3.2 Stanovení množství zinečnatých iontů v buněčném materiálu metodou indukčně vázaného plazmatu s optickou emisí

Množství zinečnatých iontů v buňkách bylo stanovováno metodou indukčně vázaného plazmatu s optickou emisí (ICP-OES), přičemž vzorky byly vnášeny do plazmatu elektrotermickým odpařováním (ETV). Schematické uspořádání systému je uvedeno na obrázku 9 na straně 33.



Obrázek 9: Schematické uspořádání systému ETV-ICP-OES, převzato a upraveno z cit.¹⁵⁵. Principem ETV je v podstatě vypaření vzorku působením vysoké teploty a jeho následný transport do spektrometru. Pevný vzorek je odpařen v elektrické peci, kde teplota může vzrůst až na 3000 °C. Po vypaření je vzorek transformován na těkavější halogenované částice použitím freonu. Díky okolnímu plynu, argonu, se horká para promění na suchý aerosol, který je pak transportován do plasmy v této formě nosným plynem, opět argonem. V plasmě atomy po ionizaci a excitaci emitují elektromagnetické záření, které je měřeno na spektrometru.

Pro měření byl použit ICP-OES spektrometr Spectro Arcos s radiálním pozorováním plazmatu. Přístroj disponuje fixní optikou v Paschenově-Rungeově montáži a sérií polovodičových detektorů (CCD), což umožňuje simultánní snímání analytických čar prvků v rozsahu 130 – 770 nm.

ICP-OES spektrometr a zařízení pro elektrotermické vypařování jsou synchronizovány tzv. trigger-signálem a softwarovými moduly. Spektrometr byl ovládán softwarem Smart Analyzer Vision a k získání dat a vyhodnocení měření pomocí ETV byl použit modul Smart ChromPro.

Zinečnaté ionty byly stanovovány za použití tří analytických čar 213,856; 206,200 a 334,502 nm. Teplotní program obsahoval fázi pyrolýzy (60 s, maximální teplota 600°C) a analytickou fázi (70 s, maximální teplota 2500°C). Konkrétní podmínky měření jsou shrnuty v *tabulce 1* a parametry nastavení odečítání intenzity signálu v *tabulce 2*, obě na straně 34.

Tabulka 1: Podmínky měření metodami ETV-ICP-OES analýzy

Výkon generátoru [W]	1 600
Průtok plazmového plynu [l/min]	1,2
Průtok chladícího plynu [l/min]	15
Průtok nosného Ar v ETV [l/min]	0,140
Průtok „by-pass“ Ar [l/min]	0,380
Průtok modifikátoru R12 [ml/min]	2,0

Tabulka 2: Parametry nastavení odečítání intenzity signálu metodami ETV-ICP-OES. Jsou uvedeny 2 metody, které se používaly v závislosti na množství detekovaného Zn.

	Metoda I – koncentrace jednotky – desítky ppm	Metoda II – sub ppm oblast
Maximální intenzita [cps]	$1,2 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^6$
Frekvence vyčítání vzorků [Hz]	10	10
Integrační interval [ms]	100	100
Počet integrací v každém intervalu	10	1
Celková délka teplotního programu [s]	130	130
Odečítací mód	Časově závislý	Časově závislý

Měření proběhlo v spolupráci s analytickou laboratoří Mgr. Stanislavy Matějkové (ÚOCHB AV ČR, v.v.i.).

4.3.3 Stanovení množství proteinů v INS-1E, BRIN-BD11 buňkách a v Langerhansových ostrůvcích metodou dle Bradfordové

Byly připraveny roztoky:

- *Zásobní roztok Bradfordové:* 100 ml 95% ethanolu, 200 ml 88% kyseliny fosforečné, 350 g Serva Blue G;
- *Pracovní pufr Bradfordové:* 425 ml destilované vody, 15 ml 95% ethanolu, 30 ml 88% kyseliny fosforečné, 30 ml Bradfordové zásobního roztoku.

Vzorky obsahovaly buňky kultivované v kompletním médiu s přibližnou koncentrací 100 000 buněk na 100 μ l média. 10 μ l roztoku s buňkami se zředilo s 90 μ l deionizované vody a 1 ml pracovního pufru Bradfordové, vortexovalo a 2 minuty nechalo stát. Změřila se absorbance při 595 nm proti 100 μ l destilované vody s 1 ml pracovního pufru.

Na základě už hotové kalibrační křivky s BSA se vypočetlo množství proteinů ve vzorcích.

4.4 Supplementace média INS-1E buněk zinečnatými ionty

Ve snaze zlepšit růst buněk a zvýšit tvorbu insulinu byly do kultivačního média linie INS-1E přidány zinečnaté kationty ve formě $ZnCl_2$. Do 6 jamkové destičky byly nasazeny buňky po 1 milionu, přidáno 2 ml kompletního média a pak různé množství Zn^{2+} (viz *tabulka 3*). Vzorky byly připraveny v duplikátech.

Tabulka 3: Množství $ZnCl_2$, kterým bylo obohaceno kompletní médium INS-1E buněk

	0,1 M $ZnCl_2$ [μ l]	Finální koncentrace $ZnCl_2$ [mM]
1	0	0
2	0,4	0,02
3	1,0	0,05
4	2,0	0,10
5	4,0	0,20
6	8,0	0,40
7	12	0,60
8	16	0,80
9	20	1,00

Buňky v jamkách byly foceny na světelným mikroskopem každých 24 hodin a po 72 hodinách byly sklizeny a spočteny. Na závěr bylo z každé jamky s různou koncentrací Zn^{2+} odebráno 100 000 buněk a v nich určeno množství zinečnatých iontů metodou indukčně vázaného plazmatu s optickou emisí (jako v předchozí kapitole 4.3).

4.5 Průkaz přítomnosti (pro)insulinu v INS-1E, BRIN-BD11 buňkách a v Langerhansových ostrůvcích tricinovou-SDS elektroforézou

Tricinová-SDS elektroforéza slouží na dělení a detekci malých proteinů o velikosti 1-100 kDa a je preferována hlavně na rozlišení proteinů menších než 30 kDa, kam patří insulin i proinsulin.

4.5.1 Příprava lyzátů buněk pro elektroforetickou separaci

Pro experiment byly použity buňky INS-1E a BRIN-BD11, které byly tři dny kultivovány v plném médiu s nebo bez supplementace média 50 μ M $ZnCl_2$. Buňky byly sklizeny

a naředěny roztokem Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) na koncentraci 100 000 buněk na 100 µl HBSS. Ve stejné koncentraci byly i Langerhansové ostrůvky, ale v CMRL médiu.

Na gel se nanášela dvě různá množství INS-1E a BRIN-BD11 buněk - 5 µl roztoku buněk se smíchalo se 1,7 µl komerčního vzorkového Laemliho pufru, v případě 10 µl roztoku buněk se přidalo 3,4 µl vzorkového Laemliho pufru. Langerhansovy ostrůvky byly naředěny vodou a také se k nim přidal vzorkový pufr – 0,6 µl roztoku ostrůvků s 4,4 µl vody a 1,7 µl Laemliho pufru; a 1,2 µl roztoku ostrůvků s 3,8 µl vody a 1,7 µl Laemliho pufru. Následně byly buňky lyzovány ultrazvukem, krátce stočeny a zahřáty na 100 °C po dobu 1 minuty.

Pro kontrolu byly připravené roztoky lidského insulinu a hovězího proinsulinu o koncentraci 6,66 ng/ml v 0,033% kyselině octové. Na gel se nanášelo 6,66 ng a 13,33 ng obou proteinů. Vzorky byly krátce stočeny a zahřáty na 100 °C po dobu 1 minuty.

4.5.2 Tricinová-SDS elektroforéza

Separace proteinů z buněčných lyzátů probíhala v polyakrylamidovém gelu. Na jeho přípravu byly použity roztoky uvedeny v *tabulce 4*, které byly vyhotoveny následovně:

- *AB-6*: 46,5 g akrylamidu (6,5 M), 3 g bisakrylamidu (0,2 M) do 100 µl destilované vody
- *AB-3*: 48 g akrylamidu (6,7 M), 1,5 g bisakrylamidu (0,1 M) do 100 µl destilované vody
- *Gelový pufr 3x koncentrovaný*: 3M Tris/Cl pufr s 0,12% (w/v) SDS o pH 8,4

Tabulka 4: Složení polyakrylamidového gelu pro tricinovou elektroforézu. APS je persulfát amonný, TEMED je N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin,

	16% separační gel	10% separační gel	4% ředící gel
AB-6 [ml]	2,5	-	-
AB-3 [ml]	-	0,6	0,25
Gelový pufr [ml]	2,5	1	0,75
3M močovina [ml]	2,5	-	-
Voda [ml]	-	1,4	2
10% APS [µl]	25	15	22

TEMED [μl]	3	2	2
-------------------	---	---	---

Polyakrylamidový gel se naléval postupně, 16% separační, 10% separační (1 cm vrstva) a 4% ředící gel (1,5 cm vrstva).

Elektroforéza byla prováděna v 0,1M Tris/chloridovém anodovém pufru s 0,1% (w/v) SDS, pH 8,45; a 0,1 M Tris/0,1 M tricínovém katodovém pufru s 0,1% (w/v) SDS. Separace běžela prvních 10 minut při konstantním napětí 100 V a limitním proudu 24 mA, potom při konstantním napětí 200 V a limitním proudu 48 mA (přibližně 90 minut).

4.5.3 Imunochemická detekce proteinů

Proteiny z gelu byly přeneseny na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu pomocí tzv. metody přenosu (angl. „blotting“). Po dokončení elektroforetické separace byly gely 30 minut inkubovány v Towbin transferovém pufru bez SDS (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol (v/v)). PVDF membrána byla 15 sekund aktivována v methanolu, opláchnuta deionizovanou vodou a následně 20 minut ponechány v transferovém pufru. Filtrační papíry byly taktéž nasáknuty tímto puftrem a následně byl sestaven „přenosový sendvič“. Přenos probíhal přes noc v přístroji pro polosuchý přenos při konstantním napětí 12 V, limitní proud byl nastaven na 0,4 mA/cm² (přibližně 17 hodin).

Druhý den byla volná místa na membráně hodinu blokována v 5% BSA v T-TBS (20 mM Tris/Cl⁻ (pH 7,5) 140 mM NaCl; 0,1% Tween-20 (v/v)). Membrána byla promyta T-TBS třikrát 5 minut za mírného houpání a inkubována přes noc s primární protilátkou (Insulin (L6B10) Mouse mAb, Cell signalling; ředění protilátky 1:1000 v 5% BSA v T-TBS). Další den byla membrána 3x promyta v T-TBS na 5 minut a inkubována v sekundární proti-myší protilátce 1 hodinu (ředění 1:2000 v 5% BSA v T-TBS), která byla konjugovaná s křenovou peroxidasou. Nakonec se membrána promyla T-TBS třikrát 5 minut a jednou 10 minut, aplikoval se chemiluminiscenční roztok SuperSignal West Femto Maximum, který se nechal působit 2 min. Chemiluminiscenční signál byl detekován CCD kamerou ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) s expozičním časem 8 s. Intenzita proužků byla kvantifikována v programu Image-Lab™ Software, který je součástí ovládacího systému kamery.

4.6 Stanovení množství Zn^{2+} v buňkách INS-1E, BRIN-BD11 a buňkách Langerhansových ostrůvků průtokovou cytometrií

4.6.1 Příprava zásobních roztoků fluorescenční značky pro průtokovou cytometrii

Komerční permeabilní fluorescenční značka FluoZin-3AM vázající se na zinečnaté kationty byla rozpuštěna v 50 μ l bezvodného DMSO (1 mM zásobní roztok). Z tohoto roztoku byly připraveny aliquoty, které se skladovaly ve tmě při -20 °C. FluoZin-3AM má excitační maximum 494 nm a emisní maximum 516 nm.

Neiontové činidlo Pluronic F-127 pomáhá prostupu fluorescenční značky plasmatickou membránou. 0,2 g tohoto činidla bylo rozpuštěno v 1 ml bezvodného DMSO, čím se vytvořil 20% zásobní roztok.

Pro experimenty zahrnující průtokovou cytometrii a konfokální fluorescenční mikroskopii byla ze zásobních roztoků připravena směs 5 μ l 1 mM FluoZin-3AM a 7 μ l 20% Pluronic F-127, která se pak aplikovala na buňky.

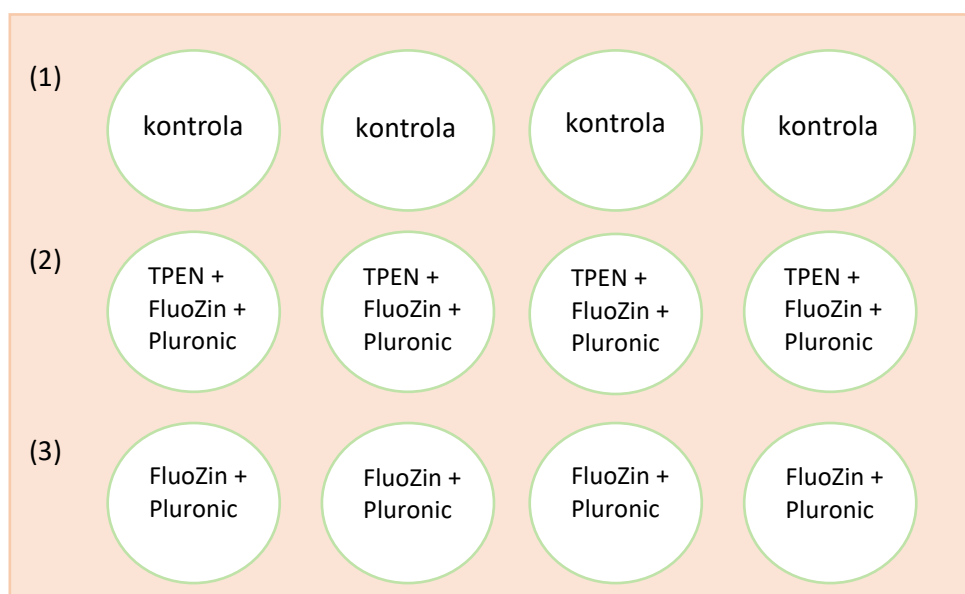
TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethyléndiamin) je permeabilní a membránou propustný chelátor zinečnatých iontů. Byl připraven zásobní 25 mM roztok v bezvodném DMSO.

4.6.2 Příprava buněk na průtokovou cytometrii

Z každé buněčné linie byla nasazená 12-jamková destička se 100 000 buňkami na jamku. Po třech dnech byly buňky promyty médiem RPMI-1640, trypsinizovány a do každé jamky byl přidán 0,5 ml roztoku Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS). Obsah jamek byl přenesen do mikrozkuvek a spočetlo se množství buněk v každé jamce, resp. mikrozkuvce. Buňky pak byly dvakrát promyty HBSS pufrem (stočené 5 minut na 1000 x g při 4 °C (centrifuga CR3i), supernatant odebrán, přidán nový HBSS pufr) a nakonec byl přidán takový objem pufru, aby výsledná koncentrace byla 100 000 buněk na 100 μ l HBSS pufru.

Langerhansovy ostrůvky byly rozdisociovány akutásou (kolagenasa). Po přidavku 1 ml enzymu se nechala směs stát 15 minut za laboratorní teploty a občas se promíchala. Pak proběhla 4 minutová centrifugace na 120 x g (centrifuga Hettich Universal 320). Supernatant se vylil a opět se přidal 1 ml aktuázy, počkalo se 15 minut a obsah se stočil za stejných podmínek. Po vylití supernatantu bylo k rozdisociovaným ostrůvkům přidáno 3 ml CMRL média, buňky byly spočteny, taktéž promyty HBSS pufrem (popsáno výše) a nakonec naředěné na koncentraci 100 000 buněk na 100 μ l HBSS pufru.

