

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Biochemie



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova

Marek Polák

Vliv aminokyselin z C-konce řetězce B insulínu na selektivitu k jednotlivým isoformám
insulinového receptoru.

The role of amino acids from the C-terminus of the insulin B chain in the selectivity
towards insulin receptor isoforms.

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, 15.05.2018

Podpis

Poděkování

Úvodem bych chtěl poděkovat mojí školitelce RNDr. Lence Žákové, PhD. za umožnění vypracování této práce, její neskutečnou trpělivost, vynalézavost a ochotu odpovídat na nekonečné množství mých vědeckých otázek.

Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. a celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Závěrem bych chtěl poděkovat svým rodičům za podporu při studiu.

P.S. „*A long ride ahead of me.*“

Abstrakt

Hlavní funkce insulinu jako hormonu je regulace hladiny glukosy v krvi. Tato regulace se děje v různých buňkách těla různým způsobem a na různé úrovni. Složitost regulace je navíc znásobená tkáňovou distribucí dvou isoform insulínového receptoru (IR), a to IR-A a IR-B. IR-B je zodpovědný převážně za metabolické efekty a distribuci v tukové tkáni, svalové tkáni a hepatocytech, zatímco IR-A se převážně nachází v lymfocytech, slezině, mozku, rakovinných buňkách a má zejména mitogenní účinek.

Dnes je léčba diabetiků zaměřená na terapii insulínovými analogy, tedy látkami odvozenými od insulinu, které mají k IR-A, nebo IR-B různou vazebnou afinitu. Na trhu je dnes šest druhů těchto analogů a dělí se do dvou skupin – na analogy s rychlým nástupem účinku (*fast-acting*), a na analogy s dlouhodobým nástupem účinku (*basal*). Léčba je nejčastěji zaměřená na kombinaci těchto dvou typů analogů.

V roce 2011 Prof. Belfiore z univerzity v Catanzaru publikoval článek o přímé souvislosti mezi diabetem mellitem a vznikem některých druhů rakoviny. Tím se začalo veřejně diskutovat o vazbě insulinu/insulínových analogů na mitogenní receptor IR-A nebo IGF-1R. V tom samém roce dvě vědecké skupiny dánské firmy Novo Nordisk publikovaly první zmínky o receptorově selektivních IR-A/IR-B analogích.

Tato bakalářská práce je zaměřena na přípravu nových, receptorově selektivních IR-A/IR-B insulínových analogů, otestování jejich vazebných afinit vůči oběma isoformám IR-A a IR-B a určení jejich schopnosti spouštět signální dráhy u příslušných isoform receptorů. Cílem bylo zjistit vliv C-konce řetězce B na receptorovou selektivitu. V pozicích B26-B30 (které jsou důležité pro vazbu insulinu na IR) byly zaměněny aminokyseliny za prolin, případně hydroxyprolin, které by měly ovlivnit konformaci peptidové vazby a tím ovlivnit vazbu na receptor. Z literatury je znám pozitivní vliv amidace C-konce řetězce B na selektivitu ve prospěch afinity vůči IR-B. Proto byly vyzkoušeny kombinace těchto dvou modifikací.

Byly připraveny 4 insulínové analogy se záměnou v pozicích B26-B30, dva s hydroxyprolinem a dva s amidovaným glycinem na C-konci řetězce B. Byly testovány jejich vazebné afinity vůči oběma isoformám IR-A/IR-B. Tři z těchto analogů vykazují jistou selektivitu vůči oběma isoformám IR-A/IR-B. Dále byla sledována míra signalizace IR těmito analogy a studium signální odpovědi. Bylo zjištěno, že míra fosforylace IR a metabolické Akt dráhy víceméně odpovídá hodnotám jejich vazebných afinit.

Studium pozic B26-B30 může pomoci k lepšímu pochopení interakci C-konce řetězce B s oběma isoformami insulinového receptoru. Zároveň tyto informace mohou být důležitým vodítkem k návrhu nových, receptorově selektivních insulinových analogů.

Klíčová slova: insulin, insulinový analog, C-konec řetězce B, insulinový receptor, interakce insulinu s IR, selektivní IR-A/IR-B analogy, isoformy receptoru, enzymatická semisyntéza, testování vazebných afinit, studium signální odpovědi.

Abstract

The main function of insulin as a hormone is to control glucose homeostasis in the blood. This control takes place at different levels in different parts of the body. The complexity of the regulation of blood glucose levels is manifested through the insulin receptor (IR) and its two isoforms, IR-A and IR-B. IR-B is responsible for metabolic effects and the distribution in adipocytes, muscles and hepatic cells, whereas IR-A has, above all, mitogenic effects with lymphocytes, spleen, brain and cancer cells.

Today's treatment of diabetes patients is focused on the use of insulin analogues, insulin replacements with a different IR-A and IR-B binding affinity. Today's patients use two different types of analogues, called *fast-acting* and *basal*, with a focus on the combination of these two types throughout the day.

In 2011, prof. Belfiore from the University of Catanzaro published a scientific article about the close relation between diabetes and some cancer types. This article triggered extensive debates about the impact of insulin or insulin analogues on the mitogenic isoform IR-A of the insulin receptor, and IR-A isoform on the insulin-like growth factor type 1. In the same year, two scientific groups from a Danish company Novo Nordisk, published the first hints at receptor isoform-selective insulin analogues.

The main goal of this thesis is to focus on the synthesis of new receptor isoform-selective insulin analogues, testing their binding affinity towards both isoforms of the insulin receptor and to determine their ability to activate signalling paths in these two isoforms of the receptor. The target was to determine the role of C-terminus of the B chain of insulin on receptor isoform selectivity. In positions B26-B30 (which are crucial for the binding affinity) amino acids were changed to proline, eventually hydroxyproline, aiming at a change of the conformation of peptide bonds and have an impact on the receptor binding affinity. It is generally known from literature the positive effect of an amidation of the C-terminus of the B-chain, so we tried testing the combination of these two modifications.

Here we present 4 insulin analogues with B26-B30 modifications, two of which with a hydroxyproline change, and two of which with a C-terminus B-chain amidation. These analogues were tested for their binding affinities towards IR-A and IR-B. Three of these have some selectivity towards different types of IR. Another study was to compare the extent of IR signalling by these analogues and the isoform-receptor's response to

these analogues. We found out that the extent of the overall IR signalization and the metabolic path more or less correspond to their binding affinities.

The study of B26-B30 positions can help to better understand how the C-terminus of the B-chain interact with the respective insulin receptor isoforms. This information can be an important clue to design new receptor-selective insulin analogues.

Key words: insulin, insulin analogue, C-terminus of B chain, insulin receptor, interaction of human insulin with its receptor, receptor-selective insulin analogues, insulin receptor isoforms, enzymatic semisynthesis, binding affinities studies, study of the signalisation response.

Obsah

1. Úvod	11
1.1 Historie insulínu	11
1.2 Struktura insulínu	12
1.3 Biosyntéza, genová regulace a degradace insulínu	14
1.3.1 Biosyntéza insulínu	14
1.3.2 Genová regulace	17
1.3.3 Degradace insulínu	17
1.4 Insulinový receptor	18
1.4.1 Interakce insulínu a IR	20
1.4.2 Aktivační kaskáda	23
1.5 Insulinové analogy	24
1.5.1 Současné insulinové analogy	24
1.5.2 Selektivní insulinové analogy	27
2. Cíl práce	30
3. Metody	31
3.1 Použité chemikálie a materiály	31
3.2 Použité přístroje	34
3.3 Příprava des[B23-B30]oktapeptidu insulínu (DOI)	35
3.3.1 Izolace a čištění DOI gelovou chromatografií	35
3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC)	35
3.5 Syntéza lineárních peptidů na pevné fázi	36
3.6 Enzymatická semisyntéza	37
3.7 Enzymatické odstranění fenylacetylové skupiny	38
3.8 Hmotnostní spektroskopie	38
3.9 Vazebné testy <i>in vitro</i>	38
3.9.1 Příprava roztoků analogů pro vazební testy	38
3.9.2 Příprava buněk pro testování vazebné afinity k IR-A	39
3.9.3 Stanovení vazebné afinity insulinových analogů k IR-A	39
3.9.4 Příprava buněk pro testování vazebné afinity k IR-B	39
3.9.5 Testování vazebné afinity insulinových analogů k IR-B	40
3.10 Metodika studia signalizace IR analogy a studium signálních odpovědí	41
3.10.1 Příprava buněk pro testování aktivace IR-A, IR-B a následných signálních odpovědí	41
3.10.2 Příprava roztoků ligandů pro stimulaci receptorů buněk	41
3.10.3 Stimulace IR-A a IR-B jednotlivými analogy	41
3.10.4 Příprava lyzátů buněk pro SDS-elektroforetickou separaci	41
3.10.5 Polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů z buněčných lyzátů v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)	42
3.10.6 Přenos elektroforeticky separovaných proteinů z gelu na membránu	42
3.10.7 Detekce proteinů pomocí protilátek	42
4. Výsledky	44
4.1 Příprava des[B23-B30]oktapeptidu insulínu (DOI)	44
4.1.1 Izolace a čištění DOI gelovou chromatografií	44
4.2 Syntéza lineárních peptidů na pevné fázi	45
4.2 Enzymatická semisyntéza	50
4.3 Odstranění fenylacetylové skupiny	54
4.4 Testování vazebné afinity vůči oběma isoformám IR <i>in vitro</i>	59

4.5	Metodika studia signalizace IR analogy a studium signálních odpovědí	61
5	Diskuse	65
6	Závěr.....	69
7	Zdroje	70

Seznam použitých zkratk

α -CT segment	C-koncový segment α -podjednotky insulinového receptoru
ACN	Acetonitril
bp	Pár bází (z angl. base pair)
BSA	Hovězí sérový albumin (z angl. Bovine serum albumin)
CCD kamera	z angl. Charced coupled device camera
CR (doména)	Doména bohatá na cystein (z angl. Cystein-Rich domain)
kryo-EM	kryo-elektronová mikroskopie
DIC	<i>N,N</i> -diisopropylkarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DOI	des[B23-B30]oktapeptid insulinu
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ESI	Ionizace elektrosprejem (z angl. Elektrospray Ionization)
FBS	Fetální hovězí sérum (z angl. Fetal bovine serum)
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonylová chránicí skupina
FnIII	Fibronektin typu III
GA	Golgiho aparát
HBB	HEPES binding buffer
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosforečnan
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
ID	Insertní doména (z angl. Insert domain)
IDE	Insulin degradující enzym (z angl. Insulin-degrading enzyme)
IGF1/2-R	Receptor pro insulinu podobný růstový faktor 1 (z angl. Insulin-like growth factor 1/2 receptor)
IGF-I/II	Insulinu podobný růstový faktor I/II (z angl. Insulin-like growth factor I/II)
IR	Insulinový receptor (z angl. Insulin receptor)

ITC	Isotermická titrační mikrokalorimetrie (z angl. Isothermal titration calorimetry)
kb	kilobit
K_d	Disociační konstanta
kDa	kiloDalton
n.d.	Neurčené (z angl. non determined)
PA	Penicilin amidohydrolasa
Pac	Fenylacetylová chránicí skupina
PAGE	Polyakrylamidová elektroforéza (z angl. Polyacrylamide gel electrophoresis)
PEG	Polyethylenglykol
pH	Záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RER	Drsné endoplazmatické retikulum (z angl. Rough endoplasmatic reticulum)
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácené fázi (z angl. Reverse phase high-performance liquid chromatography)
RTK	Tyrosin kinasový receptor (z angl. Receptor tyrosine kinase)
SD	Směrodatná odchylka (z angl. Standard deviation)
SDS	Dodecylsulfát sodný (z angl. Sodium dodecyl sulfate)
SPPS	Syntéza peptidů na pevné fázi (z angl. Solid-phase peptide synthesis)
tBu	<i>tert</i> -butylová chránicí skupina
TFA	Trifluoroctová kyselina
TPCK	6-(1-tosylamido-2-fenyl)ethyl-chloromethyl ketón
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
T-TBS	Tris/HCl pufr obsahující Tween detergent (z angl. Tween-tris buffered saline) a chlorid sodný
ÚOCHB AV ČR	Ústav organické chemie a biochemie akademie věd České republiky

1. Úvod

1.1 Historie insulinu

Dávno před objevem insulinu v roce 1922 bylo známo, že slinivka břišní vylučuje sekret, který kontroluje metabolismus cukrů. Přípravy jakékoliv látky snižující hladinu glukosy v krvi byly neúspěšné kvůli toxicitě a nečistotě připravených sloučenin. Kanadského ortopedického chirurga Frederica Bantinga napadlo izolovat ostrůvky slinivky břišní ze psů. Jeho vedoucí, profesor fyziologie John MacLeod mu poskytl na univerzitě v Torontu vlastní laboratoř, 10 psů a Bantingovi se s asistentem Charlesem Bestem podařilo v září 1921 dokázat, že psům s vyjmutou slinivkou, a tudíž rozvinutým diabetem pomáhá injekce, kterou nazval *isletin*. Tyto injekce obsahovaly extrakt z ostrůvků pankreatu, který jim snížil hladinu glukosy v krvi. K Bantingovi se koncem roku 1921 přidal biochemik J.B. Collip, který pomohl vyčistit *isletin* pro lidské použití. První injekce extraktu ze slinivky byla podána 11.1.1922 14letému kanadskému chlapci a jen mírně snížila hladinu glukosy v krvi. Až v pravidelných injekčních dávkách *isletinu* extrahovaného a vyčištěného Collipem, klesla po určité době hyperglykemie a glukosurie a vymizela ketonurie. V roce 1923 Bantingovi, Bestovi a MacLeodovi byla udělena Nobelova cena za fyziologii/medicínu¹⁻³.

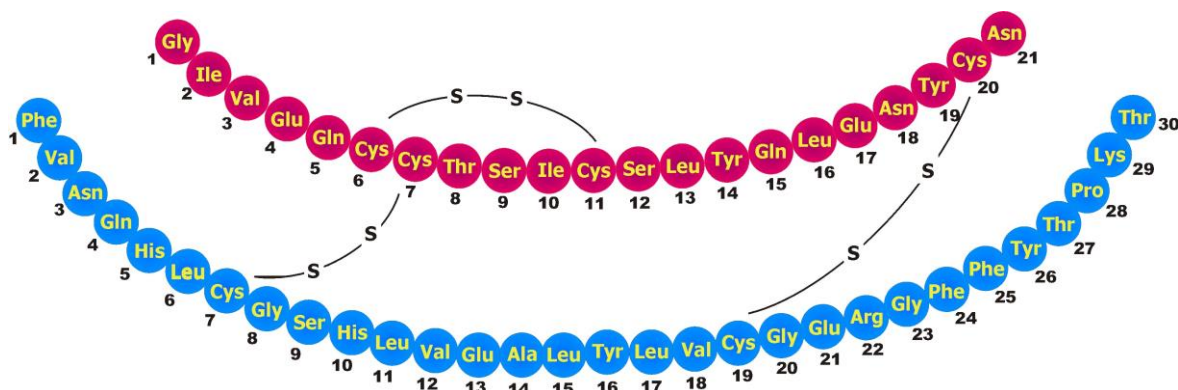
Po roce 1923 začala oficiální produkce zvířecího insulinu (nejčastěji vepřového a hovězího) založená na precipitaci v isoelektrickém bodě inzulinu (pH 5,4)³.

V 50. letech Frederick Sanger jako první provedl sekvenaci molekuly hovězího insulinu, a tím určil jeho primární aminokyselinovou sekvenci⁴. Tento objev umožnil dalším výzkumným skupinám optimalizaci produkce či výrobu insulinu. Vrcholem byla příprava lidského insulinu v roce 1978 kombinací dvou samostatně připravených řetězců insulinu⁵. Tuto syntézu navrhnul David Goeddel a jeho kolegové z firmy Genetech. Připravili oba řetězce insulinu A a B rekombinantní expresí v *Escherichia coli*. V roce 1982 se dostal do produkce první pro klinickou praxi rekombinantně připravený lidský insulin pro diabetiky, nazvaný *Humulin*[®] R (rychlý nástup účinku) a *Humulin*[®] N (normální nástup účinku)⁶.

Od 80. let 20. století se léčba diabetiků zaměřuje na podání insulinu ve formě tzv. insulinových analogů, což jsou specifické náhrady insulinu s rychlým, nebo dlouhodobým nástupem účinku⁷.

1.2 Struktura insulínu

Insulín patří do rodiny peptidových hormonů. Skládá se z 51 aminokyselin uspořádaných do dvou řetězců: řetězec A je tvořen 21 aminokyselinami (A1-A21) a řetězec B je tvořen 30 aminokyselinami (B1-B30). Řetězce jsou spojeny dvěma disulfidickými můstky v pozicích CysA7-CysB7 a CysA20-CysB19. Řetězec A má navíc jeden intramolekulární disulfidický můstek mezi pozicemi CysA6-CysA11 (Obr. 1)⁸.



Obr. 1 | Primární struktura insulínu. Řetězec A je vyznačen červeně, řetězec B je vyznačen modře⁹.

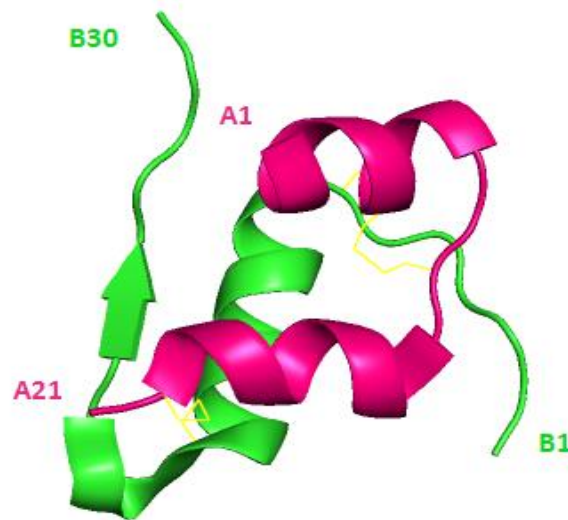
Vyřešení primární struktury Frederickem Sangerem⁴ koncem šedesátých let následovalo vyřešení sekundární a následně i terciární struktury¹⁰.