Podle schématu níže (*obrázek 10*) byly ke všem typům buněk přidány látky uvedené ve vyznačených jamkách:



Obrázek 10: Schéma experimentu pro průtokovou cytometrii. Vzorke byly připraveny v tetraplikátech; (1) kontrola – bez fluorescenční značky a bez TPEN; (2) k buňkám přidán chelátor TPEN o výsledné koncentraci 50 nM a fluorescenční značka s Pluronicem o výsledné koncentraci 5 μ M FluoZin-3AM; (3) k buňkám přidána fluorescenční značka s Pluronicem o výsledné koncentraci 5 μ M FluoZin-3AM.

Nejprve se k příslušným buňkám přidal chelátor Zn^{2+} iontů TPEN (výsledná koncentrace 50 nM), směs se 30 minut inkubovala na ledu. Pak byla přidána fluorescenční značka FluoZin-3AM s činidlem Pluronic F-127 (koncentrace značky 5 μ M) a směs se inkubovala 30 minut ve tmě na ledu.

Po inkubaci bylo vše opět 2x promyto HBSS pufrem (stočené 5 minut na 1000 x g při 4 °C (centrifuga CR3i), supernatant odebrán, přidán nový HBSS puf) a 100 μ l (s přibližně 100 000 buňkami) z každého vzorku napipetováno do 96-jamkové destičky s kulatým dnem.

Vzorke byly měřeny na průtokovém cytometru BD LSRFortessa™ za podmínek uvedenými v *tabulce 5* (strana 40). Množství nabírané buňkové suspenze bylo nastaveno tak, aby bylo možné změřit 10 000 událostí na každou jamku. Také byly nastaveny hranice přímého a kolmého rozptylu, aby se zajistilo počítání jen živých buněk. Fluorescence byla detekována v rozmezí 488 – 530 nm.

Tabulka 5: Podmínky měření na průtokovém cytometru BD LSRFortessa™

Rychlost průtoku vzorku [$\mu\text{l/s}$]	3
Objem vzorku [μl]	40
Míchací objem [μl]	30
Rychlost míchání [$\mu\text{l/s}$]	200
Počet míchání	4
Objem oplachu [μl]	800
Typ laseru [nm]	488

4.7 Detekce Zn^{2+} v buňkách INS-1E, BRIN-BD11 a buňkách Langerhansových ostrůvků konfokální fluorescenční mikroskopii

INS-1E, BRIN-BD11 buňky a buňky Langerhansových ostrůvků byly nasazeny na 4-komůrkové 35 mm misky se skleněným dnem. INS-1E a BRIN-BD11 buňky byly tři dny kultivovány v kompletním RPMI-1640 mediu a rozdisociované buňky Langerhansových ostrůvků byly den kultivovány v misce s CMRL mediem. Pak bylo medium odebráno a buňky se dvakrát promyli Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) roztokem a do jedné komůrky byl přidán 25 mM roztok TPEN v bezvodném DMSO (konečná koncentrace 50 nM TPEN), což se inkubovalo 30 minut při laboratorní teplotě. Pak se do dvou komůrek přidala fluorescenční značka FluoZin-3AM s činidlem Pluronic F-127 (výsledná koncentrace značky 5 μM) a opět inkubovalo 30 minut ve tmě za laboratorní teploty. Směs byla odebrána a buňky omyté HBSS roztokem.

Následně byly buňky foceny Zeiss LSM 780 konfokálním mikroskopem, přičemž se používal olejově-imersní objektiv (Plan-Apochromat 63 \times /1.40 Oil DIC M27). Fluorescenční obrázky byly sbírány za laboratorní teploty použitím 0,8% 488 nm argonového laseru (maximální výkon 25 mW) pro excitaci a emisní spektrální detektor v rozmezí vlnových délek 508-552 nm (napětí na detektoru 800 V). Všechny snímky byly vyfoceny při stejných nastaveních mikroskopu. Konfokální fluorescenční mikroskop byl ovládán a obrázky byly zpracovávány softwarem ZEN 2011.

4.8 Izolace insulinových sekrečních granulí

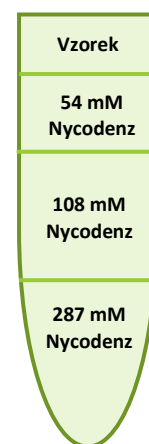
Insulinové sekreční granule byly izolovány ze všech třech typů buněk – INS-1E, BRIN-BD11 a buněk Langerhansových ostrůvků. Izolace probíhala podle stejného postupu a po celý čas byl buněčný materiál držen na ledu.

Buňky byly nejdřív omyty PBS a poté seškrábány v studeném PBS, stočeny 5 minut při 800 x g (centrifuga Hettich Universal 320) a supernatant byl vylit. Peleta byla homogenizována v SMT pufru (0,27M sacharosa, 10mM MOPS, 1M Tris, pH 6,8) pomocí jehly: 21-G třikrát a 25-G třikrát. Pak proběhla centrifugace 5 minut při 1000 x g (centrifuga CR3i). Supernatant byl dán do nových zkumavek a peleta byla opět homogenizována v SMT pufru třikrát 21-G a pětkrát 25-G jehlou. Vzorek byl znova centrifugován 5 minut při 1000 x g (centrifuga CR3i) a supernatant byl přidán k předešlému.

Shromážděný supernatant byl centrifugován 10 minut při 1000 x g (centrifuga CR3i) a tím byl získán postnukleární supernatant (PNS). Následovala vícenásobná ultracentrifugace na přístroji Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge. PNS byl ultracentrifugován 20 minut při 24 700 x g (rotor SW 28), čímž došlo k separaci organel od cytosolu. Peleta byla resuspendována v SMT pufru a dána na diskontinuální gradient Nycodenzu (*obrázek 11*) ve třech vrstvách:

1. 4 ml: 287 mM Nycodenz, 37,5 mM sacharosa, 10 mM MOPS, pH 6,6
2. 4 ml: 108 mM Nycodenz, 170 mM sacharosa, 10mM MOPS, pH 6,6
3. 2,5 ml: 54 mM Nycodenz, 210 mM sacharosa, 10mM MOPS, pH 6,6
4. Zbytek zkumavky doplněn vzorkem (peleta) v SMT pufru;

A výsledný vzorek byl ultracentrifugován 75 minut při 107 000 x g (rotor SW 41).



Obrázek 11: Schéma diskontinuálního hustotního gradientu Nycodenzu.

Granulová frakce v třetině zkumavky byla odsáta, rozředěna SMT pufrem (na 10 ml) a přidána do nové ultracentrifugační zkumavky s 5 ml 27% Percollu v SMT. Směs byla točena 45 minut při 35 000 x g (rotor SW 41).

Insulinová granulová frakce v nejhlubší části zkumavky byla poté odebrána a rozředěna SMT pufrem a centrifugována 20 minut na 25 000 x g kvůli oddělení zbytků Percollu. Peleta byla nakonec přendána do mikrozkušavky a uschována.

Suspenze granul nakonec byla dána na síťku s uhlíkovým povrchem a obarvená 2% fosfowolframovou kyselinou pro tzv. negativní barvení. Granule byly foceny transmisním elektronovým mikroskopem JeolJem 1011 při urychlovacím napětí 80 000 kV. Focení probíhalo ve spolupráci s Laboratoří transmisní elektronové mikroskopie Dr. Romany Hadravové (ÚOCHB AV, ČR, v.v.i.).

Aby se prokázalo, že byla odebírána správná část roztoku po ultracentrifugaci na gradientu Nycodenzu a Percollu, byl obsah zkumavek rozdělen po 1 ml a přítomnost (pro)insulinu ověřena tzv. „dot blotem“.

4.9 Stanovení insulinu tzv. „dot blotem“

Pro ověření, že granulová frakce buněk se nachází v odebírané části po ultracentrifugaci na gradientu Nycodenzu a Percollu, byl obsah zkumavek po těchto krocích rozdělen na 1 ml části, ve kterých pak byla zjišťována přítomnost insulinu metodou tzv. „dot blotu“.

Polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána byla 15 sekund aktivována v methanolu a krátce opláchnuta vodou. Potom byla membrána nechána uschnout (přibližně 10 až 15 minut). Následně byly nanесeny vzorky o objemu 5 μ l (získány byly v průběhu izolace granulové frakce z INS-1E buněk), jako kontrola byl použit lidský insulin a Langerhansovy ostrůvky. Po sorpci vzorků do membrány proběhla hodinová blokáce volných míst na membráně 5% BSA v T-TBS. Následně byla membrána 3x 5 minut promyta T-TBS (20 mM Tris/Cl⁻ (pH 7,5), 140 mM NaCl; 0,1% Tween-20 (v/v)) za mírného houpání.

PVDF membrána byla inkubována s primární protilátkou (Insulin (L6B10) Mouse mAb, ředění 1:1000 v 5% BSA v T-TBS) přes noc v chladu za mírného houpání. Druhý den ráno se membrána 3x 5 minut promyla T-TBS a hodinu inkubovala se sekundární proti-myší protilátkou (ředění 1:20000 v 5% sušeném mléku v T-TBS). Následoval opět oplach T-TBS, a to 3x 5 minut a 1x 10 minut. Nakonec byl signál detekován pomocí chemiluminiscenčního roztoku SuperSignal West Femto Maximum, s kterým se membrány inkubovali 2 minuty. Při focení CCD kamerou ChemiDoc MP Imaging System byl expoziční čas 10 s. Intenzita proužků byla kvantifikována v programu Image-LabTM Software, který je součástí ovládacího systému kamery.

4.10 Stanovení množství sekretovaného insulinu INS-1E buňkami radioimunoesejí (RIA)

INS-1E, BRIN-BD11 buňky i Langerhansovy ostrůvky vykazují tzv. sekreci insulinu indukovanou glukosou. Tato vlastnost, množství sekretovaného insulinu, byla pozorována a kvantifikována radioimunoesejí (RIA), konkrétně na INS-1E buňkách. RIA je senzitivní kompetitivní technika na stanovení antigenu, v tomto případě insulinu, v roztoku za využití protilátek.

Do 24-jamkové destičky bylo nasazeno 100 000 INS-1E buněk na jamku s 1 ml kompletního média. Třetí den bylo kompletní médium odebráno, buňky promyty a pak 2 hodiny inkubovány s RPMI 1640 médiem bez glukosy při 37 °C a 5% atmosféře CO₂. Následně byly buňky 2x promyty Krebs-Ringer HEPES pufrem (KRBH) o složení 20mM HEPES, 119 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM NaHCO₃, 4,6 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0,4 mM KH₂PO₄, 0,15 mM Na₂HPO₄, 0,05% BSA, pH 7,4. V tomto pufru byly buňky předinkubovány hodinu při 37 °C a 5% CO₂. Poté byly INS-1E buňky schlazeny na ledu a k nim přidáno různé množství glukosy o konečné koncentraci 0 mM, 2 mM, 8 mM, 15 mM, 25 mM a 50 mM glukosa (vše bylo připraveno v tetraplikátech). Buňky byly s glukosou v médiu inkubovány 30 minut nesterilně, pufr byl pak odebrán do mikrozkušavek a stočen 5 minut na 500 x g a při 4°C (centrifuga CR3i). Dále se postupovalo dle protokolu k *Sensitive Rat Insulin RIA Kit*.

Precipitovaný produkt byl nakonec centrifugován 20 minut na 3000 x g při 4 °C na centrifuze CR3i, supernatant odlit a radioaktivita pelet měřena na přístroji Wizard 1470 Automatic Gamma Counter.

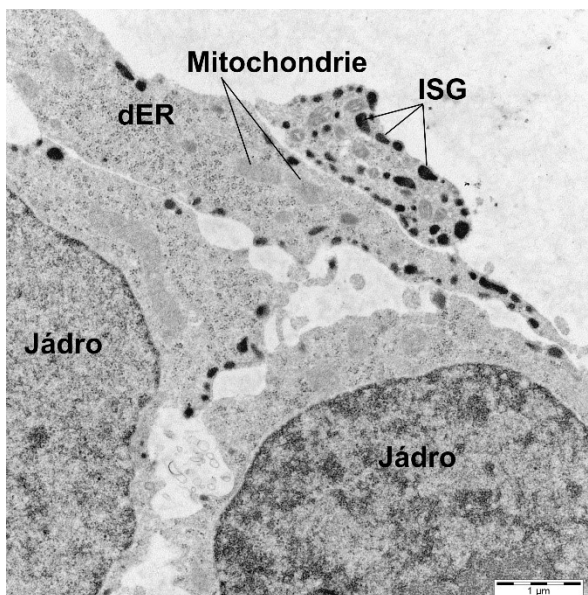
5 Výsledky

5.1 Porovnání vzhledu buněk INS-1E, BRIN-BD11 a Langerhansových ostrůvků transmisí elektronovou mikroskopií

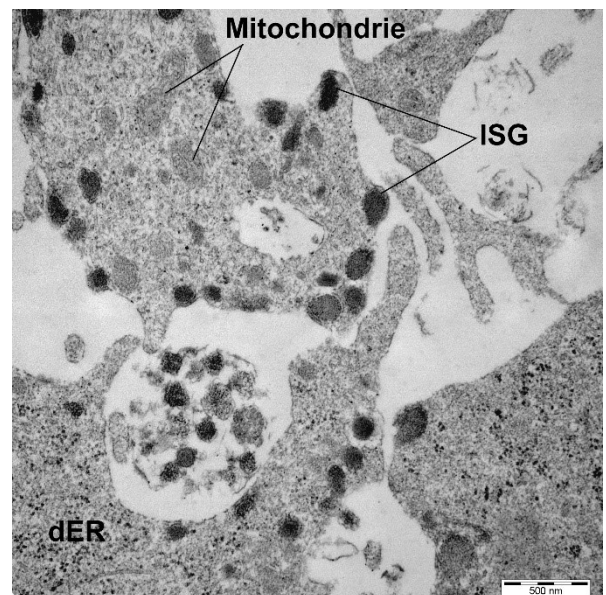
Všechny typy buněk byly fixovány, obarvené osmiem, zalité agarosou a rozřezané na ultratenké řezy (blíže popsáno v kapitole 4.2). Řezy buněk byly foceny transmisním elektronovým mikroskopem JeolJem 1011 při urychlovacím napětí 80 000 kV. Snímky buněk jsou uvedeny na *obrázku 12*, na straně 44 a 45.

Foceno ve spolupráci s Laboratoří transmisní elektronové mikroskopie Dr. Romany Hadravové (ÚOCHB AV, ČR, v.v.i.)