Dvě molekuly insulínu v koncentraci vyšší než 10^{-5} velmi lehce vytvářejí dimer, a za přítomnosti zinečnatých nebo jiných bivalentních iontů kovu vytvářejí stabilní hexamery. Tato agregace je důležitá pro sekreci a skladování insulínu v lidském těle¹¹. Předpokládá se, že insulín je skladován v β -buňkách Langerhansových ostrůvků slinivky břišní jako hexamer. Ovšem toto tvrzení zatím nebylo experimentálně potvrzeno¹².

Ze struktury insulínu bylo zjištěno, že řetězec A je tvořen dvěma antiparalelně uspořádanými α -šroubovicemi v pozicích A1-A8 a A13-A19 spojenými pseudo β -otáčkou v pozicích A9-A12. Řetězec B pak obsahuje jen jednu centrální α -šroubovici mezi pozicemi B9-B19 (Obr.2). Prvních osm aminokyselin řetězce B (N-konec) může být součástí α -šroubovice – tato konformace se nazývá R (z angl. *relaxed*), nebo může mít neuspořádanou strukturu a nazývá se T (z angl. *tensed*)¹³.

Velký význam pro navázání insulínu k receptoru, a dimerizaci mají aminokyseliny C-konce řetězce B, tj. aminokyseliny B20-B30. Aminokyseliny B20-B23 vytvářejí tzv. β -ohyb a aminokyseliny B24-B30 vytvářejí β -strukturu přimknutou k centrální

α -šroubovici řetězce B. Uspořádání celého insulínu vypadá tak, že C-konec řetězce B je v blízkém kontaktu s N-koncem řetězce A. Nepolární zbytky aminokyselin IleA2, ValA3, CysA11, LeuA16, LeuB11 a LeuB15 jsou natočeny směrem dovnitř a vytvářejí hydrofobní jádro molekuly. Konformace v krystalové struktuře je pak stabilizovaná vodíkovými můstky a iontovými interakcemi^{14–18}.



Obr. 2 | Terciární struktura insulínu. Tato struktura je odvozena z hexameru insulínu v konformaci T. A řetězec růžově, B řetězec zeleně, disulfidické můstky žlutě. PDB kód 2A3G. Upraveno v PyMOL 2.0.6.0. dle cit.¹⁹.

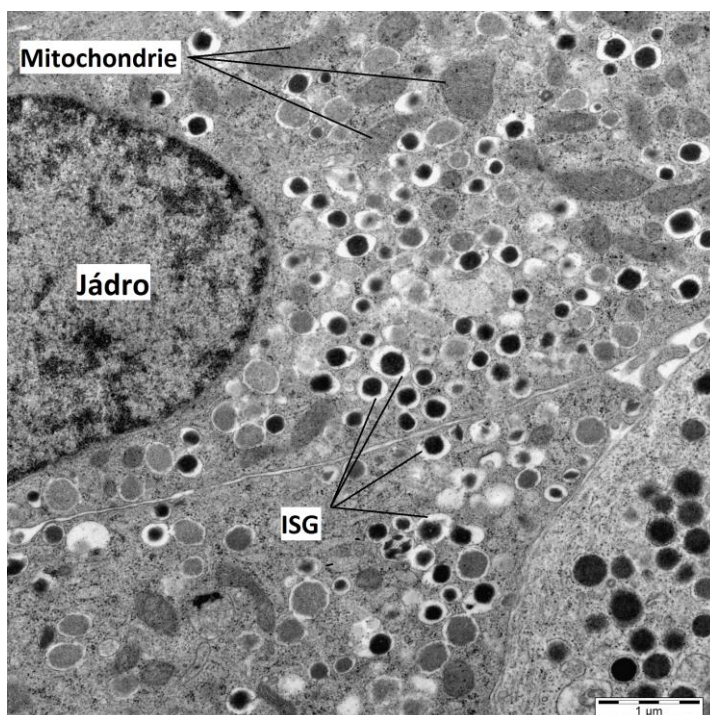
Insulín hraje nesmírně důležitou roli v regulaci hladiny glukosy v krvi, zabezpečuje transport glukosy do buněk a její následné zpracování. Má velmi důležitou roli také v regulaci metabolismu proteinů a lipidů²⁰. Insulín se váže na svůj specifický membránový receptor, tzv. insulínový receptor. Dosud nebyl popsán přesný mechanismus vazby insulínu na svůj receptor²¹. Tato vazba je specifická a celý mechanismus vazby insulínu na jeho receptor a následná regulace metabolismu glukosy je komplexní děj a narušení této rovnováhy může vést k různým onemocněním, jako je diabetes mellitus²², některé druhy rakoviny^{23,24} a Alzheimerova nemoc²⁴.

1.3 Biosyntéza, genová regulace a degradace insulinu

1.3.1 Biosyntéza insulinu

Místem biosyntézy insulinu je slinivka břišní neboli pankreas. Pankreas je pro savce orgánem důležitým hlavně pro trávení a udržení homeostázy glukosy, která je pro ně zdrojem energie. Poškození pankreatu proto vede k onemocnění diabetes mellitus. Slinivka břišní je složena z exokrinních, endokrinních a duktálních buněk. Exokrinní buňky produkují hlavně proteolytické enzymy, které jsou transportovány do tenkého střeva. Langerhansovy ostrůvky, velké 100-200 μm , které tvoří endokrinní část pankreatu, byly objeveny Paulem Langerhansem v roce 1869. Jsou to oválné útvary složené z nejméně 4 typů buněk: α -, β -, γ - a δ -buněk²⁵.

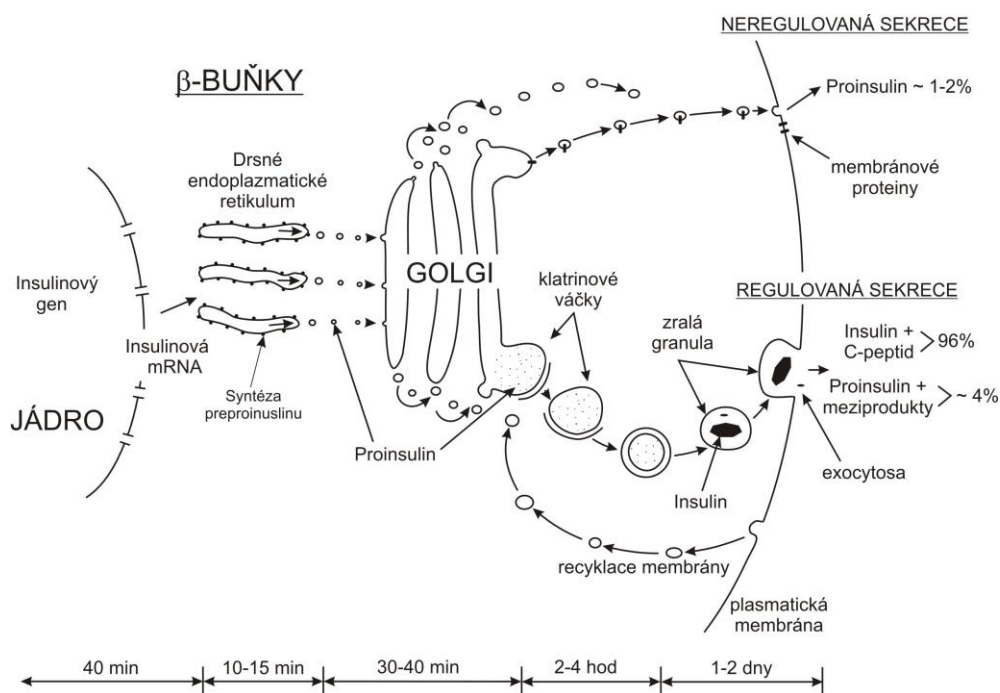
Největší podíl ze všech buněk mají β -buňky, jež tvoří 65-80 % Langerhansových ostrůvku. Tyto buňky sekretují zejména insulin, ale obsahují i jiné peptidy, jako například amylin, pancreastatin, betagranin, vesiculin nebo preptin. Tvar β -buněk je polyhedrální a jsou plné sekrečních granulí (Obr. 3). β -buňky jsou také bohaté na vápník a zinek. α -buňky produkují glukagon, γ -buňky pankreatický polypeptid a δ -buňky somatostatin. Endokrinní buňky produkující jiné hormony najdeme i v jiných částech organismu, ale buňky produkující insulin najdeme pouze ve slinivce břišní^{12,26-28}.



Obr. 3 | Snímek zachycující β -buňku potkaního Langerhansovo ostrůvku obsahující sekreční granula. Snímek byl pořízen transmisním elektronovým mikroskopem JeolJem

1011 ve spolupráci s laboratoří Dr. Romany Hadravové z ÚOCHB AV ČR – laboratoř transmisní elektronové mikroskopie. ISG – insulinové sekreční granula. Zvětšení 25 000 ×.

Biosyntéza insulinu začíná na ribosomech drsného endoplasmatického retikula (RER), kde dochází k translaci insulinového genu na prekurzor insulinu, tzv. preproinsulin. Preproinsulin je jednořetězcová molekula o velikosti 12 kDa, která na N-konci obsahuje 24 aminokyselin dlouhou sekvenci, tzv. signální sekvenci, jejíž funkcí je napomáhat transportu vznikajícího peptidu do nitra endoplasmatického retikula, kde je okamžitě sbalován do terciární struktury. Signální sekvence proto obsahuje množství hydrofobních aminokyselin, které napomáhají tomuto sbalování²⁹. Během sbalování, nebo těsně po něm je odštěpena signální sekvence specifickou membránovou peptidasou umístěnou na vnitřní straně membrány RER³⁰. Signální sekvence je následně degradována v proteasomu na jednotlivé aminokyseliny. Vzniklý proinsulin je transportován v membránových váčcích, které ho chrání před degradací v cytoplazmě, k cisternám Golgiho aparátu (GA) (Obr. 4)²⁹.



Obr. 4 | Časový průběh zachycující syntézu insulinu v β -buňkách. Ve spodní části obrázku se nachází časová osa. Insulin je exocytován ven z buňky spolu s C-peptidem tzv. regulovanou sekrecí²⁹.

Proinsulin se skládá ze tří částí: N-terminální část začíná N-koncem řetězce B insulinu, následuje C-peptid (u obratlovců o délce 30-35 aminokyselin) a za ním řetězec A insulinu. Savčí proinsulin má od 81 (kráva) do 86 (člověk, kůň, potkan) aminokyselin. Tato variabilita je vždy způsobená různou délkou C-peptidu. Teoreticky vůbec není nutné, aby délka C-peptidu byla kolem 30 aminokyselin. Z předešlých výzkumů vyplývá, že pro správnou terciární strukturu proinsulinu, a tudíž i insulinu musí být délka vmezeřeného C-peptidu minimálně 5-8 aminokyselin. C-peptid je pak spolu s insulinem vylučován do krve. Aminokyselinová variabilita C-peptidu naznačuje, že pravděpodobně nemá žádnou významnou fyziologickou funkci³¹.

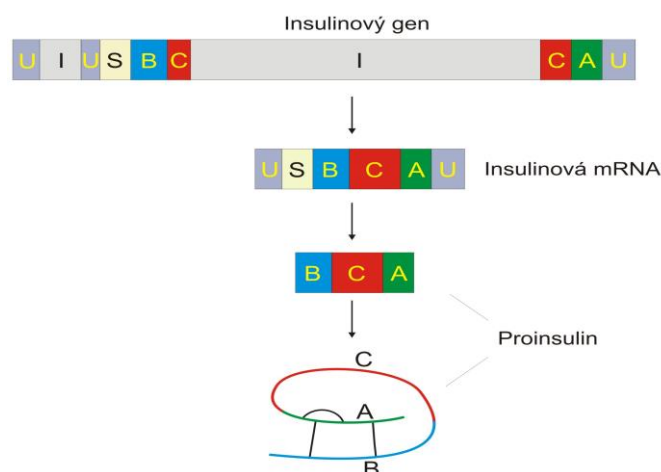
Po translokaci a odštěpení signálního peptidu se molekula proinsulinu rychle složí do správné 3D konformace a vytvoří se disulfidické můstky. Takto sbalený proinsulin je transportován z *cis* cisteren do *trans* cisteren GA, kde se proinsulin koncentruje v sekrečních granulích. GA hraje nezbytnou roli při zpracování a třídění proteinů ve všech sekrečních buňkách³². V *trans* cisternách GA začínají pučet nezralá granula s proinsulinem. Ta jsou mírně kyselá a obsahují hodně proinsulinu a málo insulinu. Jak granula dozrávají, prostředí je kyselejší, což způsobí aktivaci proteas konvertujících proinsulin na insulin³³.

Všechny známé proinsuliny mají několik bazických aminokyselin spojujících C-peptid s řetězcem insulinu. C-konec řetězce B a N-konec C-peptidu spojuje nejčastěji dipeptid Arg-Arg a C-konec C-peptidu s N-koncem řetězce A spojuje dipeptid Lys-Arg. K vyštěpení C-peptidu a konečné konverzi jsou zapotřebí dva enzymy. Jeden z nich je endopeptidasa se specifitou podobnou trypsinu, tzv. „trypsin-like“ enzym, který štěpí za páry bazických aminokyselin. U lidského proinsulinu je to za párem Arg32 a Arg65. Druhým enzymem je exopeptidasa, která odstraňuje z C-konce řetězce B a C-konce C-peptidu dvě bazické aminokyseliny Arg31, Arg32 a Lys64, Arg65^{34,35}.

Vzniklý insulin je pak skladován v sekrečních granulích jako hexamer při pH 5,0 - 5,5. Tento komplex je stabilizován díky vzájemným interakcím šesti glutamovým kyselinám v pozici B13. Při vyloučení do krve, která má pH 7,4, dochází k deprotonaci karboxylu, a tím k ztrátě koordinace okolo zinečnatých iontů. To způsobí rozpad krystalů v krevním séru. Samotné vyloučení insulinu z β -buněk je exocytóza, a je zejména regulována hladinou glukosy v krvi³⁶.

1.3.2 Genová regulace

Insulinový gen byl poprvé charakterizován v roce 1977³⁷. Lidský genom obsahuje jen jednu kopii genu pro insulin. Gen je umístěný na krátkém raménku chromozomu 11 v regionu p15, skládá se ze 3 exonů a 2 intronů (Obr.5)³⁸. Je veliký asi 19 kb a obsahuje 1430 párů bází (bp). Genu pro insulin na chromosomu předchází gen kódující tyrosinhydroxylasu ve vzdálenosti 2,7 kb, a za ním ve vzdálenosti 1,6 kb následuje gen kódující insulin-like growth factor II (IGF-II)³⁹.



Obr. 5 | Znázornění insulinového genu. Zeleně je vyznačen gen pro řetězec A, modře gen pro řetězec B, červeně gen pro C-peptid. Další části jsou signální sekvence potřebné pro transkripci a exony, které se vyštěpují²⁹.

Je zajímavé, že mutace způsobené aminokyselinovou substitucí jsou mnohem více časté na úsecích kódujících C-peptid a signální sekvenci, než na řetězcích A a B. V průběhu let bylo také identifikováno několik bodových mutací na řetězcích A a B. Jsou to neaktivní insuliny, které byly nazvány podle místa, kde byly objeveny, např. insulin Los Angeles (záměna B24Phe → B24Ser), insulin Chicago (záměna B25Phe → B25Leu) a insulin Wakayama (záměna A3Val → A3Leu). Nízká biologická aktivita těchto mutantů je způsobená tím, že mutace se nacházejí na pozicích, které jsou přímo zodpovědné za vazbu insulinu na insulinový receptor⁴⁰.

1.3.3 Degradace insulinu

Za degradaci insulinu je zodpovědná jediná proteasa, která může štěpit insulin bez nutnosti redukce disulfidových můstků. Na konci 80. let dostal tento enzym konečný název, a to *insulin degradující enzym* (IDE). Tento enzym se vyskytuje v různých tkáních⁴⁰. Je to metaloproteasa se Zn^{2+} iontem v aktivním místě⁴¹. Insulin je pro IDE

substrát s nejvyšší afinitou, avšak IDE dokáže vázat i jiné substráty, jako např. glukagon nebo IGF-II^{42,43}. IDE se nachází v různých tkáních, byl identifikován v peroxisomech, v cytosolu, v endosomech a částečně i na plasmatické membráně buněk^{40,44,45}.

Primární místo insulinové degradace je v játrech, kde se metabolizuje 80 % cirkulujícího insulinu. Druhé nejvýznamnější místo insulinové degradace jsou ledviny, kde se odbourává asi 50 % insulinu cirkulujícího v periferním oběhu. Ledviny také metabolizují proinsulin a většinu C-peptidu mechanismem glomerulární filtrace⁴⁶. Dalším důležitým místem je sval. V malých množstvích k degradaci dochází také v adipocytech, fibroblastech a lymfocytech⁴⁷⁻⁴⁹.

Vazba insulinu na receptor spouští kaskádu reakcí, které umožní vstup glukosy do buňky, zároveň se však spouští kaskáda reakcí zodpovědná za degradaci insulinu. Insulinový receptor sám o sobě insulin nedegraduje, jen ho vystavuje působení IDE⁵⁰.

Určitá část insulinu se i z vnitřku buňky vrací nedotčená, nebo částečně degradována zpět do krevního oběhu. Takový insulin se pak může znovu vázat na insulinový receptor a ovlivňovat metabolismus glukosy⁵¹.