INS-1E buňky

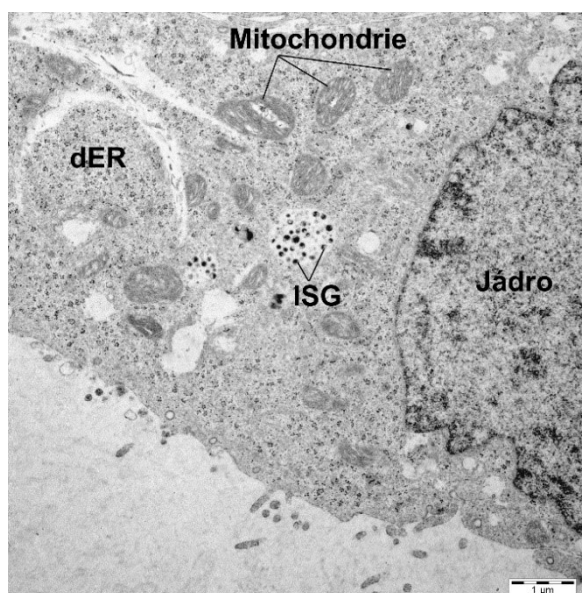


Zvětšení 20 000 x

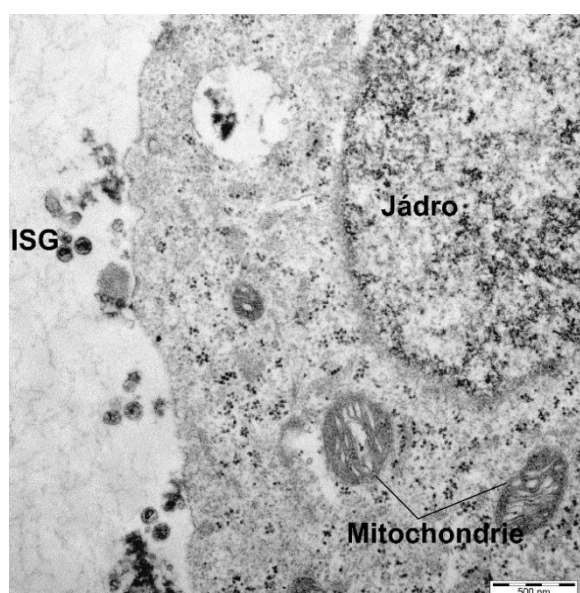


Zvětšení 40 000 x

BRIN-BD11 buňky

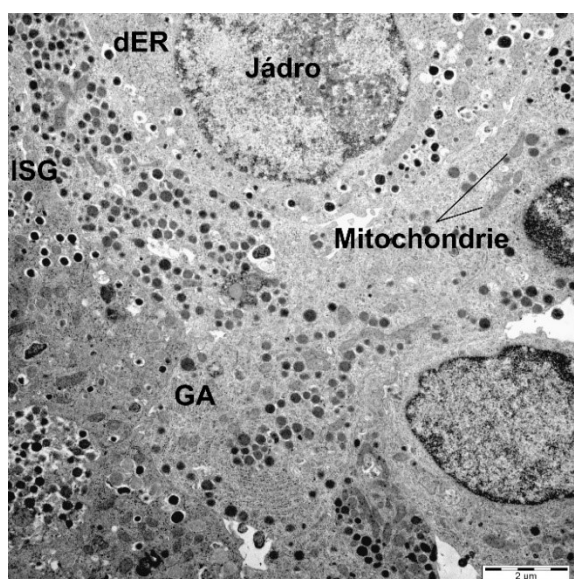


Zvětšení 15 000

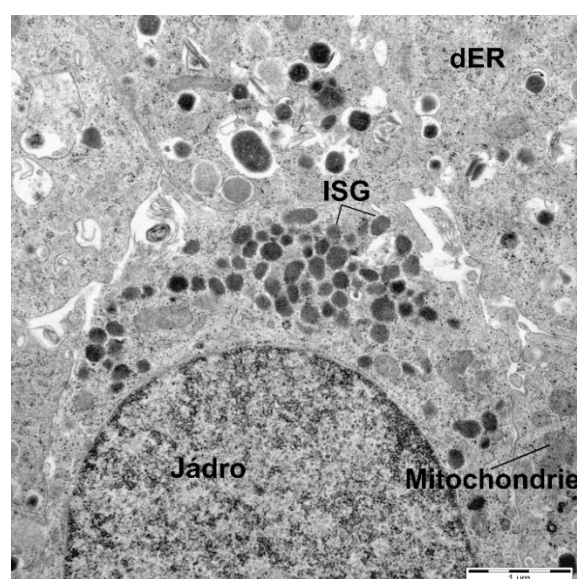


Zvětšení 40 000

Langerhansovy ostrůvky



Zvětšení 10 000



Zvětšení 25 000

Obrázek 12: Fotky INS-1E, BRIN-BD11 buněk a buněk Langerhansových ostrůvků pořízené transmisním elektronovým mikroskopem JeolJem 1011. Nahoru jsou INS-1E buňky, v střední části BRIN-BD11 buňky a dolu buňky Langerhansových ostrůvků. Pod každým obrázkem je uvedené použité zvětšení. ISG – insulinové sekreční granule, dER – drsné endoplasmatické retikulum, GA – Golgiho aparát.

5.2 Množství zinečnatých iontů a proteinů v buňkách INS-1E, BRIN-BD11 a v Langerhansových ostrůvcích určeno atomovou emisní spektroskopií

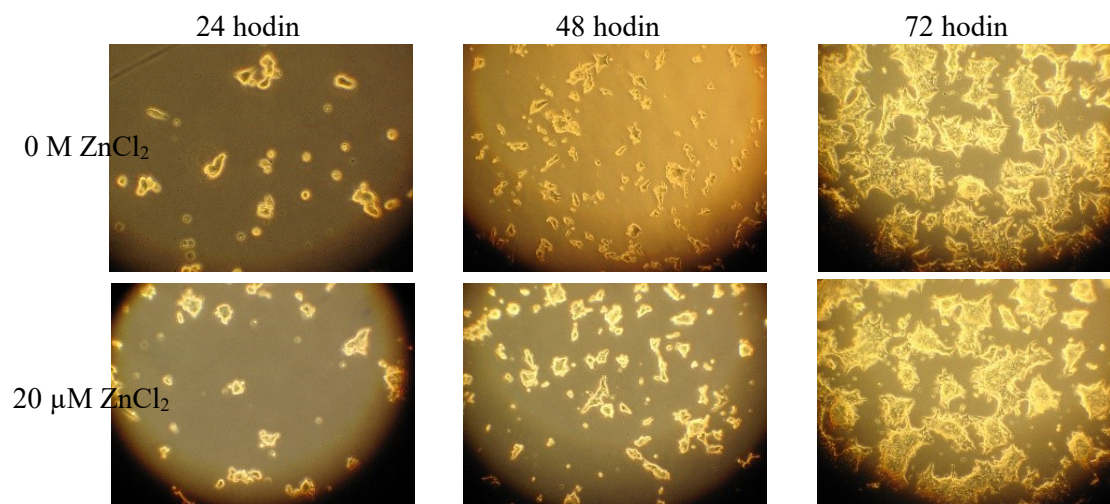
500 000 buněk z obou linií, INS-1E a BRIN-BD11, a 200 Langerhansových ostrůvků bylo lyzováno a ve vzorcích bylo určeno množství proteinů dle Bradfordové. Množství Zn^{2+} iontů bylo stanoveno metodou indukčně vázaného plazmatu s optickou emisí (ICP-OES), podrobněji viz kapitolu 4.4. Výsledky jsou uvedeny v *tabulce 6*.

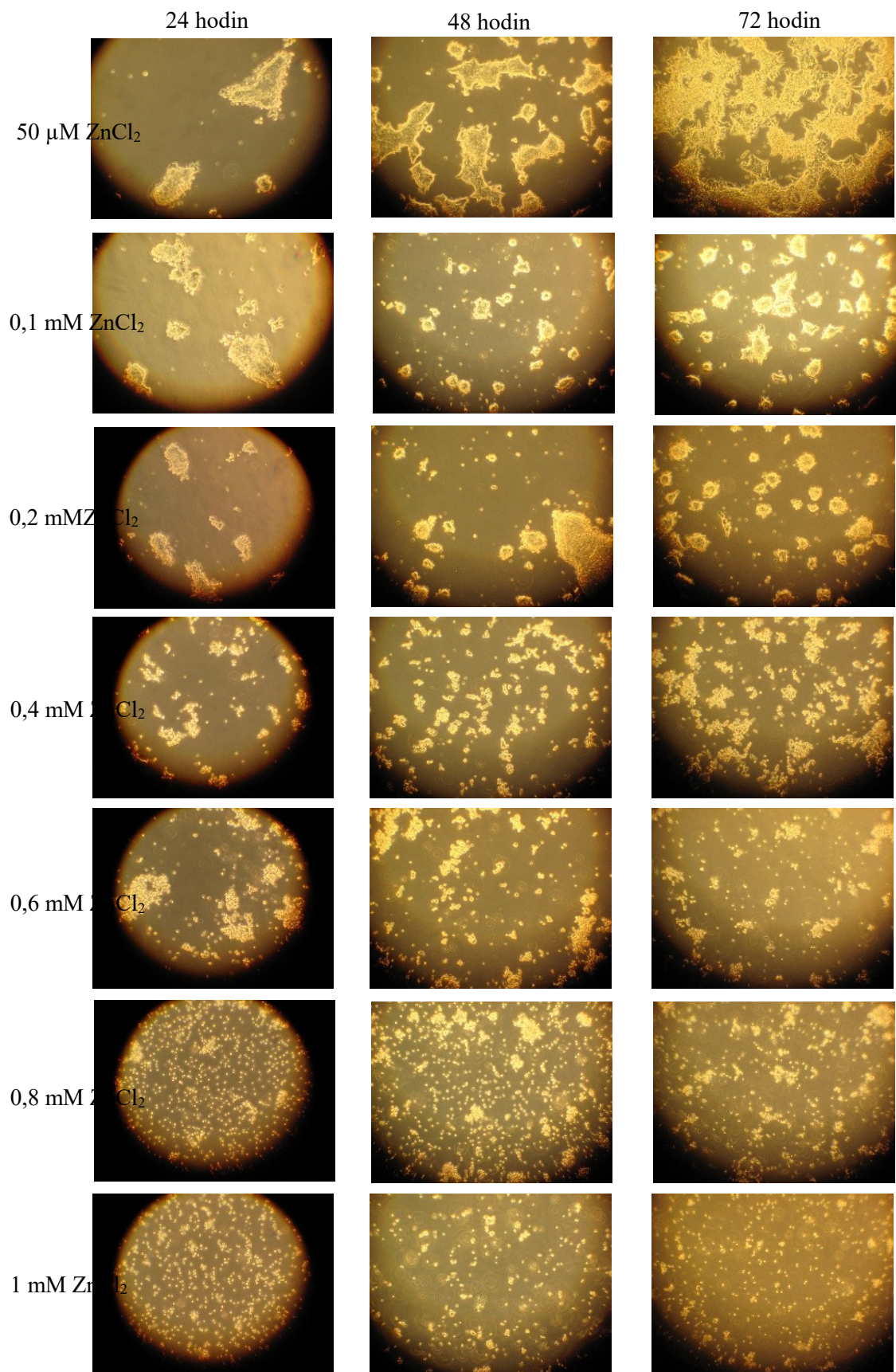
Tabulka 6: Množství zinečnatých iontů v buňkách INS-1E, BRIN-BD11 a v buňkách Langerhansových ostrůvcích bylo určeno metodou ICP-OES. Získané výsledky byly přepočítány na koncentraci Zn^{2+} iontů v 1 μg proteinů daného typu buňky.

Typ buňky	Koncentrace Zn^{2+} v 1 μg proteinů [$\mu g/l$]
INS-1E	46,5
BRIN-BD11	20,0
Langerhansové ostrůvky	69,4

5.3 Suplementace média INS-1E buněk zinečnatými ionty

Do kompletního média INS-1E buněk bylo přidáno různé množství $ZnCl_2$, aby se zjistil vliv množství zinečnatých iontů na růst buněk a případně na tvorbu insulinu (viz kapitolu 5.4). Buňky byly kultivovány 72 hodin v daných podmínkách a každých 24 hodin foceny při stejném zvětšení (*obrázek 13* na stranách 46 a 47). Po třech dnech byly buňky spočteny a zjišťovalo se množství Zn v 100 000 buňkách atomovou emisní spektroskopií. Získaná data jsou uvedeny v *tabulce 7* a vyneseny do grafu na *obrázku 14*, oba na straně 48.



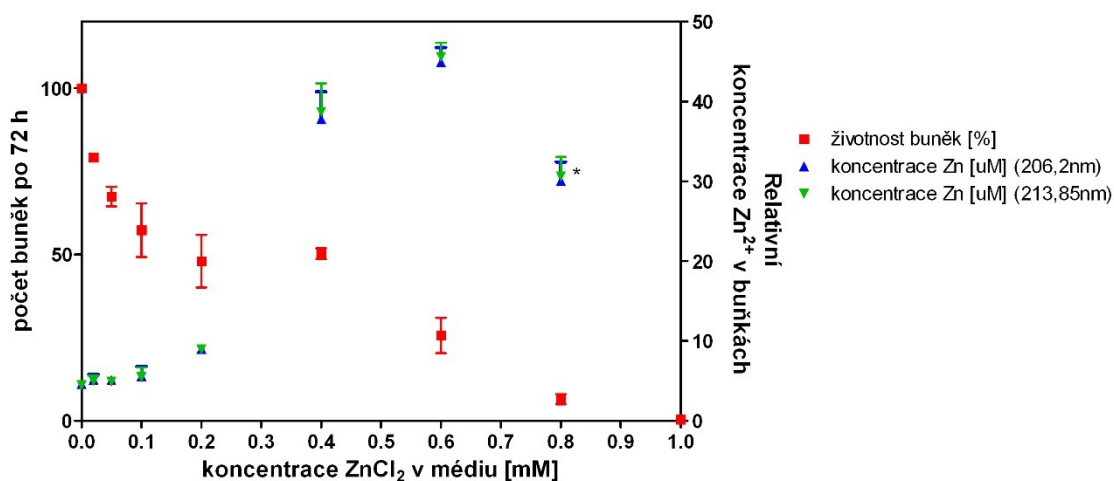


Obrázek 13: INS-1E buňky foceny světelným mikroskopem každých 24 hodin po dobu tří dní. Vlevo je uvedena koncentrace ZnCl_2 v médiu.

Tabulka 7: Množství INS-1E buněk sklizených po 72 hodinové kultivaci s různou koncentrací $ZnCl_2$ v médiu a množství Zn^{2+} iontů na 100 000 buněk získáno metodou indukčně vázaného plazmatu s optickou emisí.

Koncentrace $ZnCl_2$	Počet buněk po 72 h (průměr)	Koncentrace Zn^{2+} [μM], měřeno při 206,2 nm	Koncentrace Zn^{2+} [μM], měřeno při 213,856 nm
kontrola	2 205 000	4,615	4,465
20 μM	1 747 500	5,145	4,980
50 μM	1 492 500	5,080	4,950
0,1 mM	1 260 000	5,615	5,475
0,2 mM	1 065 000	9,025	8,940
0,4 mM	1 110 000	37,770	38,695
0,6 mM	562 000	44,925	45,615
0,8 mM	142 500	30,075	30,615
1 mM	9 000	-	-

Životnost INS-1E buněk (počet buněk po 72 hodinách) v závislosti na koncentraci $ZnCl_2$
Koncentrace Zn v buňkách [μM]



* diskutabilní měření kvůli malému počtu buněk

Obrázek 14: Životnost INS-1E buněk (počet buněk po 72 hodinách) v závislosti na koncentraci $ZnCl_2$.

Koncentrace Zn^{2+} iontů v buňkách se výrazně zvýšila až při 0,4 mM $ZnCl_2$ v médiu a dosáhla maximum při 0,6 mM $ZnCl_2$. Na druhou stranu se zvyšující se koncentrace zinečnatých kationtů v médiu se stávala pro buňky toxická a nebyly schopné dostatečně růst. Proto se v následujících experimentech v případě kultivace buněk s přidavkem zinečnatých kationtů používal 50 μM $ZnCl_2$.