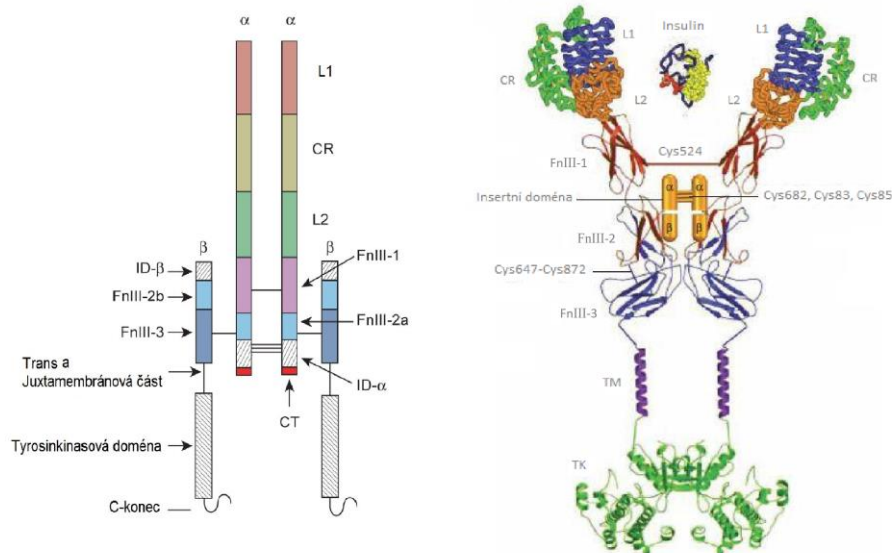
1.4 Insulinový receptor

Vazba insulinu na cílovou buňku je zprostředkována insulinovým receptorem (IR). V 80. letech byly rekombinantně připraveny první IR a chvíli na to byl gen i osekvenován⁵². Gen pro lidský IR se nachází na 19. chromosomu a zahrnuje 22 exonů a 21 intronů. Receptor je syntetizovaný jako jednořetězcový protein o délce 1380 aminokyselin, který je následně sbalován a posttranslačně upravován. Konečným výsledkem alternativního sestřihu exonu 11 vznikají dvě isoformy IR, které se liší absencí (IR-A) nebo přítomností (IR-B) 12 aminokyselin, které jsou součástí α -CT podjednotky, neboli α -CT segmentu (aminokyseliny 717-728)⁵³.

Tyto dvě isoformy mají rozlišnou tkáňovou distribuci. Zatímco IR-B má zejména metabolické účinky a nachází se v tkáních zejména s metabolickým účinkem, jako jsou játra (>95%), kosterní svalstvo, a podkožní tuk, IR-A má hlavně mitogenní účinek a nachází se např. v embryonální, lymfatické tkáni nebo v rakovinných buňkách^{54,55}.

Insulinový receptor (IR, z angl. Insulin receptor) patří do rodiny receptorů s tyrosinkinasovou aktivitou (RTK). Strukturou je to glykosylovaný transmembránový homodimer, skládající se ze dvou extracelulárních α -podjednotek a dvou

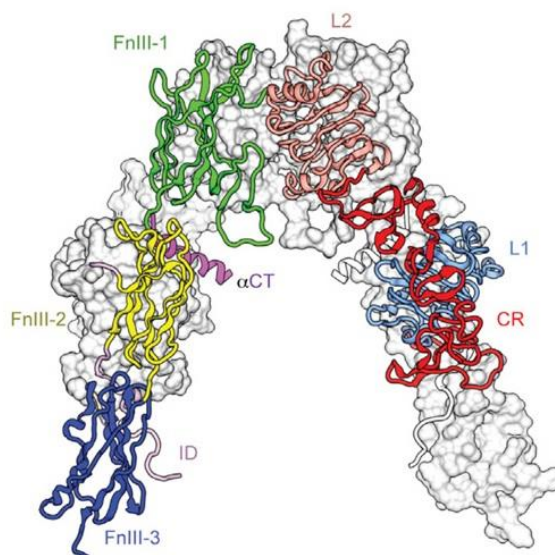
transmembránových β -podjednotek spojených třemi disulfidickými můstky (Obr. 6). Extracelulární část IR tvoří α -podjednotka a 194 aminokyselin β -řetězce. Část β -podjednotky pak tvoří jednoduchou transmembránovou sekvenci a 403 aminokyselin vytváří cytoplasmatickou doménu s tyrosinkinasovou aktivitou. Vazba ligandu v α -podjednotce stimuluje vznik tyrosinkinasové aktivity v β -podjednotce^{53,55}.



Obr. 6 | Znázornění insulinového receptoru. Na levé straně se nachází model rozložení jednotlivých proteinových domén, černými horizontálními čarami jsou znázorněny disulfidické vazby spojující podjednotky α a β . Na pravé straně se nachází terciární struktura IR. L1 a L2 – domény bohaté na leucin; CR – doména bohatá na cystein; FnIII-1-3 – fibronektinové domény; TM – transmembránová část; TK – tyrosinkinasová doména; ID- α/β – insertní doména. Molekula insulinu je vložena pro porovnání velikosti ligandu a receptoru. Přeloženo a upraveno dle cit.⁵³.

V roce 2006 byla úspěšně vyřešena krystalová struktura extracelulární části IR⁵⁶. Extracelulární část se skládá ze dvou podjednotek α , které jsou propojeny disulfidickými můstky. Podjednotka α obsahuje na N-konci dvě globulární domény bohaté na leucin, L1 a L2 (aminokyseliny 1-158 a 309-469), které jsou odděleny oblastí bohatou na cystein (CR, z angl. *Cysteine-Rich region*). C-konec ektodomény se skládá ze tří domén složených z fibronektinu III (FnIII-1, FnIII-2, FnIII-3). Tyto domény mají velikost asi 100 aminokyselin. Doména FnIII-2 obsahuje insertní doménu (ID, z angl. *Insert Domain*) o velikosti 124 aminokyselin a je tvořena C-koncem α -podjednotky a N-koncem β -podjednotky.

ID spojuje α a β podjednotky cysteinovým můstkem v pozici α -C647 a β -C860. ID v α -podjednotce pak obsahuje tři disulfidické můstky v pozicích C682, C683 a C685. Doména FnIII-1 také obsahuje α - α disulfidický můstek v pozici C524 (Obr. 6, str. 19). β -podjednotky jsou dále tvořeny transmembránovou částí, juxtamembránovou částí, tyrosinkinasovou doménou (aminokyseliny 980 – 1225) a C-koncem obsahujícím dvě fosforylační pozice (aminokyseliny 1316, 1322)^{53,55,56}.



Obr. 7 | Struktura ektodomény IR s barevně rozlišenými doménami. L1 a L2 – leucinové domény; CR – doména bohatá na cystein; FnIII-1-3 – fibronektinové domény; ID – insertní doména; α -CT peptid je vyznačen fialově. Převzato z cit.⁵⁷.

Krystalografické studie dále ukázaly tvar ektodomény, která je uspořádaná do písmena obráceného "V". Jedna část je tvořena doménami L1, CR a L2, druhá je tvořena lineárním uspořádáním FnIII-1 – FnIII-3 domén (Obr. 7). Dále bylo ukázáno, že C-konec jedné α -podjednotky, nazývaný α -CT peptid, který je nesmírně důležitý pro vazbu insulínu na IR⁵⁴, leží na β -skládaných listech domény L1 druhé α -podjednotky^{52,53,57-60}.

1.4.1 Interakce insulínu a IR

Jednou z hlavních úloh insulínu je snižování hladiny glukosy v krvi, a to inhibicí glukoneogeneze a glykogenolýzy. Insulin se tak váže na IR a způsobuje konformační změnu IR, která vyústí ve fosforylaci tyrosinových zbytků v intracelulární části IR a v případě metabolického efektu k následnému vychytávání glukosy z krve⁶¹.

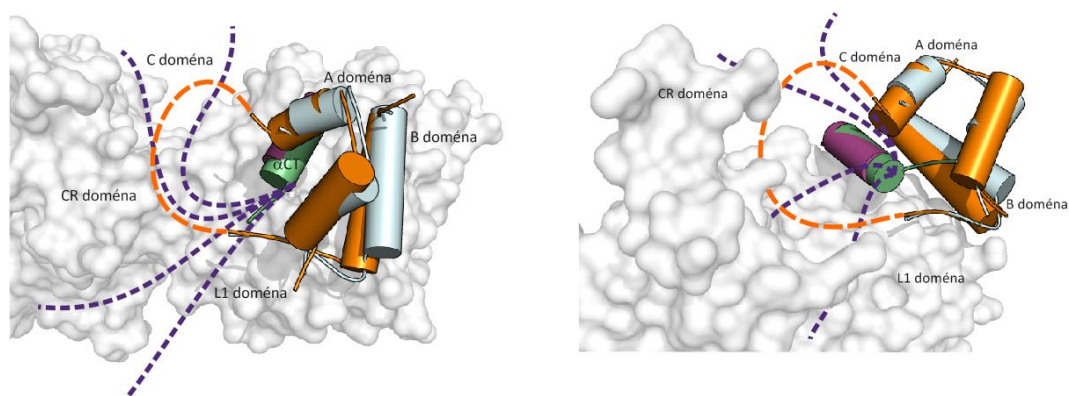
Několik posledních let bylo pokrokových pro výzkum interakce insulínu a IR. Podařilo se určit krystalovou strukturu ektodomény IR, čímž byla zjištěna vazebná místa IR pro insulín⁵⁶. V roce 2013 byly publikovány první výsledky interakce insulínu s IR za pomoci použití analogů s vyšší vazební afinitou, než je lidský insulín⁶².

Určení krystalové struktury ektodomény IR bylo průlomové, protože se podařila přesnější lokalizace vazebných míst na receptoru^{56,62}.

Byly tak určeny 2 vazebná místa na receptoru – receptorové vazebné místo 1 a 2 (*site 1* a 2). Nahrazováním jednotlivých aminokyselin IR pomocí alaninu (tzv. *alanine scanning mutagenesis*) bylo zjištěno, že navázání insulínu nastává za situace vysoce afinitního stavu IR, který vzniká při vzájemném kontaktu vazebných míst 1 a 2. Taktéž se může vázat i druhá molekula insulínu na tzv. vazebné místo 2. Tato vazba může zároveň oslabit první vazbu insulínu⁶³.

Vazebné místo 1 na IR je tvořeno doménou bohatou na leucin, CR doménou a α -CT peptidem. CR doména leží mezi doménami bohatými na leucin; při studiu pomocí chimerických IR/IGF-1R receptorů bylo zjištěno, že její význam spočívá spíše při vazbě IGF-1 na IGF-1R⁶⁴.

Důležitost α -CT peptidu pro interakci insulínu s IR byla dokázána hned několika studiemi. Experimentem s navázanými foto-aktivovanými skupinami byly dokázány kontakty ValA3, ThrA8, PheB25, PheB27 s α -CT peptidem⁶⁴. Cílená mutace Phe714 za Ala714 ukázala na velký význam této pozice (Obr. 9C, str. 22)⁶⁵. Byly provedené četné studie pomocí isothermní titrační mikrokolorimetrie (ITC) a bylo zjištěno, že nepřítomnost α -CT peptidu výrazně snižuje vazbu ligandu na receptor⁶⁶. Nejnovější pozorování ukazují na strukturu α -CT peptidu jako na trubici o vysoké elektronové hustotě ležící na L1 doméně (Obr. 8)⁵⁴.

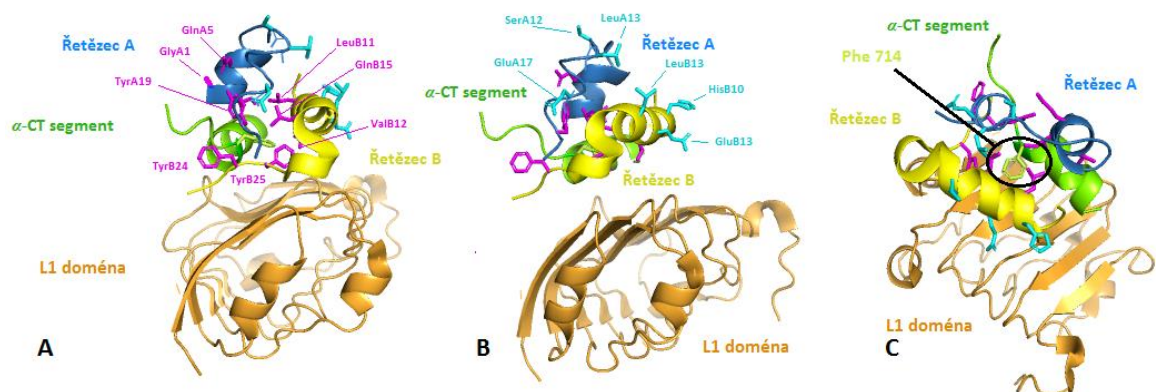


Obr. 8 | Schematické znázornění α -CT peptidu jako válce o vysoké elektronové hustotě

ležícího napříč L1 doménou. Šedě je vyznačená elektronová hustota domén IR. Vpravo se nachází pohled z jiného uhlu. Převzato a upraveno z cit.⁵⁴.

Vazebné místo 2 (*site 2*) je tvořeno zejména doménami FnIII-1 a FnIII-2. Studie chimerických IR/IGF-1R receptorů, foto-aktivovatelných skupin a výsledky vazebných studií potvrdili význam β -smyček domény FnIII-1 při vazbě insulinu na IR^{56,63}.

Insulin při vazbě na IR musí podstoupit jistou konformační změnu, a to přejít do aktivní formy. Aktivní forma insulinu není dodnes plně objasněná. Ví se však, že první kontakt s IR je pomocí C-konce řetězce B, nejpravděpodobnější je kontakt postranního řetězce PheB25 (tato část molekuly je oddělena od α -helixu)^{62,67}. Po vykrystalizování ektodomény receptoru IR byla identifikována dvě vazebná místa, která jsou zodpovědná za vazbu insulinu na IR (Obr. 9A,B). První vazebné místo obsahuje aminokyseliny GlyA1-ValA3, GlnA5, TyrA19, LeuB11, ValB12, GluB15, PheB24 a PheB25, druhé vazebné místo zahrnuje aminokyseliny SerA12, LeuA13, GluA17, HisB10, GluB13 a LeuB17. Při konformační změně se odklání C-konec řetězce B od molekuly insulinu tak, aby byla umožněna interakce N-konce řetězce A s klíčovými aminokyselinami na IR⁶⁸. Také se ukazuje, že aminokyseliny B26-B30 nejsou nezbytné pro vazbu na IR⁶⁹. Jedním z důkazů je vysokoafinitní vazba zkrácených analogů na IR a dalším důkazem jsou cílené mutagenese glycinem v pozicích B27, B28, B29, B30. Analog [GlyB27, GlyB28, GlyB29, GlyB30]-insulin vykazoval 86% vazebnou afinitu vůči IR (100 % = lidský insulin)^{58,60,70}.

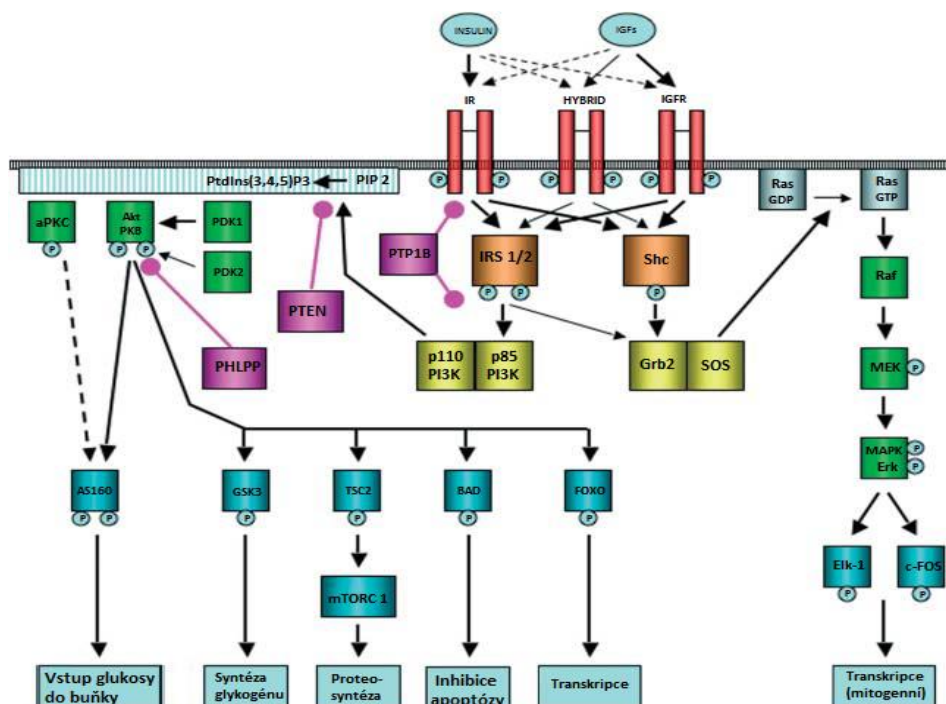


Obr. 9 | Znázornění vazebného místa 1 a vazebného místa 2. Vazebné místo 1 je tvořeno aminokyselinami GlyA1-ValA3, GlnA5, TyrA19, LeuB11, ValB12, GluB15, PheB24 a PheB25 (A). Vazebné místo 2 je tvořeno aminokyselinami SerA12, LeuA13, GluA17, HisB10, GluB13 a LeuB17 (B). Pohled na pozici 714, která je nezbytná pro vazbu insulinu na IR (C). Upraveno v PyMOL 2.0.6.0.; PDB kód: 4OGA dle cit²¹.

1.4.2 Aktivační kaskáda

Navázání insulínu způsobí konformační změnu na IR, která vyústí ve fosforylaci tyrosinových zbytků v intracelulární části IR. To dále způsobí řetězovou reakci, která vede buď k metabolickému nebo k mitogennímu efektu. Všechny tyrosiny jsou od sebe vzdáleny tak, aby se zabránilo fosforylační smyčce. Mapování pomocí fosfopeptidů (tzv. *phosphopeptide mapping*) a záměrné mutace ukázali, že na IR se nacházejí 8 tyrosinů, které se aktivně fosforylují: tři jsou v juxtamembránové části (aminokyseliny 953, 960, 972), tři v katalytické doméně (aminokyseliny 1146, 1151, 1152) a dva v C-koncové doméně (aminokyseliny 1316 a 1322). Nejdůležitější se ukázaly být tyrosiny právě v katalytické doméně^{55,71}.

Aktivovaný IR dále fosforyluje substráty, kterými bývají intracelulární proteiny IRS: IRS-4 (z angl. Insulin Receptor Substrate), IRS-5/DOK4, IRS-6/DOK5, Shc Gab1, Cbl, APS (z angl. Associate Protein Substrate) a některé členy rodiny proteinů regulujících signalizaci. Fosforylované proteiny se pak vážou na efekторы pomocí SH2 domén (z angl. Src homology 2) a ta vyústí ve dvě možné dráhy, a to metabolickou nebo mitogenní (Obr. 10)⁵⁵.



Obr. 10 | Signalizační cesty tyrosinkinaseového receptoru po jeho aktivaci různými ligandy. Převzato a přeloženo z cit.⁷².

Jako první je označovaná metabolická dráha fosfoinosid 3-kinasy (PI3K)/Akt, která je zodpovědná za metabolický efekt, např. pro snížení hladiny glukosy v krvi. Protein Akt (protein kinasa B) je také zodpovědný za aktivaci některých enzymů glykolýzy, aktivaci GLUT-4 transportních váčků v cytoplazmě, aktivaci FoxO proteinů FoxO1,-2,-3,-4 (z angl. Forkhead Box 'Other' proteins), které jsou regulátory metabolismu, apoptózy a inhibitory buněčného růstu^{55,73}.

Druhá signalizační dráha se nazývá Ras/ERK, protože se spouští aktivace Ras/Raf/MAPK/ERK1/2 kaskády, která vyúsťuje v proliferativní efekt, zprostředkovaný na úrovni transkripčních faktorů. Po aktivaci IRS a SH2 proteinů se aktivují tzv. Grb2 proteiny (z angl. growth-factor receptor-bound proteins), které pak vytváří komplex Grb/Sos. Tento komplex spouští aktivaci GTPasy p21ras. Protein p21ras patří do rodiny Ras proteinů, které aktivují MAPK kinasu (z angl. mitogen-activated protein kinase), jež následně aktivuje celou řadu substrátů jako jsou SRC1, Pax6, STAT3, cFOS, c-myc a Elk1 proteiny. Tyto proteiny jsou v přímém spojení s regulací transkripce^{24,55,72,74}.

1.5 Insulinové analogy

V minulosti se pro léčbu diabetiků využívali zvířecí insuliny zejména z hovězího nebo vepřového pankreatu. Kvůli nečistotám se u diabetiků často vyskytovaly různé alergie a insulinové rezistence spojené se zvýšením specifických protilátek proti insulinu. v 80. letech se začal insulin vyrábět rekombinantní cestou, a to buď v *Escherichia coli* nebo v *Saccharomyces cerevisiae*⁷⁵.

Bohužel, i přes léta výzkumu, intenzivní léčbu diabetiků, sledování jejich glykemického indexu, ovlivňování příjmu potravy a celosvětově vzdělávacím programům pro diabetiky je ještě stále velmi vysoká morbidita a mortalita, nejen v rozvinutých zemích⁷⁵.

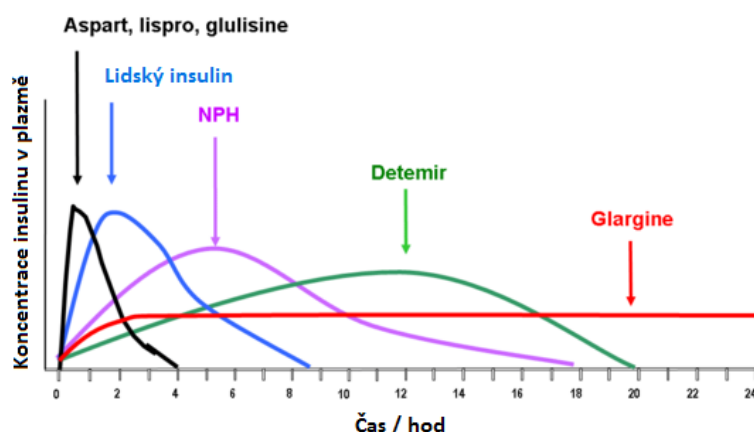
1.5.1 Současné insulinové analogy

Pro léčbu diabetiků 1. typu jsou dnes nejvíc využívány tzv. insulinové analogy. Jsou to látky odvozené od insulinu, které vznikají záměnou aminokyselin v primární sekvenci, čímž poskytují pozměněné biologické a fyzikálně chemické vlastnosti. Jejich primární účel je zlepšovat kvalitu a délku života diabetiků. Sekundárním účelem je studium interakce insulinu a insulinového receptoru^{76,77}.

Insulinové analogy se dělí do dvou základních tříd – s rychlým nástupem účinku (*fast-acting*) a dlouhodobým nástupem účinku (*basal*) (Obr. 11). Léčba diabetiků je dnes zaměřena zejména na kombinaci těchto dvou typů analogů⁷⁷.

Jako první analog s rychlým nástupem účinku byl insulin *Lispro*, který je komerčně v prodeji od roku 1996 pod názvem *Humalog*[®] (Obr.12, str. 26). V tomto insulinu jsou zaměněné dvě aminokyseliny, a to ProB28 a LysB29 za LysB28 a ProB29, čímž se ztrácí přirozená schopnost insulinu tvořit dimery. V roce 2000 přišel na trh analog s názvem *Aspart* (*Novolog*[®]) od firmy Novo Nordisk. Prolin v pozici B28 je zaměněn za aspartát, čímž se opět ztrácí schopnost tvořit dimery⁷⁷.

Nejnovějším přírůstkem je analog *Glulisin* (*Sanofi*[®]), dostupný od roku 2006. V tomto analogu jsou zaměněné aminokyseliny lysin v pozici B29 za kyselinu glutamovou a asparagin v pozici B3 za lysin. Klinické výzkumy ukazují, že analogy *Aspart* a *Glulisin* mají farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti velice podobné lidskému insulinu⁷⁷.



Obr. 11 | Graf znázorňující účinnost analogů v čase. Aspart, Lispro, Glulisin jsou analogy s rychlým nástupem účinku, takže mají rychlejší nástup účinku než lidský insulin. NPH, Detemir a Glargine jsou basální analogy, mají dlouhodobý účinek. Upraveno a přeloženo dle cit.⁷.

Analogy s dlouhým nástupem účinku neboli basální insuliny, mají neméně důležitou roli v léčbě diabetiků. Úlohou basálních insulinů je napodobit fyziologický glykemický profil glukosy u člověka. Primární myšlenka basálních insulinů tkví v snížení rozpustnosti insulinů po subkutánním podání⁷⁷.

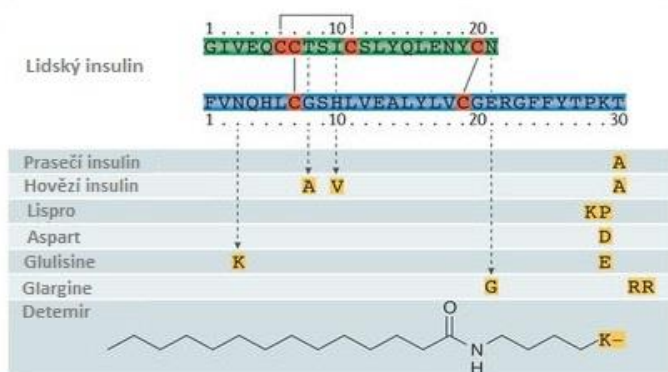
Od roku 2001 je na trhu dostupný basální insulin *Glargin* (*Lantus*[®], *Sanofi*[®]). Tento

analog je prodloužen navíc o dva argininy v B31 a B32, čímž je změněn jeho isoelektrický bod. Po vpíchnutí do kůže se insulin srazí, jakožto látka nacházející se v prostředí svého isoelektrického bodu a následně začíná jeho pomalé uvolňování do krve^{77,78}.

Výzkum syntézy insulinových analogů se dnes zaměřuje různým směrem. Vznikla myšlenka navázání řetězce mastné kyseliny na insulin. Insulin se může navázat na krevní protein albumin, ze kterého se postupně uvolňuje. Takto byl představen firmou Eli Lilly lipidovaný insulin s navázaným zbytkem kyseliny palmitové na lysin v pozici B29 (název W99-S-32), nebo firmou Novo Nordisk insulin s navázaným zbytkem kyseliny myristové na LysB29 a odstraněným threoninem v pozici B30 (tzv. *LysB29-myristyl desB30-insulin*). V roce 2006 byl analog schválen pod názvem *Detemir*^{77,79}.

Posledním přírůstkem do rodiny basálních analogů jsou insuliny *Decludec* a *Peglispro*. *Decludec* je desB30-insulin s navázanou postranní acetylovanou mastnou kyselinou na lysinu B29. V jeho přítomnosti se nachází molekuly fenolu a Zn^{2+} ionty. Po subkutánním podání se fenol oddisociuje a analog vytváří se Zn^{2+} ionty velké oligomerní struktury, ze kterých se pomalu odděluje analog. V roce 2013 byl schválen v Evropské unii a 2015 v USA. Insulin *Peglispro* (LY2605541, Eli Lilly) je derivát insulínu s navázaným lineárním řetězcem polyethylenglykolu (PEG) o velikosti 20 kDa. Měl velmi slibné výsledky díky 36 hodinovému nástupu účinku a hepatoselektivní akci^{75,77}.

V klinické fázi III se objevili problémy se ztrátou váhy testovaných pacientů a znepokojivé jaterní testy se zvýšenými hodnotami jaterních enzymů. Proto Eli Lilly po této klinické fázi ukončilo jeho testování a tento analog se nikdy nedostal do komerčního prodeje⁸⁰.



Obr. 12 | Obrázek přehledně znázorňující dnes používané insulinové analogy a jejich záměny v primární sekvenci. Převzato a přeloženo z cit.⁷⁷.

1.5.2 Selektivní insulinové analogy

Jak již bylo zmíněno výše, výsledkem alternativního sestřihu insulinového receptoru jsou dvě isoformy IR, lišících se absencí (IR-A), nebo přítomností (IR-B) 12 aminokyselin, nazývaných α -CT segment. Tento segment je nesmírně důležitý pro navázání insulinu na IR, protože přímo interaguje s C-koncem řetězce B insulinu při vazbě na receptor. Obě isoformy se vyznačují specifickou tkáňovou expresí. IR-B je zodpovědný hlavně za metabolické efekty a nachází se především na hepatocytech (>90%), kosterním svalstvu (~70%) a podkožním tuku (~70%), zatímco IR-A má predominantní mitogenní efekt a nachází se v mozku, slezině, embryonální tkáni a rakovinných buňkách⁵⁴.

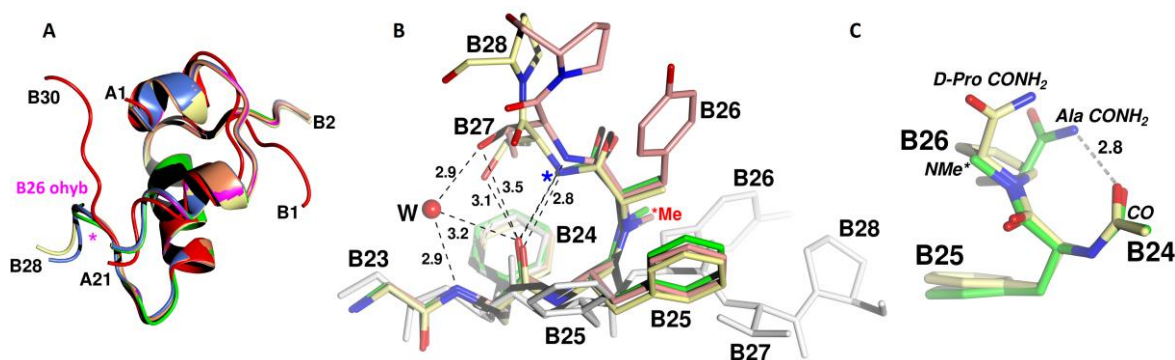
V posledních letech se výzkum insulinových analogů zaměřuje právě na selektivitu vůči oběma isoformám, IR-A/IR-B. Je to způsobeno několika fakty: (i) byla potvrzena přímá souvislost mezi některými druhy rakoviny (prsů, jater, plic, ledvin, pankreatu, endometria a kolorektální druhy) a diabetem²⁴, (ii) bylo spekulováno o souvislosti mezi basálními insulinovými analogy (např. *Glargin*) a rakovinou prsou⁷⁵ a (iii) byla potvrzena souvislost vazby insulinu na IGF-1R, jakožto výsledek hyperinsulinémie u diabetiků, čímž je spuštěna nechtěná proliferace buněk^{54,81}.

V roce 2011 výzkumná skupina firmy Novo Nordisk publikovala první selektivní IR-B analogy^{82,83}. Správný selektivní analog by měl mít danou sníženou selektivitu k IR-A a zvýšenou k IR-B, což znamená zvýšení, nebo alespoň preferenční selektivitu k játrům, jakožto hlavního orgánu zpracovávající insulin. Skupina připravila sérii analogů s modifikacemi v pozicích A8, B25 a B27. Analog (HisA8, AsnB25, GluB27-desThr30)-insulin vykazoval selektivitu $\approx 10\%$ k IR-A a $\approx 60\%$ k IR-B, což vyústilo k čtyřnásobnému zvýšení selektivity vůči IR-B. Na základě krystalografických studií bylo zjištěno, že analog dosáhne své selektivity díky snížení k IR-A, než zvýšení selektivity k IR-B^{54,82,83}.

Minulý rok představila další vědecká skupina Novo Nordisk studii zaměřující se na pozici 718 IR a IGF-1R (u IR-B je zde Lys, u IR-A je zde Pro). Bylo zjištěno, že tato pozice je zodpovědná za nízkou vazebnou afinitu IGF-1 a IGF-2 k IR-B. Tento poznatek může být v budoucnu velice důležitým ukazatelem k návrhu nových selektivních analogů⁸⁴.

Pro návrh selektivních analogů se nejvíce využívá záměn v C-konci řetězce B, protože ten pravděpodobně přímo interaguje s α -CT částí 12 přidaných aminokyselin, který se u IR-A nenachází. Bylo připraveno mnoho analogů se záměnou aminokyselin v této části, zejména v pozicích B24-B27. Ve skupině Dr. Jiráčka z ÚOCHB AV ČR byly

připraveny analogy se zaměněnými aminokyselinami v pozici B26 za *N*-metylované aminokyseliny, nebo D-aminokyseliny, nebo aminokyseliny s karboxyamidací v pozici B26. Výsledkem je série analogů s téměř čtyřnásobně vyšší afinitou k IR, než má lidský insulin. Takto vysokou afinitu má např. analog [NMeAla^{B26}]-DTI-NH₂, u kterého vzniká ohyb mezi pozicemi B24 a B26, který je spojen s odklonem C-konce řetězce B (Obr. 13A). Vzniklý ohyb je stabilizovaný pomocí CO skupiny PheB24 a karboxyamidovou skupinou v NMeAla^{B26}, zároveň otevírá nové možnosti kontaktu aminokyselin řetězce A (A1-A3) pro kontakt s receptorem a vzájemný kontakt aminokyselin TyrA19 a GlnA15, čímž vzniká zvětšená styčná nepolární plocha pro kontakt s receptorem (Obr. 13B, C). Je velice pravděpodobné, že série těchto analogů s β-ohybem velice efektivně napodobují tzv. aktivní formu insulinu, tedy fyziologickou formu insulinu vázající se na receptor. Zároveň je pomocí β-ohybu znemožněna tvorba dimerů, což je základní podmínka pro přechod insulinu do jeho aktivní formy^{58,69,70,85,86}.



Obr. 13 | **A.** Znázornění vysoce aktivního insulinu vytvářejícího B26 ohyb. Červeně je znázorněný lidský insulin, fialově - [NMeAla^{B26}]-DTI-NH₂; žlutě - [NMeTyr^{B26}]-insulin; zeleně - [D-Pro^{B26}]-DTI-NH₂; modře - [NMeHis^{B26}]-DTI-NH₂. **B.** Detailní struktura na B26 ohyb způsobený *N*-metylovými analogy v porovnání s lidským insulinem. Zeleně - [NMeAla^{B26}]-DTI-NH₂; žlutě - [NMeAla^{B26}]-insulin; růžově - [NMeTyr^{B26}]-insulin; W – molekula vody. **C.** Detailní pohled na B26 ohyb zkrácených analogů [NMeAla^{B26}]-DTI-NH₂ a [D-Pro^{B26}]-DTI-NH₂. Mezi kyslíkem CO skupiny PheB24 a dusíkem karboxyamidu *N*-AlaB26 a D-ProB26 vzniká nová vodíková vazba. U D-Pro je vidět konformační změnu způsobenou chiralitou dané aminokyseliny. Upraveno dle cit⁸⁷.

V této vědecké skupině se snaží poslední roky navrhnout analogy, které by napodobily aktivní formu insulinu. Tyto analogy obsahují v C-konci řetězce B cyklickou strukturu, např. dva cysteiny, které pak následnou oxidací vytváří cystinový můstek, čímž

se zafixuje celá část řetězce. Druhou možností je dnes značně využívaná Huisgenova Cu^{I} -katalyzovaná azid-alkynová cykloadice, pro kterou se ustavil název “click chemistry”⁸⁸. Výsledky jasně ukazují, že pokud se zvolí vhodná pozice aminokyselin pro cyklizaci a správná délka raménka, dokáže následná cyklizace zafixovat aktivní formu analogu tak, jak je to u vazby insulinu na IR⁸⁵.

V posledních letech výzkumu insulinových analogů byl výzkum věnován nejen pochopení vazby insulinu na IR, ale zejména syntéze a návrhům nových analogů. Novou generaci insulinových analogů představují právě receptor selektivní IR-A/IR-B analogy, vzniklé zejména záměnou aminokyselin v C-konci řetězce B, čemuž je věnovaná i tato práce.