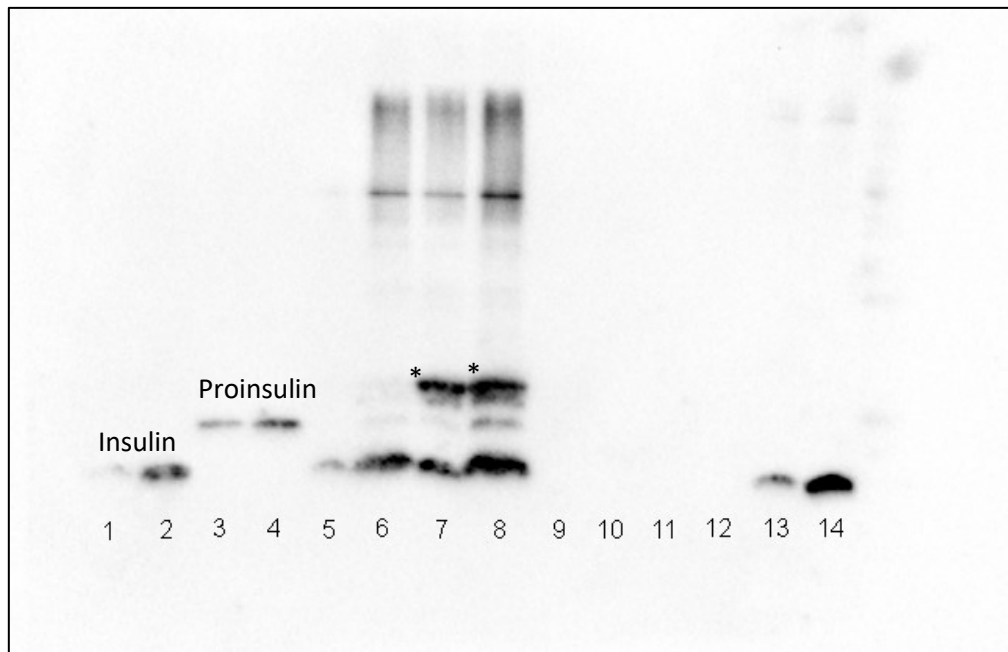
5.4 Stanovení přítomnosti pro/insulinu v buňkách tricínovou-SDS elektroforézou a imunochemickou detekcí

Z roztoku o koncentraci 100 000 buněk na 100 μl Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) roztoku byly připraveny buněčné lyzáty. Proteiny z nich byly separovány tricínovou-SDS elektroforézou a přeneseny na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu pomocí tzv. metody přenosu (angl. „blotting“). Proinsulin a insulin byly detekovány protilátkami a konečný signál detekován CCD kamerou ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). Intenzita proužků byla kvantifikována v programu Image-Lab™ Software.

Na *obrázku 15* (strana 50) je vyfocena PVDF membrána se vzorky, jejich obsah a pořadí je uvedeno v *tabulce 8*. Pozorovali jsme, že BRIN-BD11 buňky tvoří příliš málo pro/insulinu, aby mohl být detekován. INS-1E buňky produkují kromě insulinu také proinsulin a jim podobné, větší molekuly (zřejmě např. dimer insulinu). V Langerhansových ostrůvcích pozorujeme jenom přetvořený, zralý insulin.

Tabulka 8: Pořadí vzorků na PVDF membráně (*obrázek 15*, strana 50) a množství naneseného materiálu.

1 6,66 ng lidského insulinu	8 10 μl INS-1E buněk se zinkem
2 13,33 ng lidského insulinu	9 5 μl BRIN-BD11 buněk
3 6,66 ng hovězího proinsulinu	10 10 μl BRIN-BD11 buněk
4 13,33 ng hovězího protinsulinu	11 5 μl BRIN-BD11 buněk se zinkem
5 5 μl INS-1E buněk	12 10 μl BRIN-BD11 buněk se zinkem
6 10 μl INS-1E buněk	13 0,6 μl Langerhansových ostrůvků
7 5 μl INS-1E buněk se zinkem	14 1,2 μl Langerhansových ostrůvků



Obrázek 15: Vzorky na PVDF membráně, detekované primární, sekundární protilátkou a chemiluminiscenčním roztokem, a foceně CCD kamerou. Doba focení 8 sekund. Obsah vzorků uveden v *tabulce 4* na straně 49.

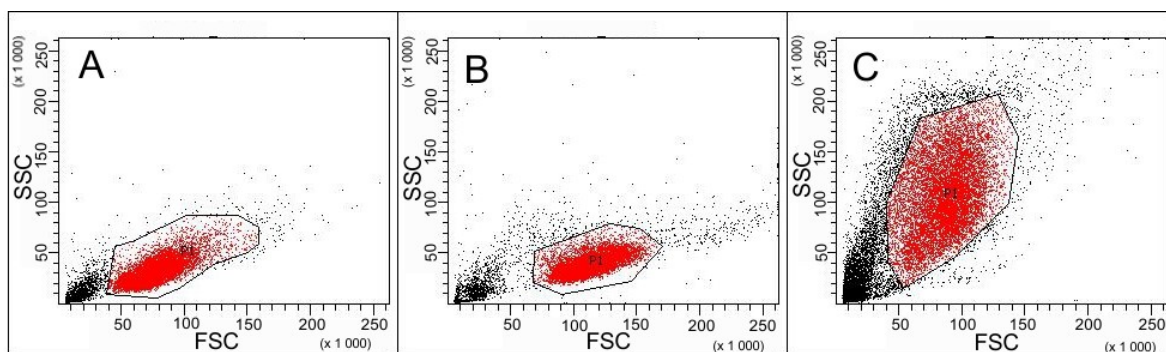
Proužky označené hvězdičkou na *obrázku 13* se nám nepodařilo identifikovat pomocí N-koncové sekvenace aminokyselin. Vzhledem k použití málo specifické protilátky na lyzát z celých buněk se může jednat o nescifickou interakci (nebo dimer insulínu). Použití granulové frakce (viz. kapitola 5.7), která je zproštěna velkého obsahu buňky, zejména jádra, cytosolu a velkých organel by identifikace obsahu sekrečních granulí pomohla k větší přesnosti.

5.5 Stanovení množství Zn^{2+} v buněčných liniích INS-1E a BRIN-BD11 a v buňkách Langerhansových ostrůvků průtokovou cytometrií

V obou buněčných liniích a Langerhansových ostrůvcích bylo zjišťováno množství zinečnatých kationtů průtokovou cytometrií. INS-1E a BRIN-BD11 buňky byly tři dny kultivovány v kompletním médiu, Langerhansovy ostrůvky den v CMRL médiu a poté byly disociovány. Všechny buňky byly několikrát promyty v Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) roztokem a pak naředěny tímto roztokem na koncentraci přibližně 100 000 buněk na 100 μ l HBSS. K některým vzorkům se přidal chelátor Zn^{2+} iontů TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethyléndiamin), k některým fluorescenční značka FluoZin-3AM s činidlem Pluronic F-127 specificky se vážící na zinečnaté kationty. Po inkubaci byly buňky

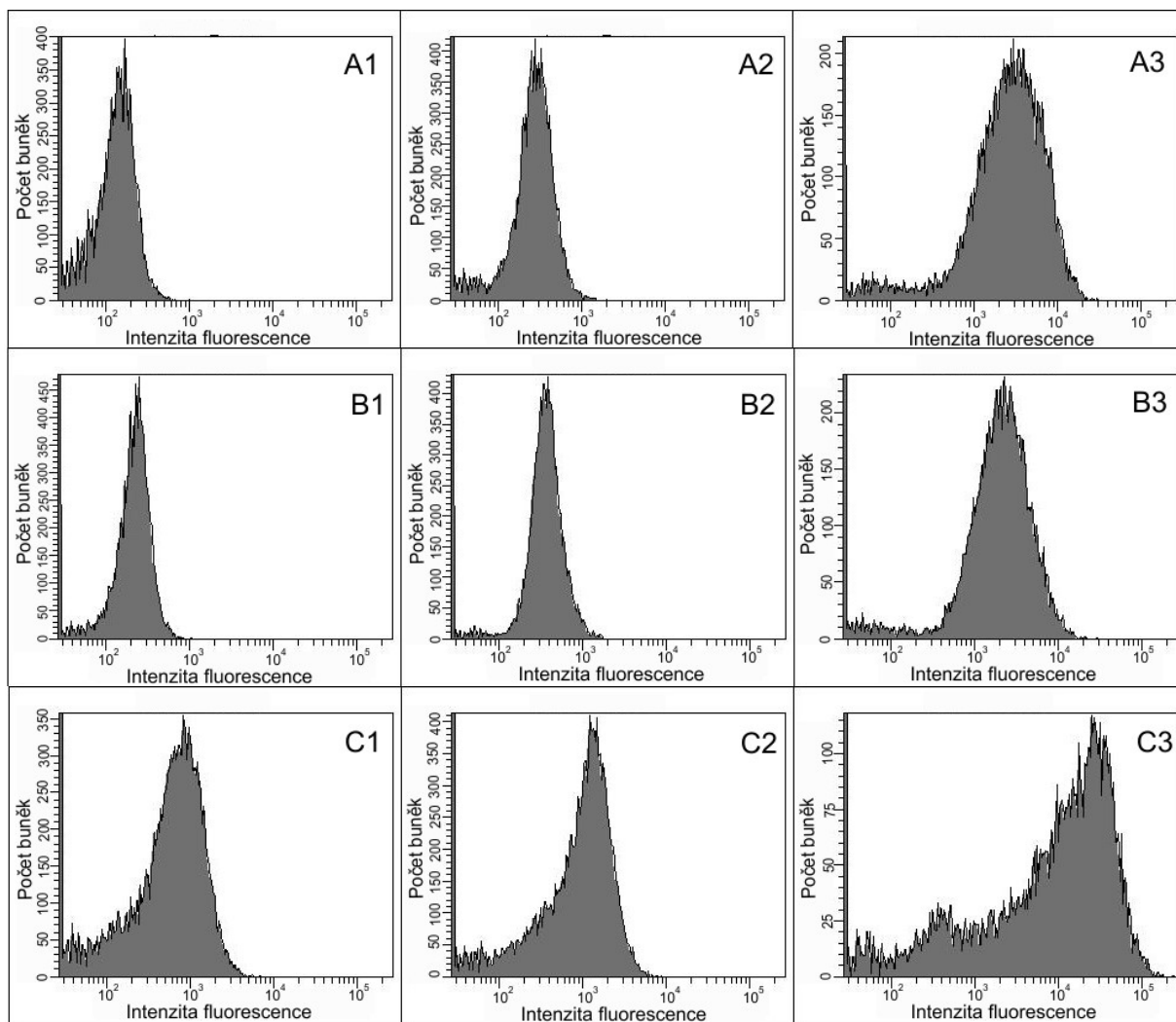
opět promyté HBSS roztokem a fluorescence měřená na průtokovém cytometru BD LSRFortessa™. Přesné uspořádání experimentů a postup je uveden v kapitole 4.6.

V prvním experimentu byl porovnáván obsah Zn^{2+} v buněčných liniích INS-1E, BRIN-BD11 a buňkách Langerhansových ostrůvků. Na *obrázku 16* jsou vidět jednotlivé populace buněk v grafech závislosti příčného rozptylu buňky a přímém rozptylu. INS-1E a BRIN-BD11 buňky tvoří uniformní populace, zatímco buňky Langerhansových ostrůvků ne. To je důsledek toho, že v ostrůvcích nacházíme různé typy buněk (α -, β -, γ -buňky, atd.)



Obrázek 16: Populace buněk (A) INS-1E, (B) BRIN-BD11 a (C) Langerhansových ostrůvků získané průtokovým cytometrem jako závislost příčného rozptylu laseru na buňce (SSC, z angl. *Side Scatter*) na jejím přímém rozptylu (FCS, z angl. *Forward Scatter*). V oválem vyznačené oblasti červené tečky představují živé buňky daného typu. Černé tečky představují mrtvé buňky nebo části buněk, které se do počítání nezahrnovali. Buňky INS-1E a BRIN-BD11 tvoří uniformní populaci, zatímco buňky Langerhansových ostrůvků ne. Populace buněk z Langerhansových ostrůvků tvoří mnoho buněk o různé velikosti (FCS) a granularitě (SSC), proto se liší od samotných buněk pankreatických linií.

Na *obrázku 17* (strana 52) jsou uvedeny grafy závislosti počtu buněk na intenzitě fluorescence. Měřila se přirozená autofluorescence buněk, kdy se k buňkám nepřidával TPEN ani fluorescenční značka, dále se měřila fluorescence buněk s vychelatovanými zinečnatými kationty, ke kterým se poté přidala fluorescenční značka, a fluorescence buněk se samotnou fluorescenční značkou.



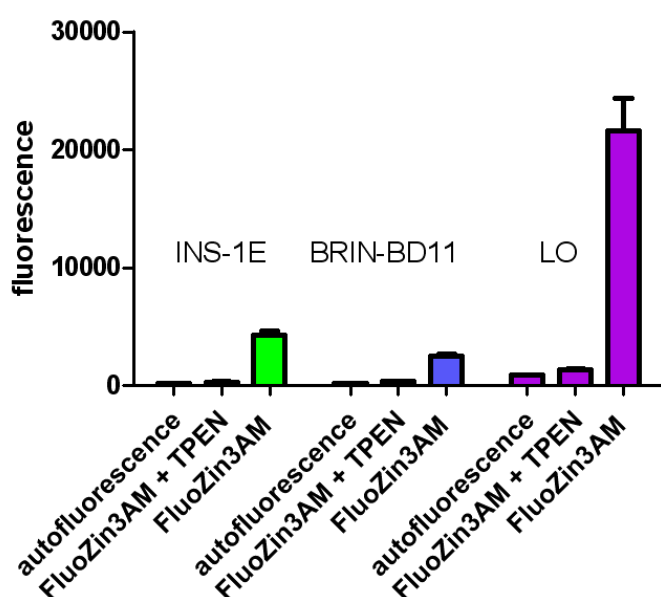
Obrázek 17: Grafy závislosti počtu buněk na intenzitě fluorescence – (A) INS-1E buňky, (B) BRIN-BD11 buňky, (C) Langerhansovy ostrůvky, (1) autofluorescence, (2) buňky s TPEN a fluorescenční značkou, (3) buňky s fluorescenční značkou.

Ve všech případech pozorujeme změnu intenzity fluorescence, když byla k buňkám přidána jenom fluorescenční značka FluoZin-3AM s činidlem Pluronic F-127, oproti autofluorescenci.

Průměr naměřených hodnot fluorescence, který je uveden v *tabulce 9* na straně 53, byl vyneseno do grafu pro porovnání všech typů buněk (*obrázek 18*, strana 53). INS-1E buňky obsahují víc zinečnatých kationtů než BRIN-BD11 buňky, ale ani jedna linie se nedá porovnat z tohoto hlediska s buňkami Langerhansových ostrůvků. Ve všech případech TPEN chelatoval Zn^{2+} velice úspěšně.

Tabulka 9: Průměr naměřených hodnot fluorescence buněčných linií INS-1E, BRIN-BD11 a buněk Langerhansových ostrůvků.

	Autofluorescence	FluoZin-3AM + TPEN	FluoZin-3AM
INS-1E	139,75 ± 6,55	308,25 ± 51,23	4311,25 ± 319,67
BRIN-BD11	216,50 ± 7,85	371,25 ± 15,33	2499,25 ± 173,85
LO	861,33 ± 22,19	1361,33 ± 95,63	21590,00 ± 2768,22



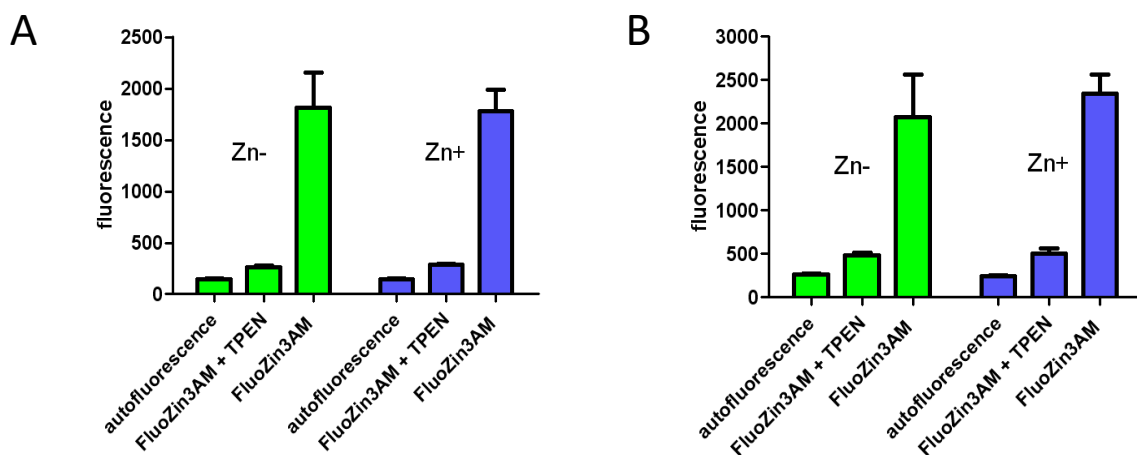
Obrázek 18: Porovnání relativního obsahu Zn²⁺ v buněčných liniích INS-1E, BRIN-BD11 a buňkách Langerhansových ostrůvků (LO) průtokovou cytometrií na základě pozorované fluorescence.