2. Cíl práce

1. Syntéza a charakterizace insulinových analogů se záměnou v C-konci řetězce B.
2. Určení vazebných afinit připravených analogů insulinu vůči oběma isoformám insulinového receptoru IR-A a IR-B.
3. Studium aktivace a signální odpovědi insulinových analogů vůči oběma isoformám insulinového receptoru IR-A a IR-B

3. Metody

3.1 Použité chemikálie a materiály

2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosforečnan (HBTU)	Novabiochem Merck, Německo
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonová kyselina (HEPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Aceton	Penta, Chrudim, ČR
Acetonitril (ACN)	Fischer Scientific, Leics, UK
Akrylamid	Fluka, Buchs, Švýcarsko
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Bromfenolová modř	Lachema, ČR
Buněčná linie IM-9	ATCC, USA
Buněčná linie R ⁻ /IR-A	darována prof. Belfiorem, Itálie a prof. Basergou, USA
Buněčná linie R ⁻ /IR-B	darována prof. Belfiorem, Itálie a prof. Basergou, USA
D-glukosa	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Diethylether	Penta, Chrudim, ČR
Dichlormethan (DCM)	Penta, Chrudim, ČR
DMEM médium	GBCC, USA
Dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Fetální hovězí sérum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Chlorid Vápenatý CaCl ₂ (příprava DOI)	Lachema, ČR
IGF-1	Tercica, USA
Inhibitory proteas – Protease Inhibitor Coctail (P8340)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Lachema, ČR
Kyselina octová, 99 %	Penta, Chrudim, ČR
L-glutamin	Gibco, USA

mono- ¹²⁵ I-TyrA14-lidsky insulin	Perkin Elmer, Waltham, USA
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin (DIPEA)	IRIS BIOTECH, Německo
<i>N,N</i> -diisopropylkarbodiimid (DIC)	Novabiochem Merck
<i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF)	Fischer Scientific, Leics, UK
<i>N</i> -Fmoc-chráněné aminokyseliny	Novabiochem Merck, Německo
<i>N</i> -hydroxybenzotriazol (HOBt)	Novabiochem Merck, Německo
<i>N</i> -methylmorfolin	Novabiochem Merck, Německo
Octan vápenatý (CaAc ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Penicilin amidohydrolasa	Fluka, Buchs, Švýcarsko
Piperidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Pryskyřice Sieber Amide	Novabiochem Merck, Německo
Puromycin	Gibco, USA
PVDF membrány	Novabiochem Merck, Německo
Sephadex G-50	Pharmacia, Švédsko
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
<i>TPCK</i> -trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Trifluoroctová kyselina (TFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Triisopropylsilan (TIS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Tris/HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Tween detergent	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Zinc-free insulin (Insulin zbavený zinku)	Skupina Dr. Jiráčka, ÚOCHB AV ČR

Ostatní běžně používané chemikálie byly zakoupeny ve firmě Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo. Destilovaná voda byla vyrobena přímo na ÚOCHB AV ČR.

Tab. 1 | Seznam použitých protilátek pro detekci proteinů.

Detekovaný protein	Název protilátky	Původ	Ředění	Dodavatel
Primární protilátka detekující fosforylovaný protein				
pTyr 1135/1136 IGF-1R pTyr 1162/1163 IR	Phospho-IGF-1 Receptor β (pTyr 1135/1136) Insulin Receptor β (1150/1151) (19H7) Rabbit mAb	Králík	1 : 1000	<i>Cell Signalling Technology, USA</i>
pAkt	Phospho-Akt (Thr308) (C31ESE), Rabbit mAb	Králík	1 : 1 000	<i>Cell Signalling Technology, USA</i>
Primární protilátka detekující celkový obsah proteinu (kontrolní protilátka)				
Aktin	Anti-Actin (20-33), IgG Fraction of antiserum	Králík	1 : 2000	<i>Sigma-Aldrich, Německo</i>
Sekundární protilátka				
Protilátka rozpoznávající primární protilátku myšího původu	Anti-Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in rabbit	Králík	1 : 20 000	<i>Sigma-Aldrich, Německo</i>
Protilátka rozpoznávající primární protilátku králíčího původu	Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase antibody produced in goat	Koza	1 : 80 000	<i>Sigma-Aldrich, Německo</i>

3.2 Použité přístroje

CCD kamera	ChemiDoc MP Imaging Systém, BIO-RAD, USA
Duální UV/VIS detektor pro RP-HPLC	Waters 2487; Waters, USA
FlowBox	Spetec GmbH, Erding, Německo
Lyofilizační přístroj	Heto FD3, Dánsko
Malá centrifuga	MiniSpin [®] , Eppendorf, Německo
Mikroskop	Axiovert 40 CFL, Zeiss, Německo.
pH metr	827 pHLab, Metrohm, Švýcarsko
RP-HPLC	Waters 600 Collector; Waters, USA
Sběrač frakcí	Waters Fraction Collectos; Waters, USA
Spektrofotometr Lambda 25	Perkin-Elmer, USA
Spyder Mark II	funkční prototyp, ÚOCHB AV ČR
Termostat	Memmert, Německo
Ultrazvukový homogenizátor	Elmasonic S30, Elma, Německo
Velká centrifuga	Jouan CR3i, Francie
Vrtidlo	VELP Scientifica, Itálie
Zařízení pro imunopřenos	Trans Blot SD Cell, BIO-RAD, USA
Zdroj použitý při elektroforéze a imunopřenosu	POWER-Pac 1000, BIO-RAD, USA
γ -counter (Wizard 1470 Automatic γ -Counter)	Perkin-Elmer, USA

3.3 Příprava des[B23-B30]oktapeptidu insulinu (DOI)

Bylo vzato 270 mg vepřového insulinu zbaveného zinku, který byl rozpuštěn v 100 ml 0,05M Tris/HCl pufru o pH 9,1 (9,0-9,2). Bylo rozpuštěno 7 mg TPCK-trypsinu (E.C.3.4.21.4) v 2,5 ml 0,1M CaCl₂ a přidáno k roztoku insulinu. Reakce byla ponechána při 6 °C po dobu 20 hod. Po uplynutí 20 hod bylo přidáno dalších 4 mg trypsinu, a ponecháno dalších 20 hod při 6 °C.

Po uplynutí celkové doby asi 40 hod byla pH hodnota roztoku upravena 1M HCl na hodnotu 5,4 (hodnota isoelektrického bodu insulinu). Reakční směs byla centrifugována po dobu 20 min při 2000 × g. Supernatant byl oddělen a sediment obsahující des[B23-B30]oktapeptid insulin (DOI) byl rozpuštěn v 10% kyselině octové a zlyofylizován.

3.3.1 Izolace a čištění DOI gelovou chromatografií

Na separaci byla použita kolona Sephadex G50 (rozměry 100 × 7 cm) a separace probíhala při teplotě 6 °C. Jako mobilní fáze byla použita 10% kyselina octová. Jako průtoková pumpa byla použita pumpa značky miniPuls 3 firmy Gilson a pro sběr frakcí byl použit automatický kolektor firmy Waters. Frakce byly sbírány v objemech 10 ml.

U všech frakcí byly měřeny absorbance při vlnové délce 280 nm nebo 276 nm spektrofotometrem Lambda 25. Frakce obsahující DOI byly spojeny a zlyofilizovány.

3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC)

Purifikace peptidů, kontrola vzniku produktů, semipreparace a kontrola čistoty látek byla prováděna pomocí RP-HPLC od firmy Waters. Pro analytická stanovení byla použita analytická kolona firmy Macherey-Nagel (Nucleosil 120-5 C18, 250 x 4 mm, průtok 1 ml/min), pro purifikaci produktů enzymatických semisyntéz byla použita semipreparativní kolona firmy Macherey-Nagel (Nucleosil 120-5 C18, 250 x 8 mm, průtok 3 ml/min) a pro purifikace peptidů byla použita kolona firmy Macherey-Nagel (Nucleosil 120-5 C18, 250 x 21 mm, průtok 9 ml/min).

Pro preparaci peptidů byl použit gradient uvedený v tabulce 2, pro purifikaci produktů semisyntéz byl použit gradient v tabulce 3 a pro analytickou kontrolu průběhu reakce a čistoty látek byl použit gradient v tabulce 4. Jako složky gradientu byly použity roztoky A (0,1 % (v/v) TFA ve vodě) a B (80 % ACN (v/v) s 0,1 % TFA ve vodě).

Tab. 2 | Gradient pro čištění peptidů na preparativním provedení RP-HPLC, použita byla preparativní kolona firmy Macherey-Nagel (Nucleosil 120-5 C18, 250 x 21 mm, průtok 9 ml/min). Absorbance byla měřena při 218 nm a 258 nm.

		Gradient		
Čas [min]		0	30	31
Koncentrace B [%], (v/v)		10	100	10

Tab. 3 | Gradient pro čištění peptidů na semipreparativním RP-HPLC, použita byla semipreparativní kolona firmy Macherey-Nagel (Nucleosil 120-5 C18, 250 x 8 mm, průtok 3 ml/min). Absorbance byla měřena při 218 nm a 258 nm.

		Gradient						
Čas [min]		0	1	21	34	36	37	37,1
Koncentrace B [%], (v/v)		10	35	45	55	90	90	10

Tab. 4 | Gradient pro čištění peptidů na analytickém RP-HPLC, použita byla analytická kolona firmy Macherey-Nagel (Nucleosil 120-5 C18, 250 x 4 mm, průtok 1 ml/min). Absorbance byla měřena při 218 nm a 258 nm.

		Gradient						
Čas [min]		0	1	21	34	36	37	37,1
Koncentrace B [%], (v/v)		10	35	45	55	90	90	10

3.5 Syntéza lineárních peptidů na pevné fázi

Syntéza peptidů byla prováděna syntézou na pevné fázi (SPPS) podle Merrifielda⁸⁹. Syntéza byla prováděna na automatickém syntetizátoru Spyder Mark II. Celkové syntetizované množství bylo 200 μmol , samotná syntéza probíhala v plastové stříkačce s fritou. Jako polymerní nosič byla použita Sieber amidová pryskyřice.

Pro syntézu byly použité aminokyseliny s α -aminoskupinami s 9-fluorenylmethyl-oxycarbonylovou (Fmoc) chránicí skupinou odštěpující se v bazickém prostředí. Pro chránění postranních skupin aminokyselin byly použity *tert*-butylová skupina (*t*Bu) chránící hydroxylovou skupinu threoninu a fenylacetylová skupina (Pac) chránící ϵ -aminoskupinu lysinu.

Každý kondenzační cyklus (coupling) byl opakován celkem dvakrát. Každý cyklus trval celkem 2 hodiny, v každém cyklu byl přidán celkem 10-ti násobek *N*-chráněné

aminokyseliny, která byla rozpuštěna v ekvimolárním množství N-hydroxybenzotriazolu (6 % HOBt (w/v), roztok HOBt byl připraven rozpuštěním 3,82 g pevného HOBt v 62,4 ml dimethylformamidu (DMF)). Jako kondenzační činidla byly mimo HOBt použity roztoky 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosforečnan (HBTU), *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA), *N,N*-diisopropylkarbodiimid (DIC) a piperidin. HBTU bylo připraveno rozpuštěním 4,58 g v 24,2 ml DMF (20%, (w/v)), roztok DIPEA byl připraven smícháním 4,21 ml DIPEA s DMF v celkovém objemu 24,2 ml (17%, (v/v)), roztok DIC byl připraven smícháním 1,89 ml DIC s DMF v celkovém objemu 24,2 ml (8%, (v/v)) a roztok 20% piperidinu byl připraven smícháním 12 ml piperidinu s DMF do celkového objemu 60 ml. Jako promývací roztok byl po dobu syntézy použit DMF.

Štěpení peptidu ze Sieber amidové pryskyřice probíhalo v 5 ml štěpící směsi (TFA:deionizovaná voda:TIS v poměru 98:1:1 (v/v/v)) za stálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin.

Produkt byl po 2 hodinách přefiltrován do studeného diethyletheru, sraženina byla centrifugovaná (6 500 × g, 10 min). Supernatant byl odlit a sražený produkt byl následně promyt v dalších 50 ml chlazeného diethyletheru a centrifugován 10 min při 6 500 × g. Sražený peptid byl zlyofylizován.

3.6 Enzymatická semisyntéza

Enzymatická semisyntéza byla provedena rozpuštěním des[B23-B30]oktapeptidu insulinu (DOI) (30 mM) ve směsi 55% (v/v) DMF a 50mM (m/V) octanu vápenatého. Ke směsi byl přidán peptid (150 mM) a TPCK-trypsin rozpuštěný v 50 μl 50mM (m/V) octanu vápenatém. Množství TPCK-trypsinu bylo voleno tak, aby poměr TPCK-trypsin/DOI (enzym/substrát) byl v poměru 1/50. Celkový objem reakční směsi byl 200 μl.

N-methylmorpholinem (3-9 μl) bylo upraveno pH na hodnotu v rozmezí 6,9-7,1. Reakce probíhala při laboratorní teplotě, nebo při teplotě 37 °C, a to v časovém rozmezí 5-24 hod. Průběh reakce byl po celou dobu monitorován analytickým provedením RP-HPLC. Celá reakce byla následně zastavena přidáním 1 ml acetonu, který způsobil vysrážení peptidových produktů. Směs byla následně centrifugovaná 10 min při 12 000 × g. Vysušený sediment byl rozpuštěn v 10% kyselině octové a produkt i výchozí látky byly vyčištěny semipreparativním provedením RP-HPLC. Byla sledována absorbance při vlnové délce 218 nm a 258 nm. Identifikace hmotnosti produktu probíhala

hmotnostní spektrometrií a čistota vzorku byla zkontrolována analytickým provedením RP-HPLC.

3.7 Enzymatické odstranění fenylacetylové skupiny

Odstranění fenylacetylové skupiny chránící ε -aminoskupiny lysinu probíhalo působením enzymu penicilin G acyláza (penicilin amidohydrolasa (PA) izolovaná z *Escherichia coli*). Deprotekce probíhala rozpuštěním celého množství vzorku získaného z enzymatické semisyntézy v 1,5 ml K-fosfátového pufru (150 mM, pH 7,5) a následným přidáním 5 μ l PA. Průběh vzniku ochráněného produktu byl sledován v pravidelných časových intervalech analytickým provedením RP-HPLC. Podle potřeby bylo ještě přidáno 1-5 μ l PA nebo se upravila teplota a reakční směs probíhala ve 37 °C po dobu 6-48 hod. Purifikace vzniklého produktu probíhala použitím semipreparativní kolony na RP-HPLC. Produkt byl identifikován hmotnostní spektrometrií a čistota byla zkontrolována analytickým provedením RP-HPLC.

3.8 Hmotnostní spektroskopie

Hmotnostní spektra peptidů, produktu semisyntéz a konečných produktů ve formě insulinových analogů byly měřeny v Laboratoři hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR pomocí přístroje LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Německo, USA) metodou ESI v pozitivním iontovém módu.

3.9 Vazebné testy *in vitro*

Princip vazebných testů spočívá v kompetici analogu a lidského insulinu značeného isotopem 125 I navázaného na zbytku tyrosinu v pozici A14 o vazebné místo na insulinovém receptoru.

3.9.1 Příprava roztoků analogů pro vazební testy

Zásobní roztoky insulinových analogů byly rozpuštěny v 0,1% kyselině octové o koncentraci 100 μ g/ml. Poté byly určeny přesné koncentrace látek spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Extinkční koeficient pro jednotlivé analogy se počítal dle vzorce: $\varepsilon_{280} = 1280 \cdot x\text{Tyr} + 120 \cdot x\text{Cys}$.

Roztoky ligandů (analogů i insulinu) byly před použitím ředěny na koncentrace v rozmezí 10^{-6} M- 10^{-11} M HBB puftrem (z angl. HEPES binding buffer) o složení 100mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM KCl, 1,3mM MgSO₄, 1mM EDTA, 10mM glukosa, 15mM

octan sodný a 1 % (w/v) hovězí sérový albumin (BSA). pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,6.

3.9.2 Příprava buněk pro testování vazebné afinity k IR-A

Ke stanovení vazebné afinity insulinových analogů k receptorům IR-A byla použita buněčná linie lidských lymfocytů IM-9 exprimujících výhradně tyto receptory. Buňky byly kultivovány v médiu RPMI-1640 obsahujícím 100 IU/ml penicilinu, 100 µg streptomycinu, 10 % FBS a 2mM L-glutamin. Buňky byly pěstovány při teplotě 37 °C v prostředí 5% CO₂, třikrát týdně pasážovány. Vypěstované buňky byly následně spočítány v Bürkerově komůrce a ředěny HBB pufrem na výslednou koncentraci 2 miliony buněk/ml.

3.9.3 Stanovení vazebné afinity insulinových analogů k IR-A

Testování probíhalo za vždy stejného množství buněk a ¹²⁵I-HI, zvyšovala se jen koncentrace testovaného ligandu.

Do každé zkumavky bylo přidáno 400 µl buněk o koncentraci 2 miliony buněk/ml, konstantní množství ¹²⁵I-HI, a stále se zvyšující koncentrace daného analogu. Kompetice probíhala při teplotě 15 °C po dobu 2,5 hod a každých 30 min byly zkumavky promíchány. Celkový objem reakční směsi byl 500 µl. Po uplynutí 2,5 hod byla reakční směs rozdělena do 2 centrifugačních zkumavek (vytvoření duplikátů), kde bylo napipetováno 200 µl HBB pufru (kap. 3.9.1). Poté byly zkumavky centrifugovány při 13 600 × g po dobu 10 min, při teplotě 4 °C, čímž byla reakce ukončena.

Po centrifugaci byl supernatant odsát a zbytková radioaktivita v peletě byla měřena přístrojem γ -counter. Doba měření jednoho vzorku byla 5 min. Vazebná křivka jednoho analogu byla měřena vždy třikrát. Hodnoty disociační konstanty (K_d) byly získány použitím modelu vazby do jednoho vazebného místa (z angl. „one site fitting model“) metodou nelineární regrese za současného zohlednění deplece ligandu v programu GraphPad Prism 5.0.

3.9.4 Příprava buněk pro testování vazebné afinity k IR-B

Pro testování vazebných afinit byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů s blokovanou expresí genů pro myši IGF-1R a transfekovaná lidským IR-B (R⁻/IR-B).

Buňky byly kultivovány při teplotě 37 °C v prostředí obsahující 5 % CO₂ a v médiu DMEM, který obsahoval 10% FBS, 25mM glukosu, 100 mU/ml penicilinu, 3 µg/ml puromycinu, 100 µg/ml streptomycinu a 2mM L-glutamin. Buňky byly pasážovány třikrát týdně. Den před samotným testováním byly buňky nasazeny do 24-jamkových destiček, o koncentraci 12 000 buněk na jamku.

3.9.5 Testování vazebné afinity insulinových analogů k IR-B

Aby nedošlo k ovlivnění měření, 6 hod před samotným testováním byly buňky ponechány v médiu bez séra. Následně byly buňky dvakrát omyty vazebným pufrům HBB (kap. 3.9.1). Testování probíhalo v jednotlivých jamkách v duplikátech a směs vždy obsahovala pufr, konstantní koncentraci ¹²⁵I-HI a zvyšující se koncentrace insulinového analogu v rozmezí 10⁻⁶M-10⁻¹¹M. Celkový objem reakční směsi byl 250 µl. Destička se inkubovala 16 hodin při teplotě 6 °C za stálého míchání. Po uplynutí inkubační doby byly jamky 3x promyty fyziologickým roztokem, aby došlo k odstranění nenavázaného ¹²⁵I-HI a buňky byly solubilizovány 200 µl 0,1M NaOH, čímž byla reakce ukončena. Obsah jamek byl kvantitativně přenesen do zkumavek a u těchto zkumavek byla pak měřena zbytková radioaktivita γ -countrem. Čas měření každé zkumavky byla 1 minuta.

Vazebná křivka jednoho analogu byla měřena vždy třikrát. Hodnoty disociační konstanty (K_d) byly získány použitím modelu vazby do jednoho vazebného místa (z angl. „one site fitting model“) metodou nelineární regrese za současného zohlednění deplece ligandu v programu GraphPad Prism 5.0.

3.10 Metodika studia signalizace IR analogy a studium signálních odpovědí

3.10.1 Příprava buněk pro testování aktivace IR-A, IR-B a následných signálních odpovědí

Pro studium aktivace byly použity myší embryonální fibroblasty s vyřazeným IGF-1 genem a vloženými lidskými geny pro IR-A (buněčná linie R⁻/IR-A), IR-B (R⁻/IR-B). Následně probíhala kultivace těchto fibroblastů v DMEM médiu obsahujícím 10% FBS, penicilin a streptomycin o koncentraci 100 IU/ml, puromycin (0,3 µg/ml) a L-glutamin (0,2 mol/l). Inkubace probíhala v termostatu s konstantní teplotou 37 °C a 5% přístupem CO₂. Každá buněčná linie byla nasazena na 24-jamkové destičky o počtu 40 000 buněk na jamku. Po inkubaci trvající celou noc bylo následující ráno odebráno médium obsahující FBS a vyměněno za médium neobsahující FBS. Pro vytracení jakéhokoliv signálu byly buňky ponechány ještě 4 hodiny v inkubátoru a až poté byly stimulovány. Experiment byl opakován celkem čtyřikrát, tedy byly vytvořeny čtyři testovací várky u každé buněčné linie.

3.10.2 Příprava roztoků ligandů pro stimulaci receptorů buněk

Příprava zásobních roztoků analogu probíhala stejně, jako příprava ligandů na vazebné testy. Byly použité stejné extinkční koeficienty a měřena absorbance při vlnové délce 280 nm. Analogy, HI a IGF-1 byly naředěny na koncentraci 10⁻⁸M (10 nM).

3.10.3 Stimulace IR-A a IR-B jednotlivými analogy

Připravené roztoky ligandů o daných koncentracích byly vždy pipetovány v pravidelných časových intervalech do jednotlivých jamek destičky. Pro každou buněčnou linii probíhala stimulace 10 min. Následně byla stimulace zastavena (vakuovým) odsátím média, vypláchnutím destičky pomocí fyziologického roztoku (0,9% NaCl) a politím kapalným dusíkem. Destičky byly následně uloženy do mrazicího boxu o teplotě -80 °C.

3.10.4 Příprava lyzátů buněk pro SDS-elektroforetickou separaci

Vzorkový pufr pro polyakrylamidovou elektroforézu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (tzv. SDS-PAGE), který byl použit pro lýzi buněk, byl obohacen o inhibitory proteas. Skládal se z 62,5nM TRIS/HCl pH 6,8; 2% SDS (w/v); 10% glycerolu (v/v); 0,01% bromfenolové modři (w/v); 0,1M DTT (w/v), 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄; 0,5 % inhibitorů proteas. Po přidání 50 µl do každé jamky byla destička sonifikována po dobu

1 min, čímž byly buňky lyzovány. Buněčné lyzáty byly kvantitativně přeneseny do mikrozkušavek a uchovávaný při -20 °C. Pro SDS-PAGE bylo odebráno 10 µl vzorku, který byl zahřát po dobu 1 min při 100 °C.

3.10.5 Polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů z buněčných lyzátů v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

Separace proteinů z buněčného lyzátu pomocí SDS-PAGE byla provedena standardním způsobem, a to v prostředí polyakrylamidového gelu (10%) a dodecylsírany sodného (SDS). Objem nanášeného vzorku byl 10 µl. Separace proběhla v 0,025M Tris/0,192M glycinovém elektroodovém pufru s obsahem 0,01% (w/v) SDS. Limit elektrického proudu byla nastavena 24 mA. Počáteční napětí elektroforézy bylo 100 V, po 10 min bylo napětí zvýšeno na hodnotu 200 V, přičemž úplná elektroforetická separace trvala přibližně 1 hod.

3.10.6 Přenos elektroforeticky separovaných proteinů z gelu na membránu

Po dokončení elektroforetické separace byly proteiny přeneseny na PVDF membránu pomocí techniky přenosu. Na začátku byly gely ponechány 30 min v přenosovém pufru obsahující 0,1% SDS (w/v), 20mM Tris, 189mM glycin, 10% methanol (v/v). PVDF membrány byly aktivovány pomocí methanolu, opláchnuté destilovanou vodou a vloženy do přenosového pufru po dobu 30 min. Filtrační papíry pro přenos byly také nasáknuté přenosovým pufrem.

Poté byl sestaven tzv. přenosový sendvič. Přenos probíhal přibližně 90 min v přístroji pro polosuchý přenos za konstantního napětí 12 V. Limitní difuzní proud byl nastaven na 1,5 mA/cm².

3.10.7 Detekce proteinů pomocí protilátek

Po dokončení přenosu byly membrány obsahující proteiny reverzibilně obarveny pomocí roztoku Ponceau S o 0,1% (v/v) koncentraci a podélně rozstříženy v oblasti mezi molekulovými hmotnostmi 75 kDa a 50 kDa. Proteiny o hmotnosti větší než 75 kDa sloužily k detekci receptorů, proteiny se střední hmotnosti 50 kDa-75 kDa k detekci Akt proteinů a proteiny s hmotností menší než 50 kDa sloužily ke kontrole množství nanášky vzorků. Části membrány byly ponechány v 5 % BSA v T-TBS (0,1% Tween-20 (v/v), 20mM Tris/HCl pH 7,5; 140mM NaCl) po dobu 1 hod při laboratorní teplotě za stálého míchání.

Membrány byly třikrát opláchnuty po dobu 5 min pomocí T-TBS pufru a následně byly inkubovány s primární protilátkou přes noc při teplotě 5 °C. Byly použity protilátky detekující fosforylovaný receptor a protein Akt, protilátka detekující celkový obsah aktinu. Primární protilátky byly ředěny v 5% BSA v T-TBS pufru a jsou uvedeny v Tab. 1.

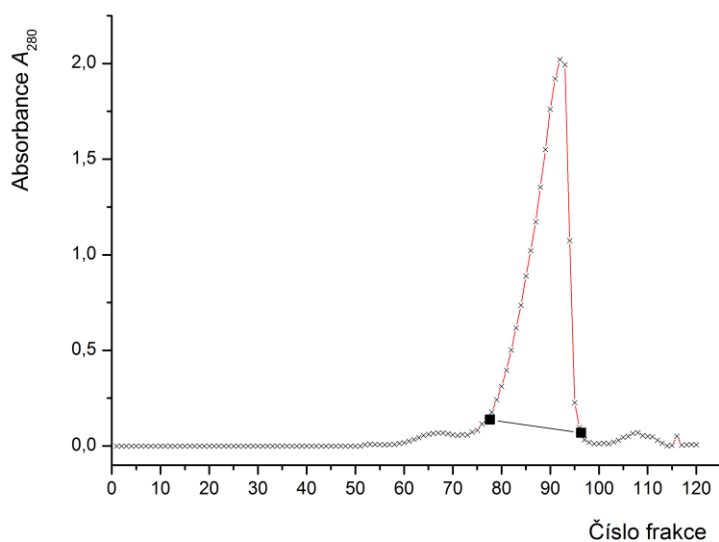
Pro detekci intenzity vyvolaného signálu byl použit chemiluminiscenční substrát, který byl inkubován s membránou po dobu 3 min. Pro detekci chemiluminiscence byla použita CCD kamera *ChemiDoc MP Imaging System*, k měření kvantifikace signálu bylo využito programu *Image-LabTM*. Jako kontrolní vzorek, ke kterému byly hodnoty intenzit proužku vztaženy, byl použit lidský insulin o koncentraci 10 mM (pro IR). Proto byla hodnota relativní stimulace nastavená jako 1 (tedy 100 %). Všechna data byla zpracována pomocí programu GraphPad Prism 7.04. Experiment byl opakován celkem čtyřikrát

4. Výsledky

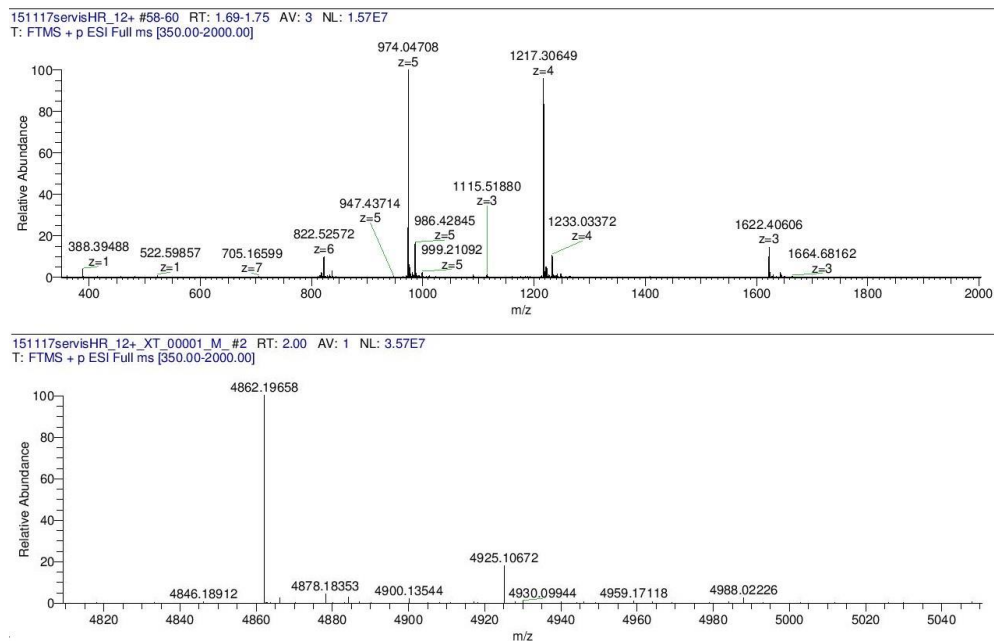
4.1 Příprava des[B23-B30]oktapeptidu insulinu (DOI)

4.1.1 Izolace a čištění DOI gelovou chromatografií

Ze sedimentu byl des[B23-B30]oktapeptid insulinu separován pomocí gelové chromatografie za použití kolony Sephadex G-50 (rozměry 100 × 7 cm), pumpy miniPuls 3 firmy Gilson a automatického kolektoru firmy Waters. Eluce probíhala za přítomnosti 10% kyseliny octové. Absorbance byla měřena spektrofotometrem při vlnové délce 280 nebo 276 nm. Výtěžek des[B23-B30]oktapeptidu insulinu byl 65 %.



Obr. 14 | Měření absorbance jednotlivých frakcí po gelové chromatografii. Frakce obsahující DOI jsou vyznačeny červeně. Tyto frakce byly spojeny a zlyofilizovány. Vyhodnocení dat probíhalo v programu OriginPro[®].



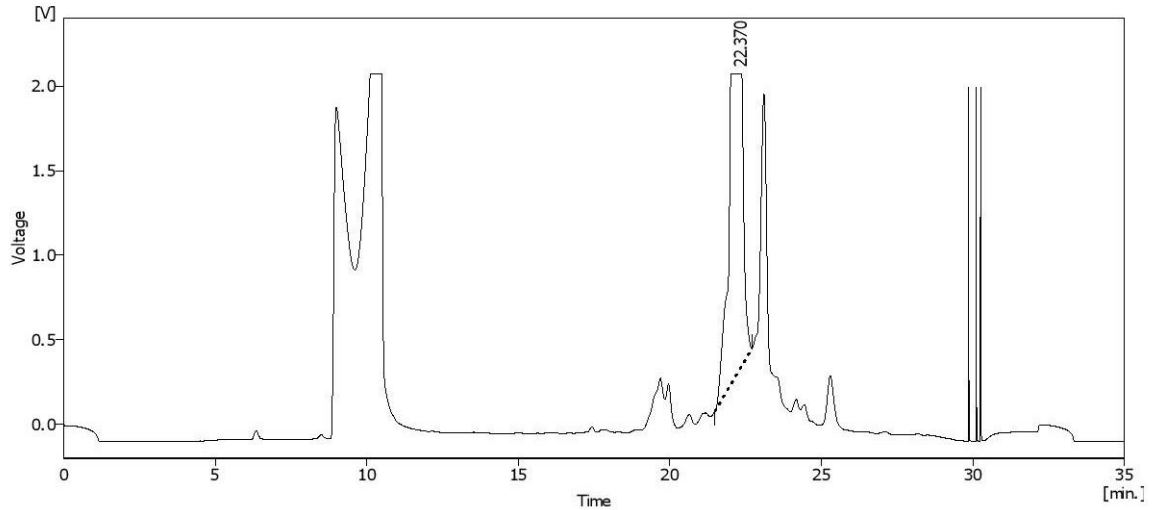
Obr. 15 | Hmotnostní spektrum des[B23-B30]oktapeptidu insulinu (DOI). Teoretická hmotnost DOI je 4862,178. Experimentálně zjištěná hmotnost je 4862,196.

4.2 Syntéza lineárních peptidů na pevné fázi

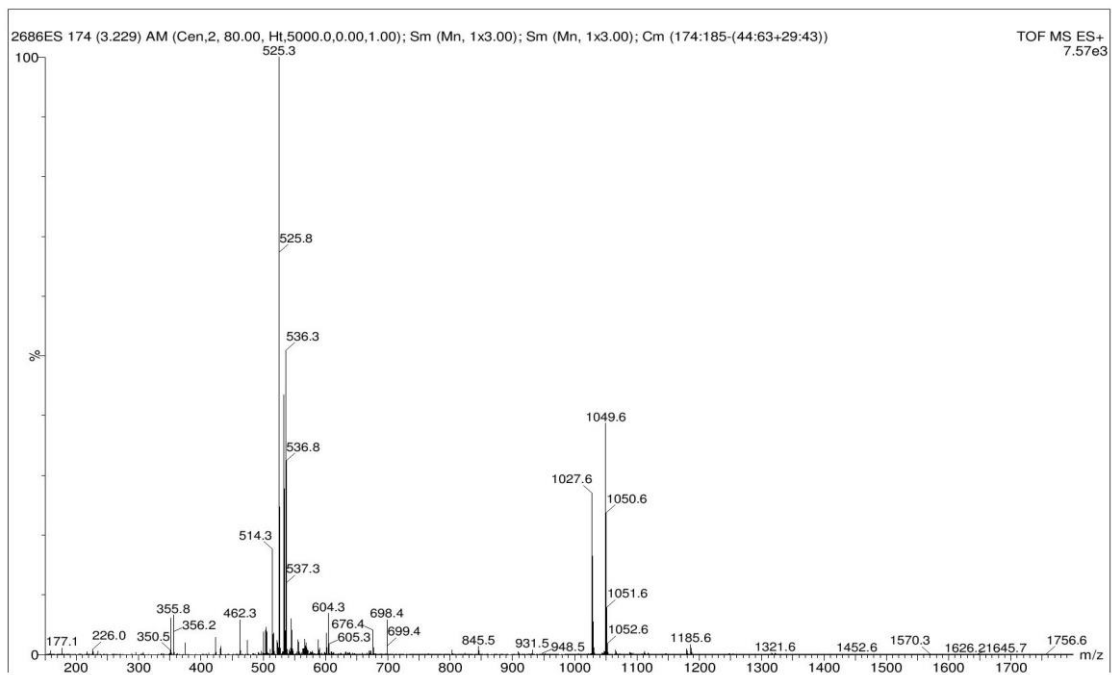
Byly připraveny 4 peptidy se zaměněnými aminokyselinami v pozicích B26-B30 a C-koncovou karboxamidací (Tab. 5). Všechny peptidy byly izolovány RP-HPLC preparativní kolonou Nucleosil C18. Čistota produktů byla kontrolována analytickým RP-HPLC s kolonou Nucleosil C18. Čistota všech peptidů přesahovala 90 %. Jejich hmotnost byla určena hmotnostními spektrometrií v ESI pozitivním iontovém módu.

Tab. 5 | Seznam syntetizovaných peptidů na přístroji Spyder Mark II, jejich výtěžky a charakterizace hmotnostní spektrometrií.