V druhém typu experimentu se zjišťovalo touto metodou, jestli se změnilo množství zinečnatých kationtů v INS-1E a BRIN-BD11 buňkách, pokud byly tři dny kultivovány v kompletním médiu bez nebo s přidavkem 50 μM ZnCl₂ v médiu. Opět se měřila autofluorescence buněk, fluorescence buněk s vychelatovanými zinečnatými kationty, ke kterým se přidala fluorescenční značka, a fluorescence buněk se samotnou fluorescenční značkou. Průměr naměřených hodnot fluorescence, který je uveden v *tabulce 10* na straně 54, byl opět vynesena do grafu pro názorné porovnání (*obrázek 19*, strana 54). Z grafů je

patrné, že suplementace média zinečnatými kationty nezpůsobí ani v jedné linii signifikantní zvýšení množství vnitrobuněčného Zn^{2+} .

Tabulka 10: Průměr naměřených hodnot fluorescence buněčných linií INS-1E, BRIN-BD11, které byly tři dny kultivovány bez nebo s 50 μM $ZnCl_2$.

	Autofluorescence	FluoZin-3AM + TPEN	FluoZin-3AM
INS-1E bez Zn^{2+}	148,25 \pm 6,70	264,50 \pm 15,76	1812,25 \pm 345,64
INS-1E se Zn^{2+}	149,00 \pm 6,68	284,75 \pm 14,22	1781,50 \pm 209,43
BRIN-BD11 bez Zn^{2+}	261,50 \pm 17,21	487,25 \pm 31,70	2071,33 \pm 498,16
BRIN-BD11 se Zn^{2+}	246,75 \pm 11,18	506,75 \pm 56,62	2340,50 \pm 228,30



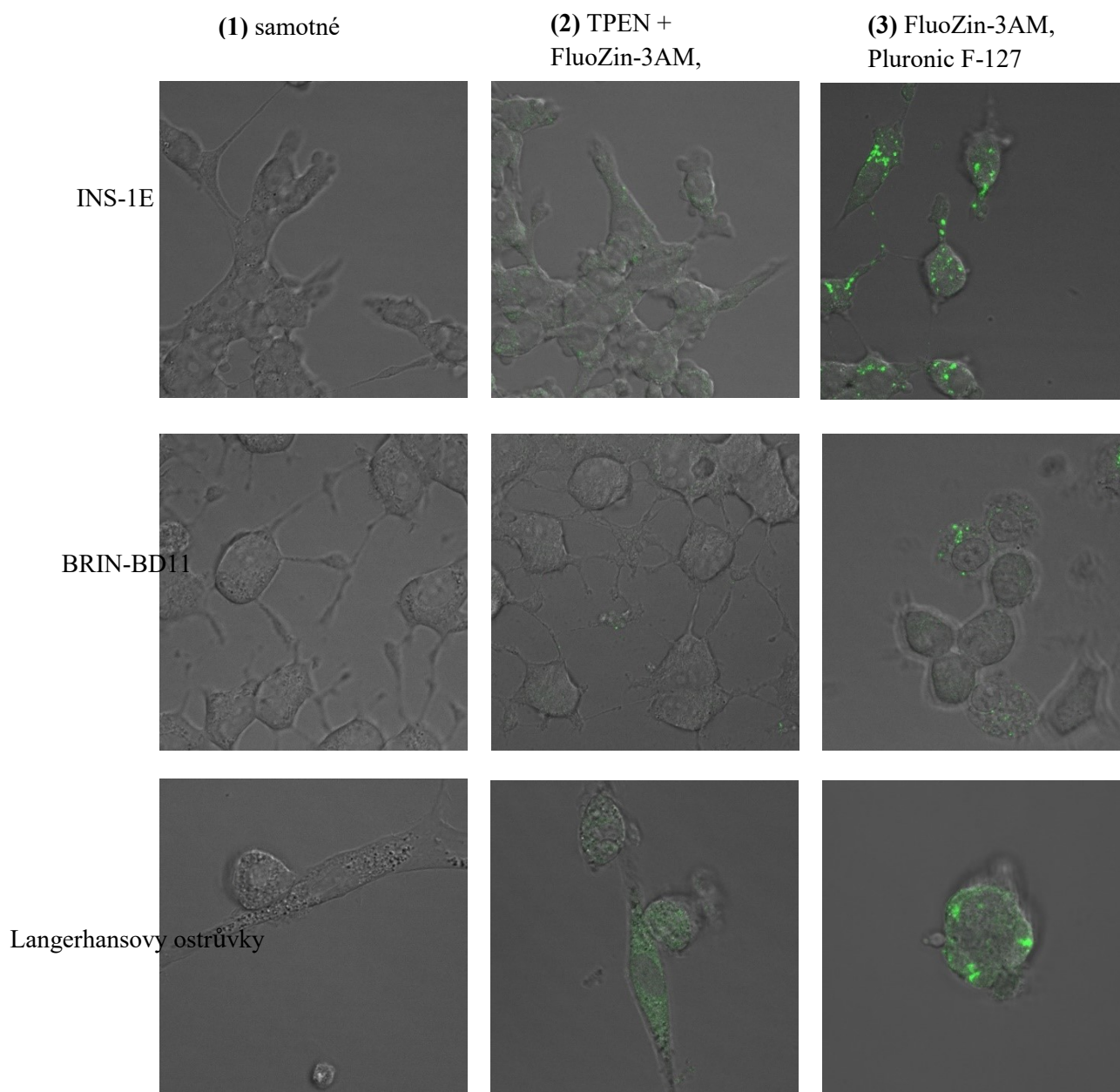
Obrázek 19: Porovnání obsahu zinečnatých iontů na základě vykazované fluorescence v (A) INS-1E buňkách a v (B) BRIN-BD11 buňkách. Bez suplementace média $ZnCl_2$ (zelená) a s přidavkem 50 μM $ZnCl_2$ (modrá).

5.6 Detekce přítomnosti Zn^{2+} v buňkách konfokální fluorescenční mikroskopií

Zinečnaté kationty byly v buňkách INS-1E, BRIN-BD11 a disociovaných Langerhansových ostrůvcích vizualizované fluorescenční mikroskopií. Všechny typy buněk byly nasazeny na 4-komůrkové misky se skleněným dnem a kultivovány. Po omytí roztokem Hanks' Balanced

Salt Solution (HBSS) se k nim nejprve přidal chelátor Zn^{2+} TPEN a poté fluorescenční značka FluoZin-3AM s činidlem Pluronic F-127. Přesný postup je uveden v kapitole 4.7.

Buňky byly foceny konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 780, se softwarem ZEN 2011, ve kterém byly následně zpracovány obrázky. Na *obrázku 20* jsou uvedeny vyfocené obrázky všech buněk.

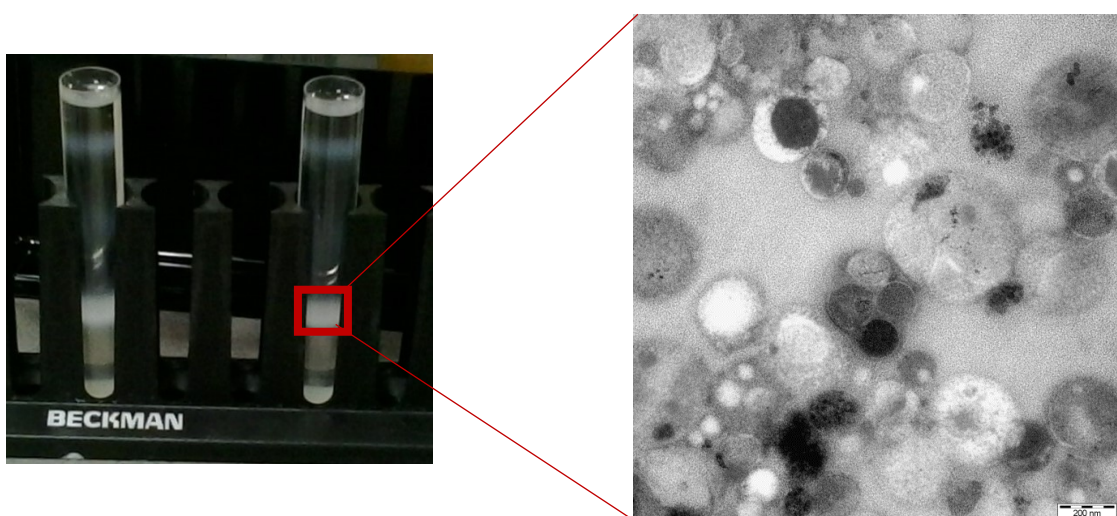


Obrázek 20: Vizualizace Zn^{2+} v buňkách INS-1E, BRIN-BD11 a buňkách Langerhansových ostrůvků fluorescenční značkou FluoZin-3AM. Vyfoceno konfokálním fluorescenčním mikroskopem Zeiss LSM 780

5.7 Izolace insulinových sekrečních granulí a detekce této frakce tzv. „dot blotem“

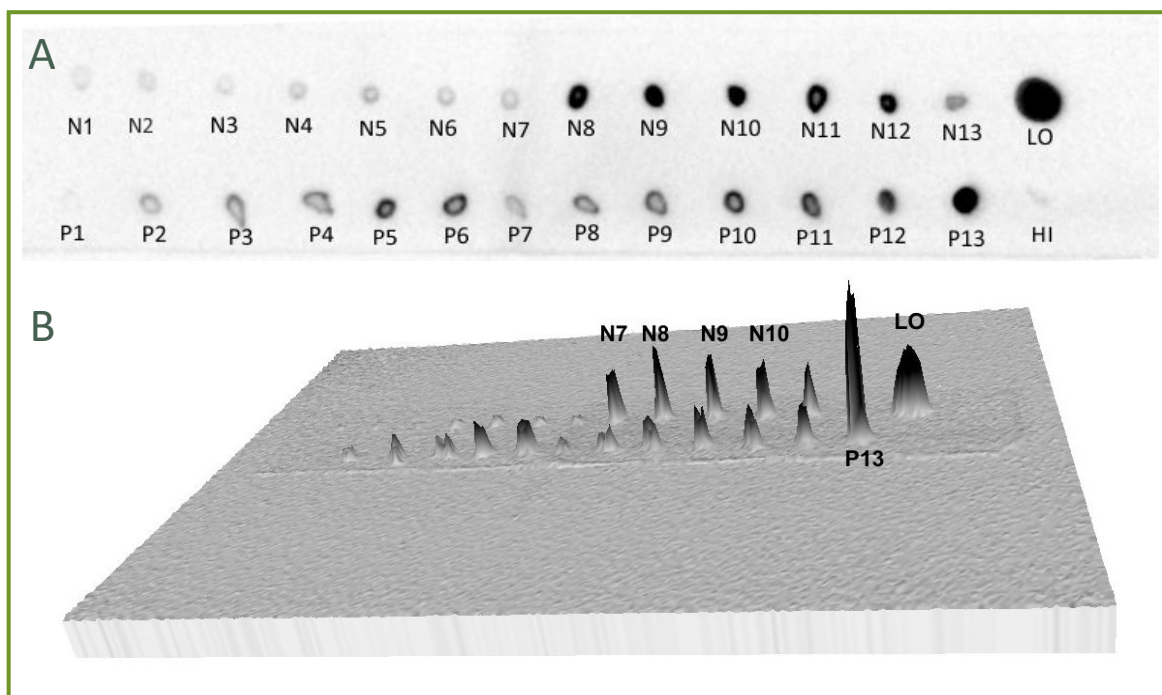
V pankreatických buňkách je insulin skladovaný ve formě sekrečních granulí, které jsme se pokusily izolovat diferenční centrifugací a ultracentrifugací na gradientu Nycodenzu a následně na Percollu. Postup izolace byl optimalizován a výsledná metoda je uvedena v kapitole 4.8. Úspěšně byla izolována granulová frakce ze všech námi používaných buněk – INS-1E, BRIN-BD11 i Langerhansových ostrůvků.

Na *obrázku 21* je pro ilustraci uvedena fotka z průběhu izolace sekrečních granulí INS-1E buněk po ultracentrifugaci na gradientu Nycodenzu a fotka granulové frakce INS-1E buněk pořízená transmisním elektronovým mikroskopem JeolJem 1100.



Obrázek 21: Ultracentrifugační zkumavky (vlevo) s frakcí obohacenou na insulinové sekreční granule (vyznačená červeně) po ultracentrifugaci na gradientu Nycodenzu. Vpravo jsou sekreční granule INS-1E buněk, obrázek pořízený transmisní elektronovou mikroskopií na přístroji JeolJem 1100 při zvětšení 60 000 x.

Z průběhu izolace granulové frakce INS-1E buněk byly pořízeny 1 ml frakce po ultracentrifugaci na gradientu Nycodenzu a Percollu. V nich bylo zjišťováno množství (pro)insulinu metodou tzv. „dot blotu“, která je blíže popsána v kapitole 4.9. Na základě protilátek navázaných na antigen (řetězec B insulinu) byla po aplikaci chemiluminiscenčního roztoku detekována chemiluminiscence CCD kamerou ChemiDoc MP Imaging System – *obrázek 22* na straně 57. Intenzita signálů byla kvantifikována v programu Image-Lab™ Software.



Obrázek 22: Signál, který byl detekován CCD kamerou a odpovídá množství insulínu v příslušné 1 ml frakci po ultracentrifugaci na gradientu Nycodenzu (N1-13) a Percollu (P1-13), LO – Langerhansovy ostrůvky, HI – lidský insulin. (A) signál vyfocený na PVDF membráně, (B) 3D zobrazení signálu.

Na obrázku 22 je vidět, že nejvíce insulínu obsahovaly frakce N7-N10 po ultracentrifugaci na gradientu Nycodenzu, a frakce P13 po točení s Percollem. Tyto části proto byly vždy při izolaci granulové frakce odebírány a dále se s nimi pracovalo.

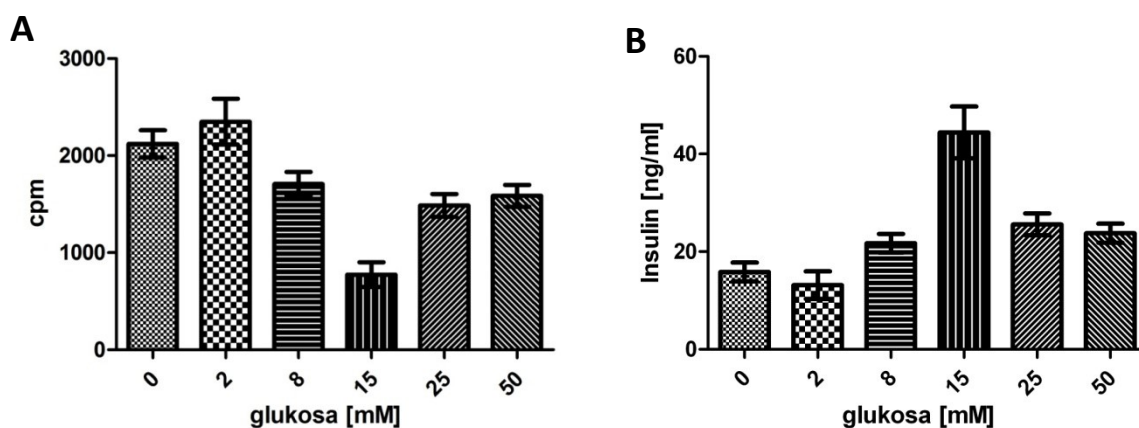
5.8 Množství sekretovaného insulínu INS-1E buňkami stanoveno radioimunoesejí (RIA)

Radioimunoesejí byla zjišťována schopnost INS-1E buněk sekretovat insulin jako odpověď na stimulaci glukosou. Buňky byly vystaveny různé koncentraci glukosy v médiu, konkrétně koncentraci 0, 2, 8, 15, 25 a 50 mM glukosy v Krebs-Ringer HEPES Buffer (KRBH) pufu. Insulin sekretovaný do roztoku byl stanovován kitem *Sensitive Rat Insulin RIA Kit* a konečný poměr značeného ^{125}I -insulínu a sekretovaného insulínu se měřil na přístroji Wizard 1470 Automatic Gamma Counter. Vše bylo prováděno v tetraplikátech.