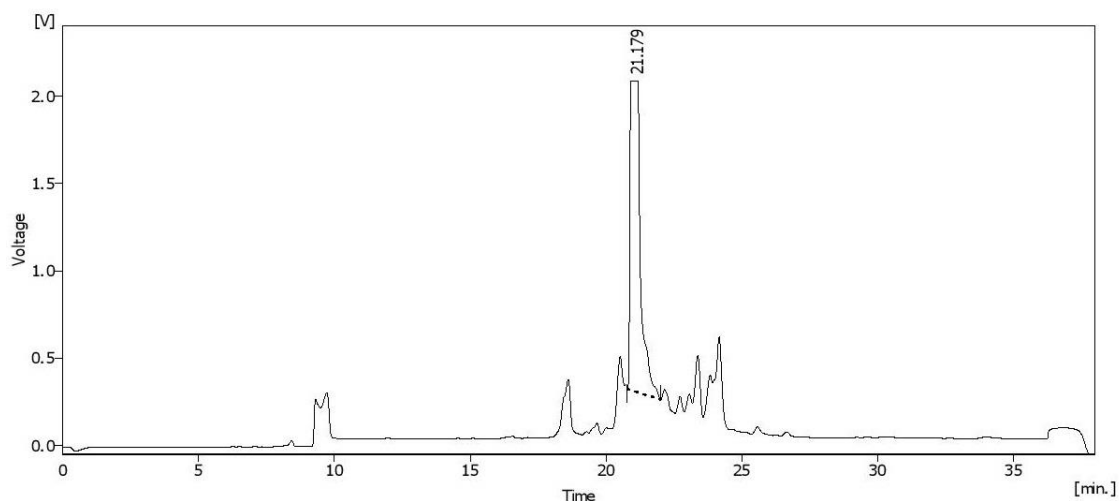
Peptid (Pac)	$[MH^+]_{\text{teor}}$	$[MH^+]_{\text{exp}}$	Výtěžek [%]
1. GFFHypTPK(Pac)T-NH ₂	1027,17	1027,60	81,5
2. GFFHypTHypK(Pac)T-NH ₂	1043,17	1043,50	79,35
3. GFFYPK(Pac)TG-NH ₂	1033,18	1033,60	60
4. GFFYPK(Pac)TGG-NH ₂	1089,53	1090,53	20



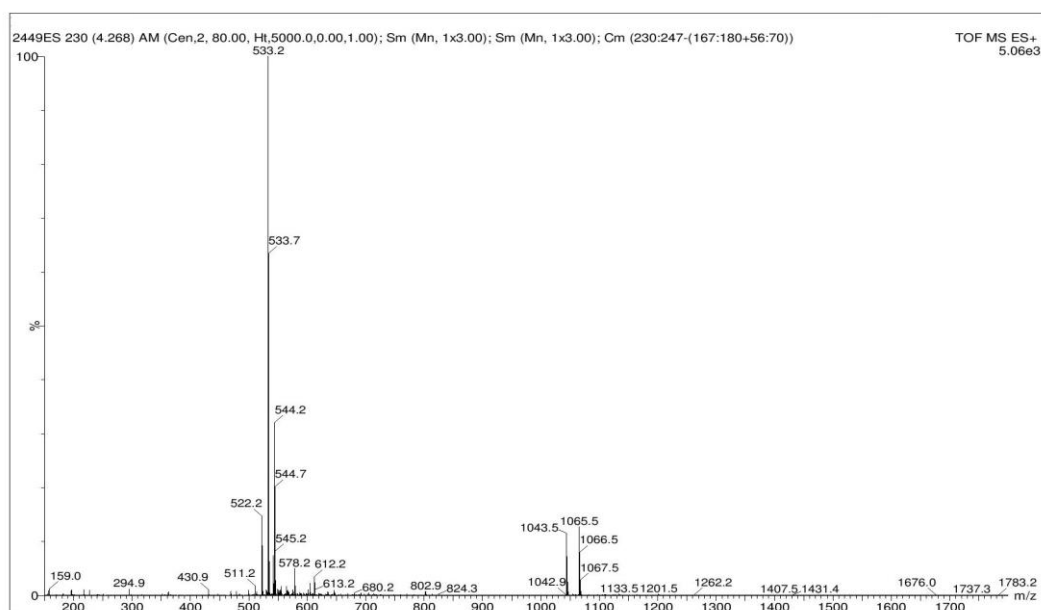
Obr. 16 | Preparativní RP-HPLC peptidu 1 (GFFHypTPK(Pac)T-NH₂). Peptid 1 byl eluován v čase 22,370 min. Absorbance byla měřena při vlnové délce 218 nm.



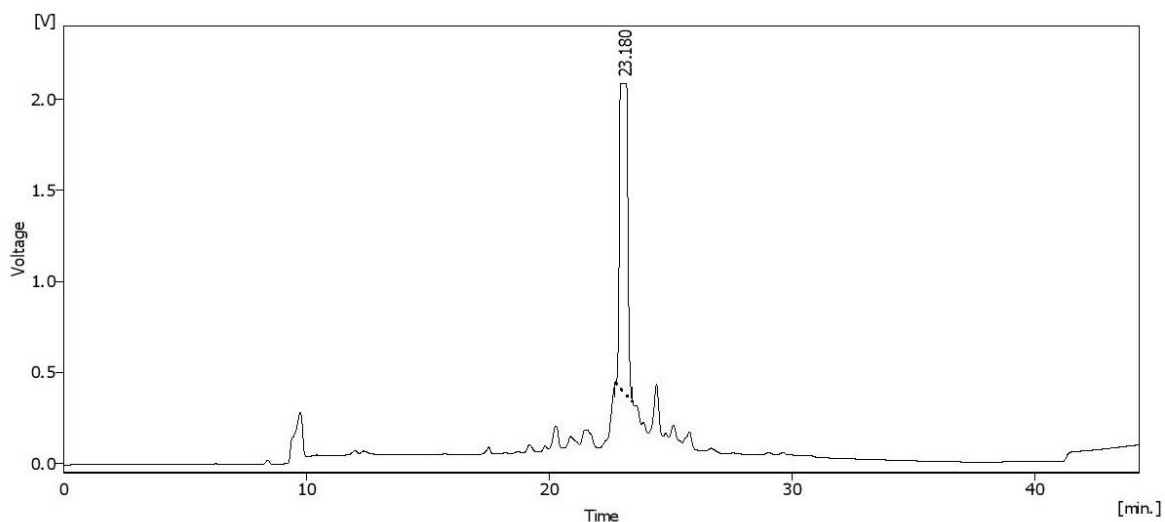
Obr. 17 | Hmotnostní spektrum peptidu 1 (GFFHypTPK(Pac)T-NH₂). Teoretická molekulová hmotnost je 1027,17. Naměřená hmotnost je 1027,60. Hmotnost 1049,6 odpovídá peptidu 1 s jedním atomem sodíku.



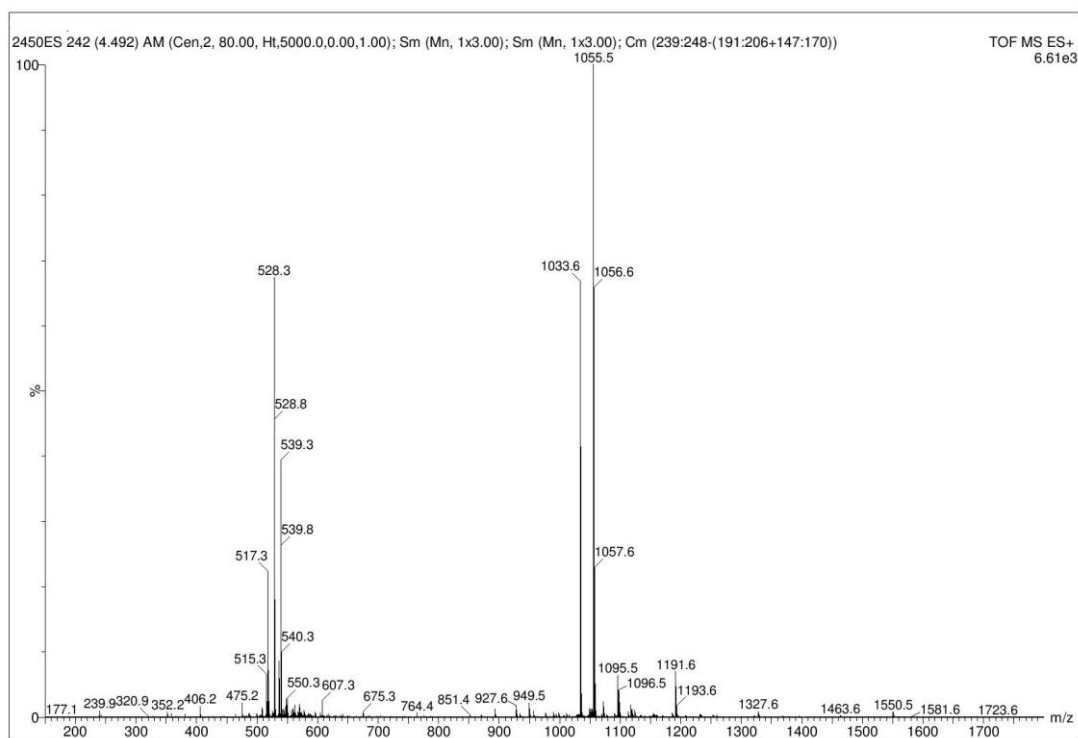
Obr. 18 | Chromatogram zachycující eluci peptidu 2 (GFFHypTHypK(Pac)T-NH₂) v čase 21,179 min. Byla měřena absorbance při vlnové délce 218 nm.



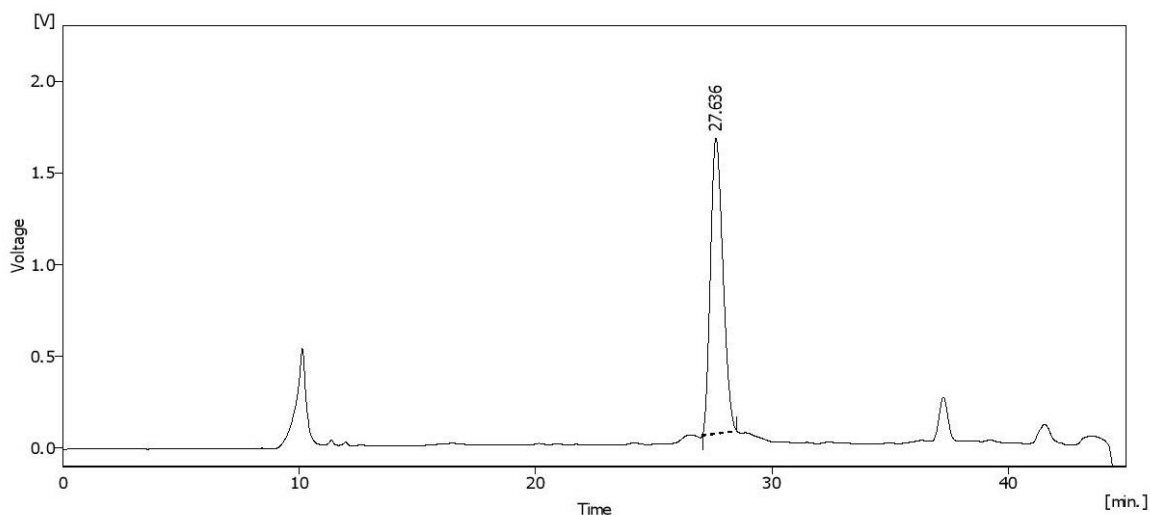
Obr. 19 | Hmotnostní spektrum peptidu 2 (GFFHypTHypK(Pac)T-NH₂). Teoretická hmotnost je 1043,17. Naměřená hmotnost peptidu je 1043,50. Signál o hmotnosti 1065,50 odpovídá peptidu 2 s jedním atomem sodíku.



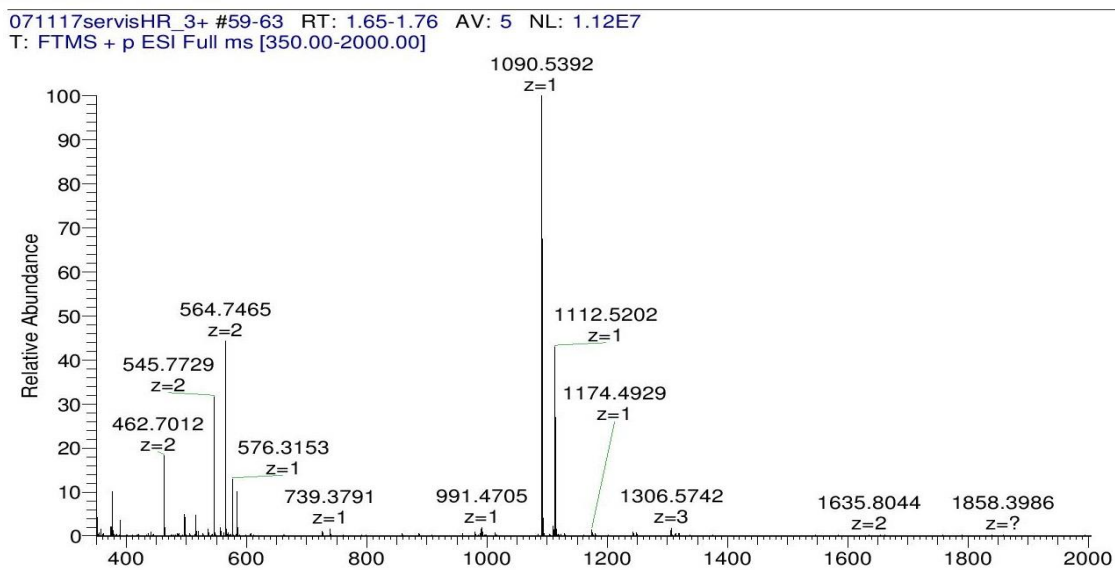
Obr. 20 | Preparace peptidu 3 (GFFYPK(Pac)TG-NH₂) preparativním RP-HPLC. Eluce probíhala v čase 23,046 min při měření absorbance při vlnové délce 218 nm.



Obr. 21 | Hmotnostní spektrum peptidu 3 (GFFYPK(Pac)TG-NH₂). Teoretická relativní hmotnost peptidu je 1033,18, experimentální hmotnost je 1033,60. Pík o hmotnosti 1055,5 odpovídá peptidu 3 s jedním atomem sodíku.



Obr. 22 | Chromatogram zachycující eluci peptidu 4 (GFFYPK(Pac)TGG-NH₂) v čase 27,636 min. Byla měřená absorbance při vlnové délce 218 nm.



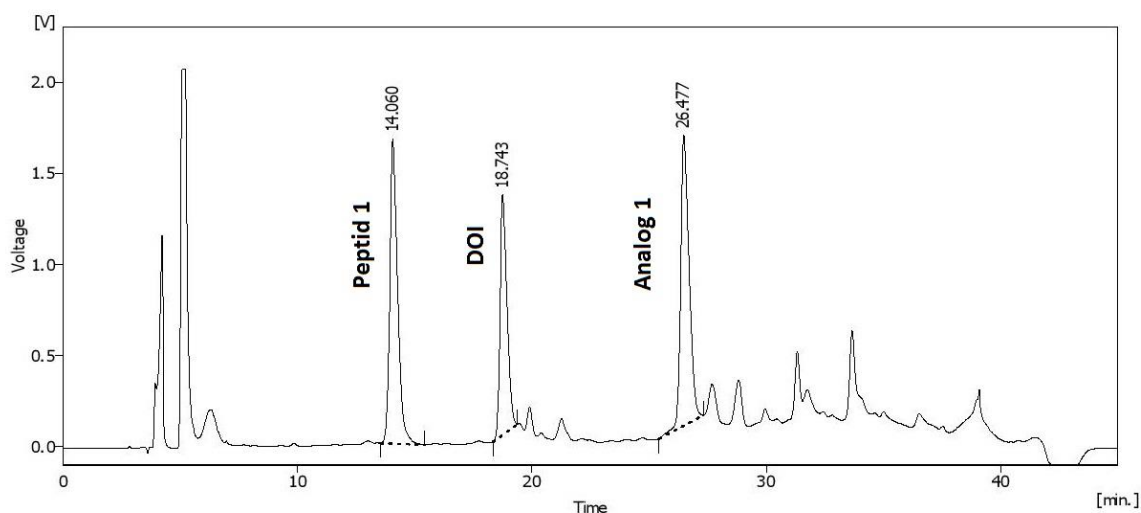
Obr. 23 | Hmotnostní spektrum peptidu 4 (GFFYPK(Pac)TGG-NH₂). Teoretická relativní molekulová hmotnost je 1089,53. Pík o hmotnosti 1090,53 odpovídá peptidu 4 s atomem vodíku.

4.2 Enzymatická semisyntéza

Enzymatická semisyntéza probíhala za katalýzy TPCK-trypsinu v prostředí 55% DMF a pH optima trypsinu tak, jak je popsáno v kapitole 3.6. Jednotlivé semisyntézy probíhali 5-30 hod, při laboratorní teplotě, nebo při teplotě 37 °C. Průběh reakce byl monitorován analytickým RP-HPLC za použití kolony Nucleosil C18. Separace produktu, DOI a peptidu byla provedena semipreparativním RP-HPLC s kolonou Nucleosil C18. Výsledný produkt byl z reakční směsi izolován a zlyofylizován. Hmotnost produktu byla určena hmotnostní spektrometrií v ESI pozitivním iontovém módu. Výtěžky jsou vztaženy vzhledem k DOI. Výsledky semisyntéz jsou uvedeny v Tab. 6.