V *tabulce 11* je uvedeno množství sekretovaného insulínu buňkami v KRBH pufru s různou koncentrací glukosy a tyto hodnoty jsou vyneseny do grafu (*obrázek 23*).

Tabulka 11: Množství sekretovaného insulínu INS-1E buňkami, jako odpověď na stimulaci různou koncentrací glukosy.

Koncentrace glukosy [mM]	Množství sekretovaného insulínu [ng/ml]
0	15,84 ± 1,91
2	13,15 ± 2,80
8	21,72 ± 1,89
15	44,44 ± 5,30
25	25,59 ± 2,24
50	23,77 ± 1,95



Obrázek 23: Hodnoty sekrece insulínu buňkami INS-1E po stimulaci glukosou získané kitem *Sensitive Rat Insulin RIA Kit*. A – radioaktivita naměřená na přístroji Gamma Counter (cpm je jednotek na milion, z angl. count per milion), B – přepočtená na množství sekretovaného insulínu.

Na základě grafu B z *obrázku 23* vidět, že k největší sekreci insulínu z INS-1E buněk dochází při vnější koncentraci glukosy 15 mM. Nejméně insulínu se sekretuje při indukci méně než 2 mM glukosou.

5.9 Sledování změn konformace insulinového hexameru při interakci se serotoninem, dopaminem a argininem

V rámci práce na své diplomové práci jsem se také zúčastnila projektu, který se týkal ovlivňování jednotlivých konformačních stavů hexameru insulinu nízkomolekulárními látkami jako jsou neurotransmitery (serotonin, arginin a dopamin) nebo malé cyklické alkoholy (fenol). Tato práce sdružuje několik různých metodických přístupů. Prvním přístupem je simulace molekulární dynamiky insulinového hexameru v přítomnosti serotoninu, dopaminu, argininu a fenolu. Tato část práce se vypracovávala v rámci diplomové práce Vladimíra Palivce ze skupiny Pavla Jungwirtha na ÚOCHB AV ČR. Druhou metodou byla krystalizace insulinového hexameru v přítomnosti těchto látek a určení jejich struktury. Tato část práce se vypracovávala Dr. Andrzejem Markem Brzozowskim z University of York ve Velké Británii. Naše část práce, které jsem se zúčastnila a která byla vypracovaná ve skupině Jiřího Jiráčka, se týkala sledování změny T-R konformace v insulinovém hexameru spektrofotometricky pomocí látky 4H3N, která slouží jako indikátor změny konformace z T na R. Všemi třemi přístupy jsme dospěli k závěru, že insulinový hexamer je schopen tvořit nekovalentní interakce s různými nízkomolekulárními látkami přirozeně se vyskytujícími v insulinových sekrečních granulích a tyto látky mohou do určité míry ovlivňovat jeho konformační stav. Tato práce byla přijata do tisku a publikována online v časopise the Journal of Biological Chemistry. Práce je přílohou k této diplomové práci.

6 Diskuse

Ve výzkumu se vědci snaží používat biologické modely, které by nahradily živé organismy, nebo jejich části, a tak byly umožněny extenzivní experimenty bez zbytečného plýtvání biologického materiálu a zvířat. Model by se ideálně měl co nejvíce svými vlastnostmi přiblížit *in vivo* modelu, což v případě pankreatických buněčných linií znamená, že by měly tvořit zralý insulin v dostatečném množství a vykazovat glukosou indukovanou sekreci insulinu, stejně jako to pozorujeme u nativních β -buněk slinivky břišní. Do dnešního dne existuje několik pankreatických buněčných linií, a i když žádná z nich zcela nenapodobuje fyziologii primárních β -buněk, jsou extrémně cenným nástrojem pro studium molekulárních mechanismů uvnitř β -buněk a objasňování možných příčin jejich špatné funkce. Každá ze současných permanentních buněčných linií má určité fyziologické vlastnosti, které by měly být zohledněny při jejich použití a při porovnání s *in vivo* modelem. Tato diplomová práce využila přístup více technik, aby porovnála z různých ohledů dvě potkaní pankreatické buněčné linie INS-1E a BRIN-BD11 s potkaními buňkami Langerhansových ostrůvků.

Podstatné rozdíly mezi jednotlivými buňkami jsou vidět již na snímcích z transmisní elektronové mikroskopie. Exprimovaný insulin je skladován v sekrečních granulích, váčcích lokalizovaných nejčastěji v blízkosti plasmatické membrány. Na snímcích je viditelné, že INS-1E buňky mají více sekrečních granulí než buňky BRIN-BD11, ale ani v jednom případě se to nedá porovnat s buňkami Langerhansových ostrůvků, jejichž cytosol je plný sekrečních granulí (*obrázek 12*, strany 44 a 45).

Pankreatické β -buňky jsou velmi bohaté na zinečnaté ionty, které tady mají hlavně strukturní funkci. V zralé sekreční granulí jsou minimálně dva Zn^{2+} ionty součástí hexameru insulinu, který je v této formě skladován. Dá se proto předpokládat, že relativní množství zinečnatých iontů v β -buňce je nutným předpokladem pro množství syntetizovaného insulinu. Ke konverzi proinsulinu na insulin dochází právě až ve formě hexameru, kde po uspořádání proinsulinu dochází k vyštěpení C-peptidu a vytvoření zralého insulinu⁹. Na začátku našeho studia jsme tedy chtěli ověřit, jestli permanentní linie obsahují potřebné množství Zn^{2+} iontů pro vytvoření hexamerů insulinu a jestli dochází ke správné konverzi proinsulinu na insulin.

Na ověření množství zinečnatých iontů uvnitř buněk a vliv zinečnatých iontů na životnost buněk bylo kultivační médium suplementováno různým množstvím $ZnCl_2$. Pozorovali jsme, jak se mění množství Zn^{2+} iontů uvnitř buňky a jaký vliv má tato zvyšující se koncentrace

Zn^{2+} na buňky, což je znázorněno v grafu v kapitole 5.3 (*obrázek 14*, strana 48). Buňky INS-1E neměli problém Zn^{2+} ionty přijmout, ale jejich výraznější nárůst v nitru buňky pozorujeme až při koncentraci 0,4 mM $ZnCl_2$ v médiu a pomyslné maximum při koncentraci 0,6 mM $ZnCl_2$ v médiu (diskutabilní kvůli malému množství buněk zjištěných při vyšších koncentracích zinečnatých iontů). Do hranice 0,6 mM buňky rostly relativně dobře. S dalším přidavkem zinečnatých iontů do média začalo být toto množství natolik toxické, že výrazně ovlivňovalo množení a růst INS-1E buněk.

Na důkaz toho, že všechny tři typy buněk syntetizují insulin, resp. proinsulin, byla použita tricinová-SDS elektroforéza, jejíž speciální uspořádání umožňuje dělení malých proteinů o velikosti 1-100 kDa, kam patří i proinsulin a insulin. Tyto dva proteiny byly detekovány imunochemicky metodou tzv. přenosu s použitím protilátek proti řetězci B insulinu (je součástí i proinsulinu). Na základě výsledků, které jsou na *obrázku 15* (strana 50) můžeme konstatovat, že buňky BRIN-BD11 produkují velmi malé množství insulinu, které ani při vysoké nanášce nebylo možné zachytit. Buňky Langerhansových ostrůvků tvoří výhradně insulin a u INS-1E buněk je kromě insulinu přítomný i proinsulin. Proč INS-1E buňky nejsou schopny zcela vyštěpit C-peptid a tak produkovat v plném rozsahu pouze insulin jako potkaní β -buňky zůstává nejasné. Produkci insulinu jsme chtěli ovlivnit i přidavkem zinečnatých iontů v kultivačním médiu, které by mohlo této konverzi dopomoci, ale žádnou změnu mezi poměrem proinsulinu a insulinu jsme v buňkách bez přidavku Zn^{2+} iontů a buňkách s přidavkem Zn^{2+} iontů nepozorovali.

Dalšími metodami, kterými jsme určovali obsah zinečnatých iontů ve všech třech typech buněk byly atomová emisní spektroskopie a průtoková cytometrie. V případě atomové emisní spektroskopie (kapitola 5.2) bylo naměřené množství Zn^{2+} iontů přepočteno na koncentraci Zn^{2+} iontů v 1 μ g proteinů buňky a z výsledků vyplývá, že INS-1E buňky mají víc než dvounásobné množství zinečnatých iontů než buňky BRIN-BD11, avšak množství těchto iontů v buňkách Langerhansových ostrůvků bylo ještě o polovinu větší než v buňkách INS-1E (*tabulka 6*, strana 46). Při průtokové cytometrii (kapitola 5.5) jsme využili na detekci Zn^{2+} iontů v buňce specifickou a permeabilní fluorescenční značkou FluoZin-3AM. Intenzita fluorescence byla vždy měřena v přesně 10 tisíc buňkách a jak je vidět na *obrázku 18* (strana 53), množství Zn^{2+} iontů je v Langerhansových ostrůvcích mnohem vyšší než v obou liniích. Podle průtokové cytometrie INS-1E buňky mají téměř dvounásobné množství zinečnatých iontů oproti buňkám BRIN-BD11. V porovnání s buňkami

Langerhansových ostrůvků, mají INS-1E buňky 5x méně zinečnatých iontů než buňky ostrůvků a BRIN-BD11 mají dokonce skoro devítinásobně méně Zn^{2+} . V obou permanentních buněčných liniích jsme dále zjišťovali vliv přidavku $ZnCl_2$ v médiu na obsah zinečnatých iontů v buňkách. Po třídní kultivaci byla provedena průtoková cytometrie za stejných podmínek jako v předchozím pokusu. Na *obrázku 19* (strana 54) vidět, že je drobný nárůst Zn^{2+} v buňkách, který ale není signifikantní. Chelátor Zn^{2+} iontů TPEN ve všech experimentech velice úspěšně vychytával Zn^{2+} ionty.

Přítomnost zinečnatých iontů v buňkách jsme nakonec ještě detekovali konfokální fluorescenční mikroskopií, přičemž jsme opět použili pro zinečnaté ionty specifickou fluorescenční značku FluoZin-3AM, která má emisní maximum okolo 520 nm, což odpovídá zelené fluorescenci. Výsledkem inkubace buněk s FluoZin-3AM a případně i s chelátorem Zn^{2+} iontů TPEN jsou snímky uvedeny na *obrázku 20*, na straně 55. Buňky BRIN-BD11 mající ve všech dosavadních pokusech nejméně zinečnatých iontů vykazují opět nejslabší fluorescenci.

Na základě dosavadních výsledků je možno konstatovat, že buněčná linie BRIN-BD11 produkuje malé množství insulínu, které je nicméně nedostatečné pro imunodetekci tricínovou-SDS elektroforézou. Problém ale pravděpodobně není v nedostatečném množství zinečnatých iontů, kterých mají buňky BRIN-BD11 relativně dostatečné množství, i když méně než ostatní dva typy buněk. Nízký obsah insulínu v BRIN-BD11 buňkách potvrdila i studie McClenaghana a kol.¹⁵⁴. V porovnání s touto buněčnou linií INS-1E buňky představují lepší model pankreatických β -buněk. Podle transmisní elektronové mikroskopie mají buňky INS-1E relativně vysoký počet sekrečních granulí, ale podle našich výsledků není proinsulin dostatečně přetvořen na insulin a určitá část ho zůstává intaktní, a pravděpodobně i sekretována. Dosud se pouze jediná studie¹⁵⁶ zabývala obsahem sekrečních granulí ve smyslu zastoupení insulínu a proinsulínu. Tato studie identifikovala v pankreatických NIT-1 buňkách více než 90% zastoupení nezprocesovaného proinsulínu, jiné studie se u dalších permanentních pankreatických buněčných linií konverzí proinsulínu na insulin nezabývaly. Většina studií také používá protilátky proti B-řetězci insulínu, které nejsou schopné identifikovat rozdíl mezi insulinem a proinsulinem, jelikož proinsulin řetězec B obsahuje také. Poměrné zastoupení proinsulínu a insulínu a příčiny nedostatečné konverze proinsulínu na insulin u permanentních buněčných linií vyžaduje další zkoumání. Jedním z výsledků této diplomové práce bylo zjištění, že INS-1E buňky obsahují mimo

zralého insulinu i poměrně velké množství proinsulinu. Tato neúplná konverze zřejmě nesouvisí s nedostatkem zinečnatých iontů, jelikož naše studie prokázala dostatečné množství Zn^{2+} a navíc Chimienti a kol. dokázali přítomnost zinkového přenašeče ZnT8 v INS-1E buňkách¹¹⁷, ale problém bude spíše v menší aktivitě enzymů umožňujících vyštěpení C-peptidu z proinsulinu. Obsah zinečnatých iontů je v INS-1E buňkách relativně dobrý a dokonce jeho přídavek v médiu je zřejmě schopen mírně zvýšit produkci proinsulinu a insulinu, ale na druhé straně neovlivňuje konverzi proinsulinu na insulin (*obrázek 15*, strana 50). Když celkově porovnáme hodnoty produkce (pro)insulinu a obsahu zinečnatých iontů buněčné linie INS-1E s buňkami Langerhansových ostrůvků, linie se jenom přibližuje těmito vlastnostmi Langerhansových ostrůvků.

Pro přesnější výzkum obsahu sekrečních granulí jsme izolovali granulovou frakci u všech tří typů buněk podle práce Brunnera a kol.³⁰. Pomocí tzv. „dot blotu“ jsme zjistili, že frakce, které jsme postupnou ultracentrifugací izolovali (*obrázek 21*, strana 56), obsahují velké množství insulinu a transmisní elektronovou mikroskopií jsme si ověřili přítomnost sekrečních granulí. Tyto frakce ze všech třech buněčných typů jsou velmi cenným materiálem pro další výzkum, protože se jedná o izolované sekreční granule zbavené dalšího obsahu buňky (zejména jádra a velkých organel). Tyto frakce plánujeme použít na proteomické studie ke zjištění jejich obsahu zejména z hlediska menších proteinů a látek s relativně malou molekulovou hmotností.

Důležitou vlastností pankreatických buněk je schopnost sekretovat insulin na základě stimulace glukosou. Zda mají tuto vlastnost i INS-1E buňky jsme zjišťovali radioimmunoesejí. Buňky jsme stimulovali různou koncentrací glukosy a následně stanovovali množství vyloučeného insulinu v médiu. Dokázali jsme, že tyto buňky vskutku vykazují glukosou stimulovanou sekreci insulinu (*obrázek 23*, strana 58). Nejmenší sekrece byla zjištěná při koncentraci glukosy 2 mM, což odpovídá fyziologicky nejnižší koncentraci glukosy v těle. Nejvíce insulinu bylo vyloučeno při 15 mM glukose v médiu. V této metodě byla použita opět protilátka, která se váže i na proinsulin, takže jsme stanovovali množství sekretovaného insulinu i proinsulinu.

7 Souhrn

Pankreatické β -buňky jsou téměř výhradně jediné buňky v těle (kromě brzlíku dětí), které jsou schopné produkovat insulin, peptidový hormon nepostradatelný v metabolismu sacharidů. Pro lepší studium pochodů, které se v těchto buňkách dějí, slouží permanentní buněčné linie, které by měly napodobovat primární pankreatické buňky. V předkládané práci jsme se zaměřili na porovnání dvou těchto permanentních buněčných linií, BRIN-BD11 a INS-1E s potkaními Langerhansovými ostrůvky.

Různými metodami jsme zjišťovali vnitrobuněčné množství zinku, které může podstatně ovlivnit množství insulinu v β -buňkách. Zjistili jsme, že obě dvě permanentní linie mají relativně dobré množství zinku, které je ale násobně menší než množství zinku v Langerhansových ostrůvcích potkanů. Dále jsme potvrdili malé množství insulinu uvnitř buněk BRIN-DB11, jednak transmisním elektronovým mikroskopem, kde je vidět velmi malé množství sekrečních granulí a jednak tricínovou elektroforézou a imunodetekcí, která ani při vysokých nanáškách lyzátu z těchto buněk nebyla schopná identifikovat insulin. Dále jsme zjistili, že INS-1E linie buněk mimo insulin obsahuje poměrně velké množství prekurzoru insulinu, proinsulinu. Otázkou bylo, jestli suplementací zinkem, prvku nezbytného pro konverzi proinsulinu na insulin, se poměr insulinu a proinsulinu změní. To se nám následnými pokusy se suplementací média zinkem nepotvrdilo a poměr insulin/proinsulin zůstal i po suplementaci stejný. Nadto jsme radioimunosejí potvrdili, že INS-1E buňky jsou schopné sekretovat insulin v závislosti na zvýšené hladině glukosy. Dále se nám gradientovou ultracentrifugací podařilo získat granulovou frakci zbavenou ostatního obsahu buňky, a to jak z obou buněčných linií, tak z potkaních Langerhansových ostrůvků. Tyto granulové frakce budou použity pro další pokusy za účelem studia jejich obsahu.

Předkládaná diplomová práce přinesla další poznatky o dvou permanentních buněčných liniích a získaná data budou podkladem pro další výzkum v této oblasti. Závěrem lze říci, že i když jsou permanentní buněčné linie velmi užitečným pomocníkem pro výzkum pankreatických β -buněk, je nutné uvědomit si limity těchto linií a pro výzkum vybírat takové linie, které jsou vhodné pro daný výzkum.

8 Reference

1. Suckale, J. & Solimena, M. The insulin secretory granule as a signaling hub. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 599–609 (2010).
2. Schuit, F. C., In't Veld, P. a & Pipeleers, D. G. Glucose stimulates proinsulin biosynthesis by a dose-dependent recruitment of pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 3865–9 (1988).
3. Joslin, E. P. & Kahn, C. R. *Joslin's Diabetes Mellitus: Edited by C. Ronald Kahn [et al.]*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2005).
4. Guest, P., Bailyes, E., Rutherford, N. & Hutton, J. Insulin secretory granule biogenesis. Co-ordinate regulation of the biosynthesis of the majority of constituent proteins. *Biochem. J.* **274**, 73–78 (1991).
5. Dean, P. M. Ultrastructural morphometry of the pancreatic β -cell. *Diabetologia* **9**, 115–119 (1973).
6. Rawdon, B. B. & Andrew, A. Origin and differentiation of gut endocrine cells. *Histol. Histopathol.* **8**, 567–580 (1993).
7. Blausen.com staff. Medical gallery of Blausen Medical 2014. *WikiJournal of Medicine* **1** (2014); staženo dne 10.4.2017
8. Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F. & Kitai, R. The disulphide bonds of insulin. *Biochem. J.* **60**, 541 (1955).
9. Steiner, D. F., Cunningham, D., Spigelman, L. & Aten, B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* **157**, 697–700 (1967).
10. Chan, S. J., Keim, P. & Steiner, D. F. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 1964–1968 (1976).
11. Walter, P., Gilmore, R. & Blobel, G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* **38**, 5–8 (1984).
12. Howell, S. L. Role of ATP in the intracellular translocation of proinsulin and insulin in the rat pancreatic B cell. *Nat. New Biol.* **235**, 85–86 (1972).
13. Rothman, J. E. & Orci, L. Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* **355**, 409–415 (1992).
14. Howell, S. L. The mechanism of insulin secretion. *Diabetologia* **26**, 319–327 (1984).
15. Balch, W. E. Small GTP-binding proteins in vesicular transport. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 473–477 (1990).
16. Schwaninger, R., Plutner, H., Bokoch, G. M. & Balch, W. E. Multiple GTP-binding proteins regulate vesicular transport from the ER to Golgi membranes. *J. Cell Biol.* **119**, 1077–1096 (1992).
17. Rothman, J. E. & Wieland, F. T. Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227 (1996).
18. Beckers, C. J. M., Block, M. R., Glick, B. S., Rothman, J. E. & Balch, W. E. Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. *Nature* **339**, 397–398 (1989).

19. Tisdale, E. J., Bourne, J. R., Khosravi-Far, R., Der, C. J. & Balch, W. E. GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **119**, 749–761 (1992).
20. Zerial, M. & Stenmark, H. Rab GTPases in vesicular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 613–620 (1993).
21. Halban, P. a & Irminger, J. C. Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* **299**, 1–18 (1994).
22. Steiner, D. F. & Oyer, P. E. The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **57**, 473–80 (1967).
23. Creighton, T. E. *Proteins: structures and molecular properties.* (Macmillan, 1993).
24. Olofsson, C. S., Gopel, S. O., Barg, S., Galvanovski, J., Ma, X., Salehi, A., Rorsman, P., Eliasson, L.. Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. *Pflügers Arch.* **444**, 43–51 (2002).
25. Dunn, M. F. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer - A review. *BioMetals* **18**, 295–303 (2005).
26. Marsh, B. J., Soden, C., Alacón, C., Wichsteed, B. L., Yaekura, K., Costin, A. J., Morgan, G. P., Rhodes C. J. Regulated autophagy controls hormone content in secretory-deficient pancreatic endocrine beta-cells. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2255–2269 (2007).
27. Arvan, P. & Halban, P. a. Sorting ourselves out: Seeking consensus on trafficking in the beta-cell. *Traffic* **5**, 53–61 (2004).
28. Blázquez, M. & Shennan, K. I. Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway. *Biochem. Cell Biol.* **78**, 181–191 (2000).
29. Tooze, S. A. Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1404**, 231–244 (1998).
30. Brunner, Y., Couté, Y., Iezzi, M., Foti, M., Fukuda, M., Hochstrasser, D. F., Wollheim, C. B., Sanchez J. -C. Proteomics Analysis of Insulin Secretory Granules. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1007–1017 (2007).
31. Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Madsen, O., Perrelet, A., Vassalli, J. D., Andersen, R. G. Conversion of proinsulin to insulin occurs coordinately with acidification of maturing secretory vesicles. *J. Cell Biol.* **103**, 2273 LP-2281 (1986).
32. Steiner, D. F., Park, S.-Y., Støy, J., Philipson, L. H. & Bell, G. I. A brief perspective on insulin production. *Diabetes, Obes. Metab.* **11**, 189–196 (2009).
33. Klumperman, J., Kuliawat, R., Griffith, J. M., Geuze, H. J. & Arvan, P. Mannose 6–Phosphate Receptors Are Sorted from Immature Secretory Granules via Adaptor Protein AP-1, Clathrin, and Syntaxin 6–positive Vesicles. *J. Cell Biol.* **141**, 359 LP-371 (1998).
34. Molinete, M., Dupuis, S., Brodsky, F. M. & Halban, P. A. Role of clathrin in the regulated secretory pathway of pancreatic β -cells. *J. Cell Sci.* **114**, 3059 LP-3066 (2001).

35. Žáková, L. & Jiráček, J. Biosyntéza, sekrece a degradace insulinu. *Chem. List.* **99**, 772–781 (2005).
36. Blundell, T., Dodson, G., Hodgkin, D. & Mercola, D. Insulin: The Structure in the Crystal and its Reflection in Chemistry and Biology by. *Adv. Protein Chem.* **26**, 279–402 (1972).
37. Hutton, J. C., Penn, E. J. & Peshavaria, M. Low-molecular-weight constituents of isolated insulin-secretory granules. Bivalent cations, adenine nucleotides and inorganic phosphate. *Biochem. J.* **210**, 297 LP-305 (1983).
38. Hutton, J. C. The insulin secretory granule. *Diabetologia* **32**, 271–281 (1989).
39. Hutton, J. C., Penn, E. J. & Peshavaria, M. Isolation and characterisation of insulin secretory granules from a rat islet cell tumour. *Diabetologia* **23**, 365–373 (1982).
40. Shafqat, J., Melles, E., Sigmundsson, K., Johansson, B. -L., Ekberg, K., Alvelius, G., Henriksson, M., Johansson, J., Wahren, J., Jörnvall, H. Proinsulin C-peptide elicits disaggregation of insulin resulting in enhanced physiological insulin effects. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1805–1811 (2006).
41. Bugliani, M., Torri, S., Lupi, R., Guerra, S. D., Grupillo, M., Del Chiaro, M., Mosca, F., Boggi, U., Del Prato, S., Marchetti, P. Effects of C-peptide on isolated human pancreatic islet cells. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **23**, 215–219 (2007).
42. Ogawa, A., Harris, V., McCorkle, S. K., Unger, R. H. & Luskey, K. L. Amylin secretion from the rat pancreas and its selective loss after streptozotocin treatment. *J. Clin. Invest.* **85**, 973 (1990).
43. Buchanan, C. M., Phillips, A. R. J. & Cooper, G. J. S. Preptin derived from proinsulin-like growth factor II (proIGF-II) is secreted from pancreatic islet β -cells and enhances insulin secretion. *Biochem. J.* **360**, 431–439 (2001).
44. Cornu, M., Yang, J. -Y., Jaccard, E., Poussin, C., Wildmann, C., Thorens, B. Glucagon-like peptide-1 protects β -cells against apoptosis by increasing the activity of an IGF-2/IGF-1 receptor autocrine loop. *Diabetes* **58**, 1816–1825 (2009).
45. Åkesson, B., Panagiotidis, G., Westermark, P. & Lundquist, I. Islet amyloid polypeptide inhibits glucagon release and exerts a dual action on insulin release from isolated islets. *Regul. Pept.* **111**, 55–60 (2003).
46. Cornu, M. *et al.* Glucagon-like peptide-1 increases β -cell glucose competence and proliferation by translational induction of insulin-like growth factor-1 receptor expression. *J. Biol. Chem.* **285**, 10538–10545 (2010).
47. Bailey, S. J., Ravier, M. A. & Rutter, G. A. Glucose-Dependent Regulation of γ -Aminobutyric Acid (GABAA) receptor expression in mouse pancreatic Islet α -Cells. *Diabetes* **56**, 320–327 (2007).
48. Petit, P., Lajoix, A.-D. & Gross, R. P2 purinergic signalling in the pancreatic β -cell: control of insulin secretion and pharmacology. *Eur. J. Pharm. Sci.* **37**, 67–75 (2009).
49. Richards-Williams, C., Contreras, J. L., Berecek, K. H. & Schwiebert, E. M. Extracellular ATP and zinc are co-secreted with insulin and activate multiple P2X purinergic receptor channels expressed by islet beta-cells to potentiate insulin secretion. *Purinergic Signal.* **4**, 393 (2008).

50. Bertrand, G., Petit, P., Bozem, M. & Henquin, J. C. Membrane and intracellular effects of adenosine in mouse pancreatic beta-cells. *Am. J. Physiol. Metab.* **257**, E473–E478 (1989).
51. Davidson, H. W., Rhodes, C. J. & Hutton, J. C. Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic β cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature* **333**, 93–96 (1988).
52. Henquin, J. C. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **93**, S27–S31 (2011).
53. Tarasov, A., Dusonchet, J. & Ashcroft, F. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel. *Diabetes* **53**, S113–S122 (2004).
54. Barg, S., Ma, X., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Göpel, S. O., Obermüller, S., Platzer, J., Renström, E., Trus, M., Atlas, D., Striessnig, J. Fast exocytosis with few Ca²⁺ channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. *Biophys. J.* **81**, 3308–3323 (2001).
55. Miki, T., Nagashima, K. & Seino, S. The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells. *J. Mol. Endocrinol.* **22**, 113–123 (1999).
56. Bryan, J., Vila-Carriles, W. H., Zhao, G., Babenko, A. P. & Aguilar-Bryan, L. Toward linking structure with function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Diabetes* **53**, S104–S112 (2004).
57. Gribble, F. M. & Reimann, F. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia* **46**, 875–891 (2003).
58. Henquin, J.-C. Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes* **53**, S48–S58 (2004).
59. Henquin, J.-C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* **49**, 1751–1760 (2000).
60. Gembal, M., Detimary, P., Gilon, P., Gao, Z.-Y. & Henquin, J.-C. Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J. Clin. Invest.* **91**, 871 (1993).
61. Gembal, M., Gilon, P. & Henquin, J.-C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J. Clin. Invest.* **89**, 1288 (1992).
62. Sato, Y., Aizawa, T., Komatsu, M., Okada, N. & Yamada, T. Dual functional role of membrane depolarization/Ca²⁺ influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes* **41**, 438–443 (1992).
63. Panten, U., Schwanstecher, M., Wallasch, A. & Lenzen, S. Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **338**, 459–462 (1988).
64. Best, L., Yates, A. P. & Tomlinson, S. Stimulation of insulin secretion by glucose in the absence of diminished potassium (86Rb⁺ permeability. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2483–2485 (1992).

65. Sato, Y., Anello, M. & Henquin, J.-C. Glucose Regulation of Insulin Secretion Independent of the Opening or Closure of Adenosine Triphosphate-Sensitive K⁺ Channels in β Cells 1. *Endocrinology* **140**, 2252–2257 (1999).
66. Bruns, D. & Jahn, R. Molecular determinants of exocytosis. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **443**, 333–338 (2002).
67. Chapman, E. R. Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 498–508 (2002).
68. Shin, O.-H., Rizo, J. & Südhof, T. C. Synaptotagmin function in dense core vesicle exocytosis studied in cracked PC12 cells. *Nat. Neurosci.* **5**, 649–656 (2002).
69. Sugita, S., Shin, O., Han, W., Lao, Y. & Südhof, T. C. Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca²⁺ sensors with distinct Ca²⁺ affinities. *EMBO J.* **21**, 270–280 (2002).
70. Seabra, M. C., Mules, E. H. & Hume, A. N. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol. Med.* **8**, 23–30 (2002).
71. Iezzi, M., Escher, G., Meda, P., Charollais, A., Baldini, G., Darchen, F., Wollheim, C. B., Regazzi, R. Subcellular distribution and function of Rab3A, B, C, and D isoforms in insulin-secreting cells. *Mol. Endocrinol.* **13**, 202–212 (1999).
72. Regazzi, R., Ravazzola, M., Iezzi, M., Lang, J., Zahraoui, A., Anderegg, E., Morel, P., Takai, Y., Wollheim, C. B. Expression, localization and functional role of small GTPases of the Rab3 family in insulin-secreting cells. *J. Cell Sci.* **109**, 2265–2273 (1996).
73. Coppola, T., Perret-Menoud, V., Lüthi, S., Farnsworth, C. C., Glomset, J. A., Regazzi, R. Disruption of Rab3–calmodulin interaction, but not other effector interactions, prevents Rab3 inhibition of exocytosis. *EMBO J.* **18**, 5885–5891 (1999).
74. Iezzi, M., Regazzi, R. & Wollheim, C. B. The Rab3-interacting molecule RIM is expressed in pancreatic β -cells and is implicated in insulin exocytosis. *Febs Lett.* **474**, 66–70 (2000).
75. Coppola, T., Magnin-Lüthi, S., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Schiavo, G., Regazzi, R. Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25, and synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* **276**, 32756–32762 (2001).
76. Schoch, S., Castillo, P. E., Jo, T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R. C., Südhof, T. C. RIM1 α forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* **415**, 321–326 (2002).
77. Barg, S., Eliasson, L., Renström, E. & Rorsman, P. A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type Ca²⁺ channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse β -cells. *Diabetes* **51**, S74–S82 (2002).
78. Rorsman, P. & Renström, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **46**, 1029–1045 (2003).
79. Cerasi, E. & Luft, R. The plasma insulin response to glucose infusion in healthy subjects and in diabetes mellitus. *Acta Endocrinol. (Copenh).* **55**, 278–304 (1967).
80. Porte Jr, D. & Pupo, A. A. Insulin responses to glucose: evidence for a two pool system in man. *J. Clin. Invest.* **48**, 2309 (1969).

81. Curry, D. L., Bennett, L. L. & Grodsky, G. M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* **83**, 572–584 (1968).
82. Bratanova-Tochkova, T. K., Cheng, H., Daniel, S., Gunawardana, S., Liu, Y. -J., Mulvaney-Musa, J., Schermerhorn, T., Straub, S. G., Yajima, H., Sharp, G. W. G. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* **51**, S83–S90 (2002).
83. Daniel, S., Noda, M., Straub, S. G. & Sharp, G. W. Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* **48**, 1686–1690 (1999).
84. Ohara-Imaizumi, M., Nakamichi, Y., Tanaka, T., Ishida, H. & Nagamatsu, S. Imaging Exocytosis of Single Insulin Secretory Granules with Evanescent Wave Microscopy: Distinct Behavior of Granule Motion in Biphasic Insulin Release. *J. Biol. Chem.* **277**, 3805–3808 (2002).
85. Henquin, J.-C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* **52**, 739 (2009).
86. Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. & Schulin, R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J. Res. Med. Sci.* **18**, 144–157 (2013).
87. Plum, L. M., Rink, L. & Haase, H. The essential toxin: impact of zinc on human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **7**, 1342–1365 (2010).
88. Maret, W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv. Nutr.* **4**, 82–91 (2013).
89. Oteiza, P. I. Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1748–1759 (2012).
90. Zalewski, P. D., Millard, S. H., Forbes, I. J., Kapaniris, O., Slavotinek, A., Betts, W. H., Ward, A. D., Lincoln, S. F., Mahadevan, I. Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 877–884 (1994).
91. Boquist, L., Falkmer, S., Havu, N. & Pihl, E. Insulin biosynthesis, storage and secretion. 8. Pancreatic-islet tissue and heavy metals--some ultrastructural and experimental observations. *Lakartidningen* **65**, 3603–3607 (1968).
92. Emdin, S. O., Dodson, G. G., Cutfield, J. M. & Cutfield, S. M. Role of zinc in insulin biosynthesis. *Diabetologia* **19**, 174–182 (1980).
93. Gold, G. & Grodsky, G. M. Kinetic aspects of compartmental storage and secretion of insulin and zinc. *Cell. Mol. Life Sci.* **40**, 1105–1114 (1984).
94. Rungby, J. Zinc, zinc transporters and diabetes. *Diabetologia* **53**, 1549–1551 (2010).
95. Wijesekara, N., Dai, F. F., Hardy, A. B., Giglou, P. R., Bhattacharjee, A., Koshkin, V., Chimienti, F., Gaisano, H. Y., Rutter, G. A., Wheeler, M. B. Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia* **53**, 1656–1668 (2010).
96. Søndergaard, L. G., Stoltenberg, M., Flyvbjerg, A., Brock, B., Schmitz, O., Danscher, G., Rungby, J. Zinc ions in β -cells of obese, insulin-resistant, and type 2 diabetic rats traced by autometallography. *Apmis* **111**, 1147–1154 (2003).

97. Qian, W.-J., Aspinwall, C. A., Battiste, M. A. & Kennedy, R. T. Detection of secretion from single pancreatic β -cells using extracellular fluorogenic reactions and confocal fluorescence microscopy. *Anal. Chem.* **72**, 711–717 (2000).
98. Franklin, I., Gromada, J., Gjinovci, A., Theander, S. & Wollheim, C. B. β -cell secretory products activate α -cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes* **54**, 1808–1815 (2005).
99. Bloc, A., Cens, T., Cruz, H. & Dunant, Y. Zinc-induced changes in ionic currents of clonal rat pancreatic β -cells: activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *J. Physiol.* **529**, 723–734 (2000).
100. Ishihara, H., Maechler, P., Gjinovci, A., Herrera, P.-L. & Wollheim, C. B. Islet β -cell secretion determines glucagon release from neighbouring α -cells. *Nat. Cell Biol.* **5**, 330–335 (2003).
101. Kim, B.-J. *et al.* Zinc as a paracrine effector in pancreatic islet cell death. *Diabetes* **49**, 367–372 (2000).
102. Myers, S. A., Nield, A. & Myers, M. Zinc transporters, mechanisms of action and therapeutic utility: Implications for type 2 diabetes mellitus. *J. Nutr. Metab.* **2012**, (2012).
103. Kambe, T. Molecular architecture and function of ZnT transporters. *Curr. Top. Membr.* **69**, 199–220 (2012).
104. Kawasaki, E. ZnT8 and type 1 diabetes [Review]. *Endocr. J.* **59**, 531–537 (2012).
105. Vařák, M. & Meloni, G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**, 1067 (2011).
106. Cousins, R. J., Liuzzi, J. P. & Lichten, L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J. Biol. Chem.* **281**, 24085–24089 (2006).
107. Kambe, T., Hashimoto, A. & Fujimoto, S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3281–3295 (2014).
108. Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., Boutin, P., Vincent, D., Belisle, A., Hadjadj, S., Balkau, B., Heude, B., Charpentier, G., Hudson, T. J., Montpetit, A., Pshezhetsky, A. V., Prentki, M., Posner, B. I., Balding, D. J., Meyre, D., Polychronakos, C., Froguel, P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* **445**, 881–885 (2007).
109. Smidt, K., Jessen, N., Petersen, A. B., Larsen, A., Magnusson, N., Jeppesen, J. B., Stoltenberg, M., Culvenor, J. G., Tsatsanis, A., Brock, B., Schmitz, O., Wogesen, L., Bush, A. I., Rungby, J. SLC30A3 Responds to Glucose-and Zinc Variations in β -Cells and Is Critical for Insulin Production and In Vivo Glucose-Metabolism During β -Cell Stress. *PLoS One* **4**, e5684 (2009).
110. Nicolson, T. J., Bellomo, E. A., Wijesekara, N., Loder, M. K., Baldwin, J. M., Gyulkhandanyan, A. V., Koshkin, V., Tarasov, A. I., Carzaniga, R., Kronenberger, K., Taneja, T., da Silva Xavier, G., Libert, S., Froguel, P., Scharfmann, R., Stetsyuk, V., Ravassard, P., Parker, H., Gribble, F. M., Reimann, F., Sladek, R., Hughes, S. J., Johnson, P. R. V., Masseboeuf, M., Burcelin, R., Baldwin, S. A., Liu, M., Lara-Lemus, R., Arvan, P., Schuit, F. C., Wheeler, M. B., Chimienti, F., Rutter, G. A. Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. *Diabetes* **58**, 2070–

- 2083 (2009).
111. Adlard, P. A., Parncutt, J. M., Finkelstein, D. I. & Bush, A. I. Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease? *J. Neurosci.* **30**, 1631–1636 (2010).
 112. Patrushev, N., Seidel-Rogol, B. & Salazar, G. Angiotensin II requires zinc and downregulation of the zinc transporters ZnT3 and ZnT10 to induce senescence of vascular smooth muscle cells. *PLoS One* **7**, e33211 (2012).
 113. Huang, L., Kirschke, C. P., Lay, Y. A. E., Levy, L. B., Lamirande, D. E., Zhang, P. H. *Znt7*-null mice are more susceptible to diet-induced glucose intolerance and insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **287**, 33883–33896 (2012).
 114. Sekler, I., Sensi, S. L., Hershfinkel, M. & Silverman, W. F. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol. Med.* **13**, 337–343 (2007).
 115. Kambe, T., Narita, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Hirose, J., Amano, T., Sugiura, N., Sasaki, R., Mori, K., Iwanaga, T., Nagao, M. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic β cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 19049–19055 (2002).
 116. Huang, L., Yan, M. & Kirschke, C. P. Over-expression of ZnT7 increases insulin synthesis and secretion in pancreatic β -cells by promoting insulin gene transcription. *Exp. Cell Res.* **316**, 2630–2643 (2010).
 117. Chimienti, F., Devergnas, S., Pattou, F., Schuit, F., Garcia-Cuenca, R., Vandewalle, B., Kerr-Konte, J., Van Lommel, L., Grunwald, D., Favier, A., Seve, M. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J. Cell Sci.* **119**, 4199–206 (2006).
 118. Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A. & Seve, M. Identification and cloning of a β -cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* **53**, 2330–2337 (2004).
 119. Lemaire, K., Chimienti, F. & Schuit, F. Zinc transporters and their role in the pancreatic β -cell. *J. Diabetes Investig.* **3**, 202–211 (2012).
 120. Jeong, J. & Eide, D. J. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol. Aspects Med.* **34**, 612–619 (2013).
 121. Chabosseau, P. & Rutter, G. a. Zinc and diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* **611**, 79–85 (2016).
 122. Baker, E. N. *et al.* The Structure of 2Zn Pig Insulin Crystals at 1.5 Å Resolution. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* **319**, 369–456 (1988).
 123. Ashcroft, F. M. & Ashcroft, S. J. H. *Insulin: molecular biology to pathology.* (Oxford University Press, 1992).
 124. Coffman, F. D. & Dunn, M. F. Insulin-metal ion interactions: the binding of divalent cations to insulin hexamers and tetramers and the assembly of insulin hexamers. *Biochemistry* **27**, 6179–6187 (1988).
 125. Kadima, W., Roy, M., Lee, R. W., Kaarsholm, N. C. & Dunn, M. F. Studies of the association and conformational properties of metal-free insulin in alkaline sodium chloride solutions by one-and two-dimensional ^1H NMR. *J. Biol. Chem.* **267**, 8963–8970 (1992).

126. Schlichtkrull, J. Insulin crystals. *Acta Chem. Scand.* **11**, (1957).
127. Michael, J., Carroll, R., Swift, H. H. & Steiner, D. F. Studies on the molecular organization of rat insulin secretory granules. *J. Biol. Chem.* **262**, 16531–16535 (1987).
128. Kaarsholm, N. C., Ko, H. C. & Dunn, M. F. Comparison of solution structural flexibility and zinc binding domains for insulin, proinsulin, and miniproinsulin. *Biochemistry* **28**, 4427–4435 (1989).
129. Shneine, J., Voswinkel, M., Federwisch, M. & Wollmer, A. Enhancing the T → R Transition of Insulin by Helix-Promoting Sequence Modifications at the N-Terminal B-Chain. *Biol. Chem.* **381**, 127–133 (2000).
130. Rahuel-Clermont, S., French, C. A., Kaarsholm, N. C. & Dunn, M. F. Mechanisms of stabilization of the insulin hexamer through allosteric ligand interactions. *Biochemistry* **36**, 5837–5845 (1997).
131. Skelin, M., Rupnik, M. & Cencic, A. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *Altern. zu Tierexperimenten* **27**, 105–113 (2010).
132. Freshney, R. I. Biology of cultured cells. *Cult. Anim. Cells* (2000).
133. Gazdar, A. F., Chick, W. L., Oie, H. K., Sims, H. L., King, D. L., Weir, G. C., Lauris, V. Continuous, clonal, insulin-and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 3519–3523 (1980).
134. Santerre, R. F., Santerre, R. F., Cook, R. A., Crisel, R. M., Sharp, J. D., Schmidt, R. J., Williams, D. C., Wilson, C. P. Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 4339–4343 (1981).
135. Newgard, C. B. Cellular engineering and gene therapy strategies for insulin replacement in diabetes. *Diabetes* **43**, 341–350 (1994).
136. Efrat, S. & Hanahan, D. Bidirectional activity of the rat insulin II 5'-flanking region in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 192–198 (1987).
137. Efrat, S. Regulation of Insulin Secretion: Insights from Engineered β -cell Lines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1014**, 88–96 (2004).
138. Efrat, S., Linde, S., Kofod, H., Spector, D., Delannoy, M., Grant, S., Hanahan, D., Baekkeskov, S. Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene- oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 9037–9041 (1988).
139. Gilligan, A., Jewett, L., Simon, D., Damjanov, I., Matschinsky, F. M., Weik, H., Pinkert, C., Knowles, B. B. Functional pancreatic β -cell line from SV40 T-antigen transgenic mouse. *Diabetes* **38**, 1056–1062 (1989).
140. Ishihara, H., Asano, T., Tsukuda, K., Katagiri, H., Inukai, K., Anai, M., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Miyazaki, J. -I., Oka, Y. Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* **36**, 1139–1145 (1993).
141. Radvanyi, F., Christgau, S., Baekkeskov, S., Jolicoeur, C. & Hanahan, D. Pancreatic beta cells cultured from individual preneoplastic foci in a multistage tumorigenesis pathway: a potentially general technique for isolating physiologically representative cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4223–4232 (1993).

142. Ulrich, A. B., Schmied, B. M., Standop, J., Schneider, M. B. & Pour, P. M. Pancreatic cell lines: a review. *Pancreas* **24**, 111–120 (2002).
143. Halban, P. A., Praz, G. A. & Wollheim, C. B. Abnormal glucose metabolism accompanies failure of glucose to stimulate insulin release from a rat pancreatic cell line (RINm5F). *Biochem. J.* **212**, 439–443 (1983).
144. Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., Wollheim, C. B. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* **130**, 167–178 (1992).
145. Miyazaki, J.-I., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., Yamamura, K. -I. Establishment of a pancreatic β cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* **127**, 126–132 (1990).
146. Efrat, S. Genetically Engineered Pancreatic β -Cell Lines for Cell Therapy of Diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **875**, 286–293 (1999).
147. Melloul, D., Marshak, S. & Cerasi, E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* **45**, 309–326 (2002).
148. Schuit, F. C. Is GLUT2 required for glucose sensing? *Diabetologia* **40**, 104–111 (1997).
149. Thorens, B., Sarkar, H. K., Kaback, H. R. & Lodish, H. F. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and β -pancreatic islet cells. *Cell* **55**, 281–290 (1988).
150. De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., Schuit, F. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J. Clin. Invest.* **96**, 2489 (1995).
151. Ferrer, J., Benito, C. & Gomis, R. Pancreatic islet GLUT2 glucose transporter mRNA and protein expression in humans with and without NIDDM. *Diabetes* **44**, 1369–1374 (1995).
152. Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., Scharfmann, R. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J. Clin. Invest.* **121**, 3589–3597(2011).
153. Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B., Maechler, P. Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology* **145**, 667–678 (2004).
154. McClenaghan, N. H. & Flatt, P. R. Engineering cultured insulin-secreting pancreatic B-cell lines. *J. Mol. Med. (Berl)*. **77**, 235–243 (1999).
155. Asfaw, A., Wibetoe, G. & Beauchemin, D. Solid sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma optical emission spectrometry for discrimination of automotive paint samples in forensic analysis. *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 1928–1934 (2012).
156. Umeda, M., Hiramoto, M., Watanabe, A., Tsunoda, N. & Imai, T. Arginine-induced insulin secretion in endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 717–722 (2015).

Příloha

Přílohou k této diplomové práci je publikace:

Palivec, V., Viola, C. M., Kozak, M., Ganderton, T. R., Křížková, K., Turkenburg, J. P., Halušková, P., Žáková, L., Jiráček, J., Brzozowski, A. M. Computational and Structural Evidence for Neurotransmitter-Mediated Modulation of the Oligomeric States of Human Insulin in Storage Granules. *J. Biol. Chem.* **292**, 8342-8355 (2017).

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

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