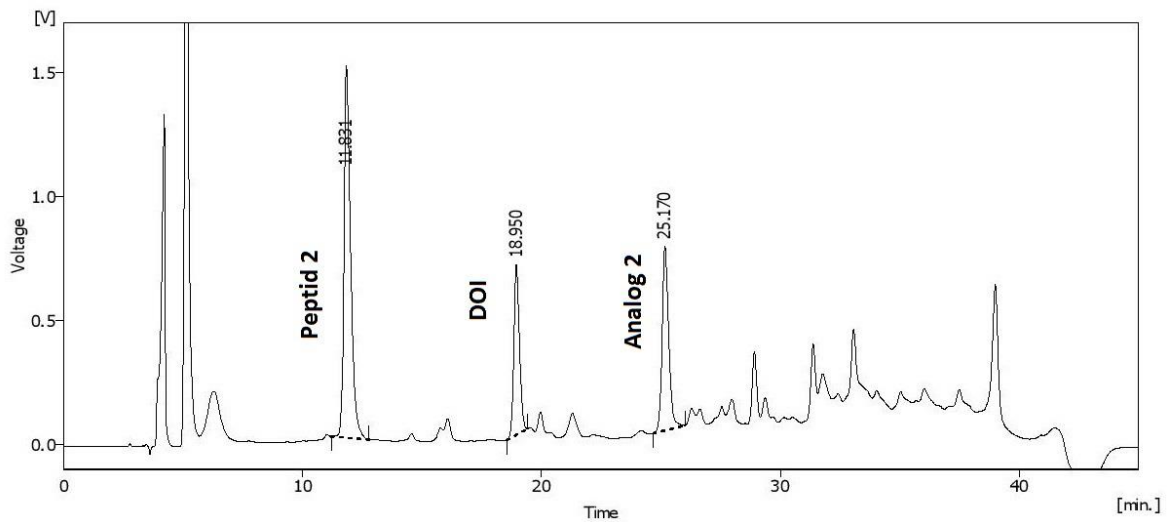
Tab. 6 | Výtěžky semisyntéz jednotlivých insulinových analogů, jejich teoretické, a experimentálně určené hmotnosti. Zkratka n.d. – z angl. non determined – neurčeno.

Analog (DOI-peptid(Pac))	$[MH^+]_{\text{teor}}$	$[MH^+]_{\text{exp}}$	Doba reakce [hod]	Výtěžek [%]
1. DOI-GFFHypTPK(Pac)T-NH ₂	5870,688	n.d.	23,5	12,6
2. DOI-GFFHypTHypK(Pac)T-NH ₂	5886,678	5886,560	5,5	4,8
3. DOI-GFFYPK(Pac)TG-NH ₂	5876,68	5876,69	5,5	16,4
4. DOI-GFFYPK(Pac)TGG-NH ₂	5933,69	5933,72	6,5	20,2



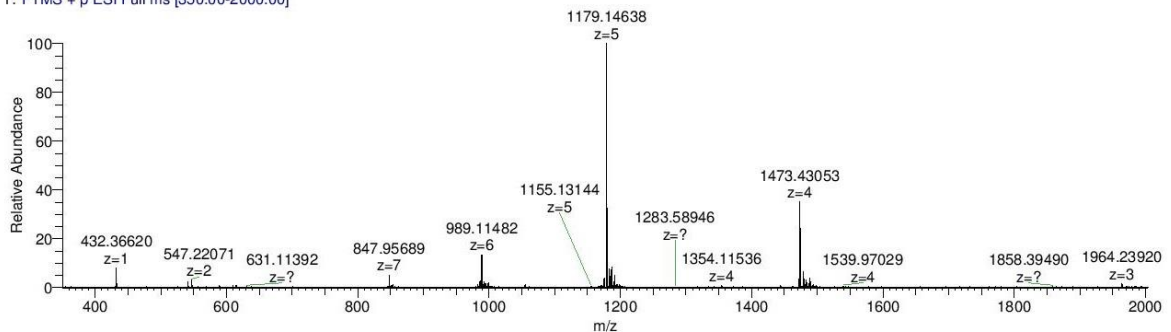
Obr. 24 | Chromatogram semipreparativní RP-HPCL reakční směsi po semisyntéze.

Eluční vrchol 1 obsahoval peptid 1, eluční vrchol 2 obsahoval DOI, eluční vrchol 3 obsahoval insulinový analog 3. Byla měřena absorbance při vlnové délce 218 nm.

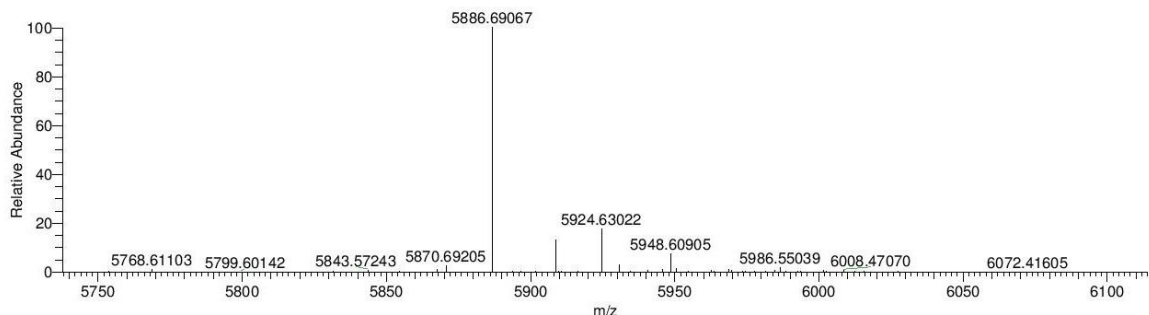


Obr. 25 | Chromatogram zachycující separaci reakční směsi semipreparativním RP-HPLC. Eluční vrchol 1 obsahoval peptid 2, eluční vrchol 2 obsahoval DOI, eluční vrchol 3 obsahoval insulinový analog 2 s časem eluce 25,170 min. Hmotnostní spektrum potvrzuje vznik produktu. Byla měřena absorbance při vlnové délce 218 nm.

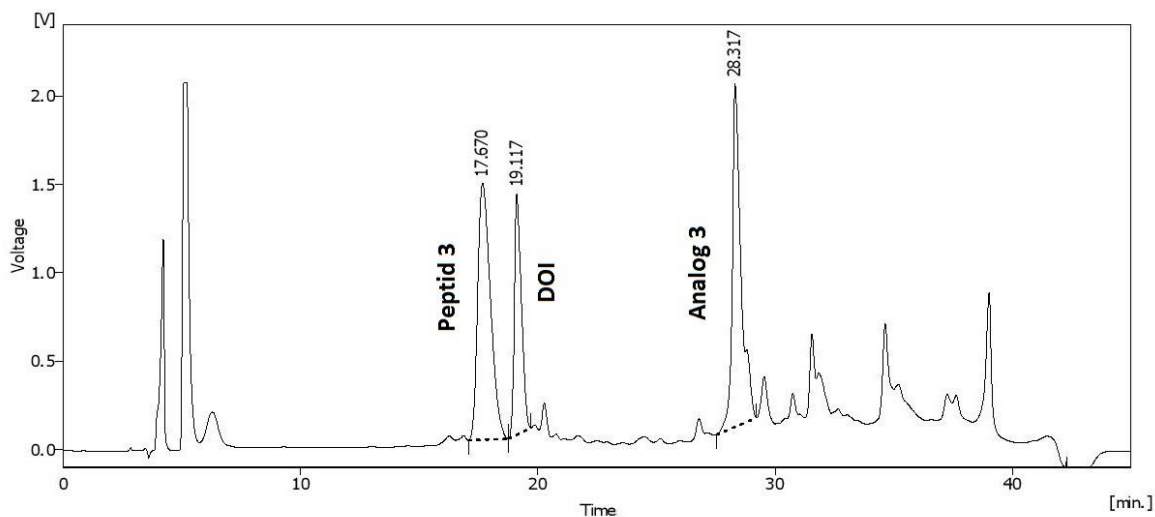
190717servisHR_2+ #56-61 RT: 1.65-1.80 AV: 6 NL: 2.43E6
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



190717servisHR_2+ XT_00001_M_#2 RT: 2.00 AV: 1 NL: 3.43E6
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]

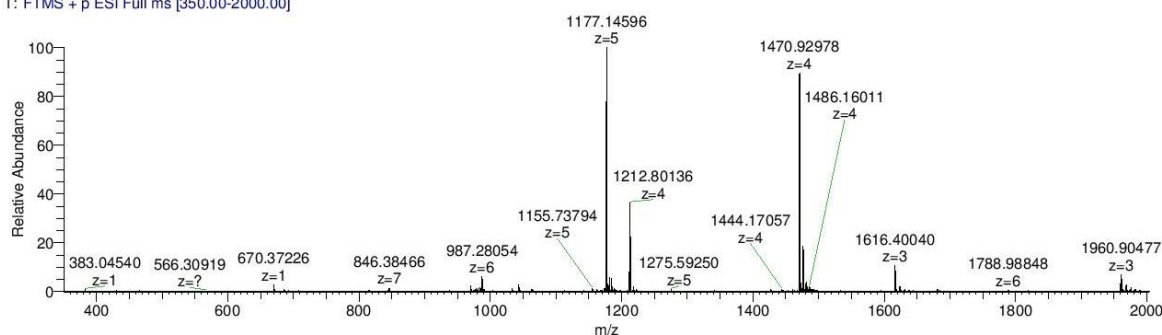


Obr. 26 | Hmotnostní spektrum insulinového analogu 2 (DOI-GFFHypTHypK(Pac)T-NH₂). Teoretické molekulová hmotnost je 5886,678, naměřená experimentální hmotnost je 5886,560.

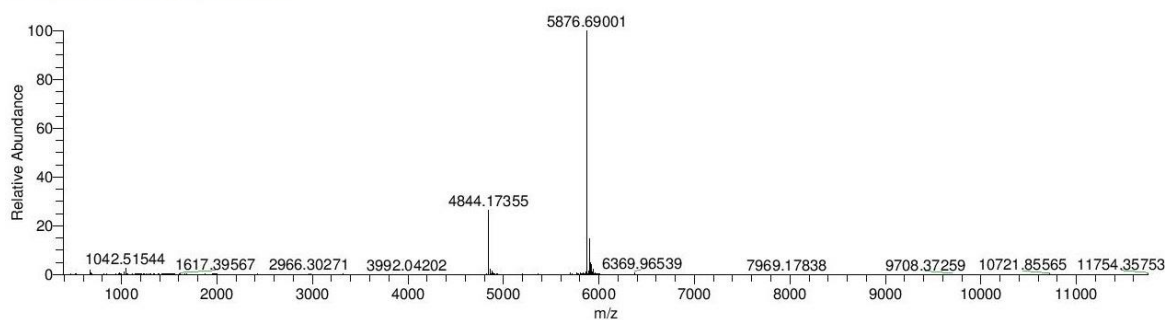


Obr. 27 | Chromatogram zachycující separaci reakční směsi semipreparativním RP-HPLC. Eluční vrchol 1 obsahoval peptid 3, eluční vrchol 2 obsahoval DOI, eluční vrchol 3 obsahoval insulinový analog 3 s časem eluce 28,317 min, jehož hmotnost byla následně potvrzena hmotnostní spektrometrií.

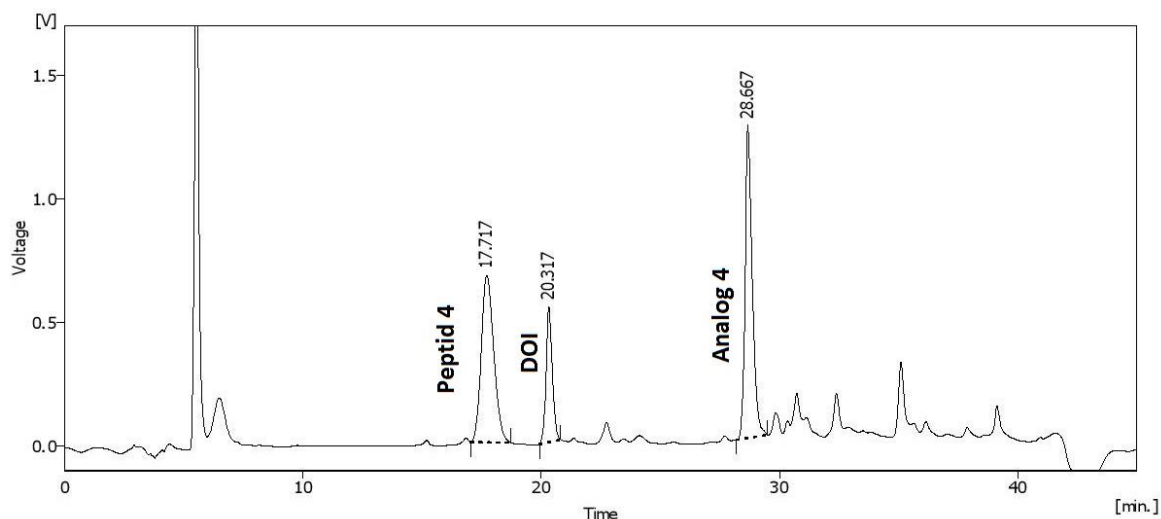
170817servisHR_2+ #57-60 RT: 1.68-1.77 AV: 4 NL: 1.35E7
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



170817servisHR_2+_XT_00001_M_#2 RT: 2.00 AV: 1 NL: 2.97E7
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]

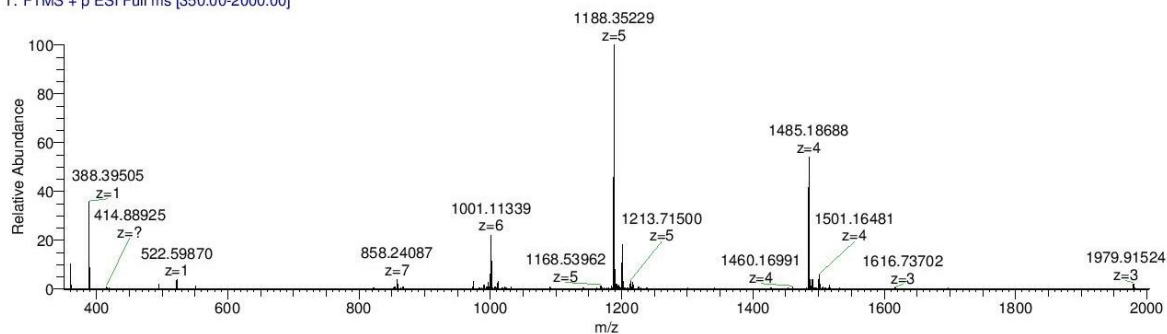


Obr. 28 | Hmotnostní spektrum insulinového analogu 3 (DOI-GFFYPK(Pac)TG-NH₂). Teoretická hmotnost analogu je 5876,68, experimentální hmotnost je 5876,69.

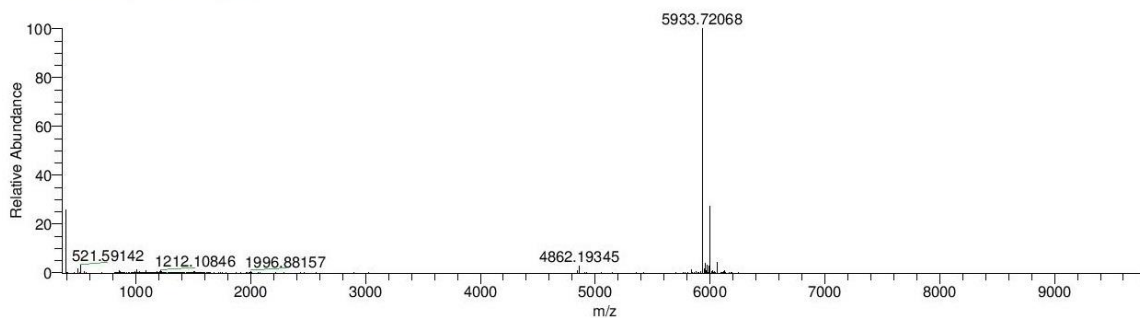


Obr. 29 | Chromatogram zachycující separaci reakční směsi semipreparativním RP-HPLC. Eluční vrchol 1 obsahoval peptid 4, eluční vrchol 2 obsahovala DOI, eluční vrchol 3 obsahovala insulinový analog 4 s časem eluce 28,667 min, jehož hmotnost byla následně potvrzena hmotnostní spektrometrií.

151117servisHR_13+ #57-58 RT: 1.68-1.70 AV: 2 NL: 9.03E6
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



151117servisHR_13+ XT_00001_M_#2 RT: 2.00 AV: 1 NL: 1.55E7
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Obr. 30 | Hmotnostní spektrum potvrzující vznik insulinového analogu 4. Teoretická hmotnost analogu je 5933,69, experimentální hmotnost je 5933,72.

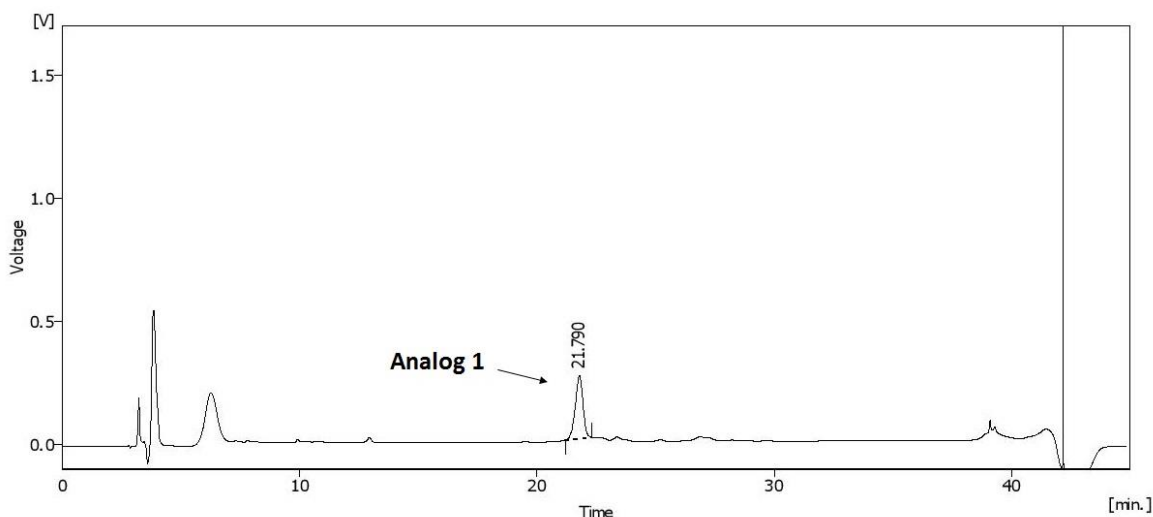
4.3 Odstranění fenylacetylové skupiny

Fenylacetylová skupina (Pac) chrání ε -aminoskupinu lysinu a zabraňuje nechtěným reakcím této skupiny s dalšími látkami ve směsi. Dá se jednoduše odstranit pomocí penicilin amidohydrolázy (PA).

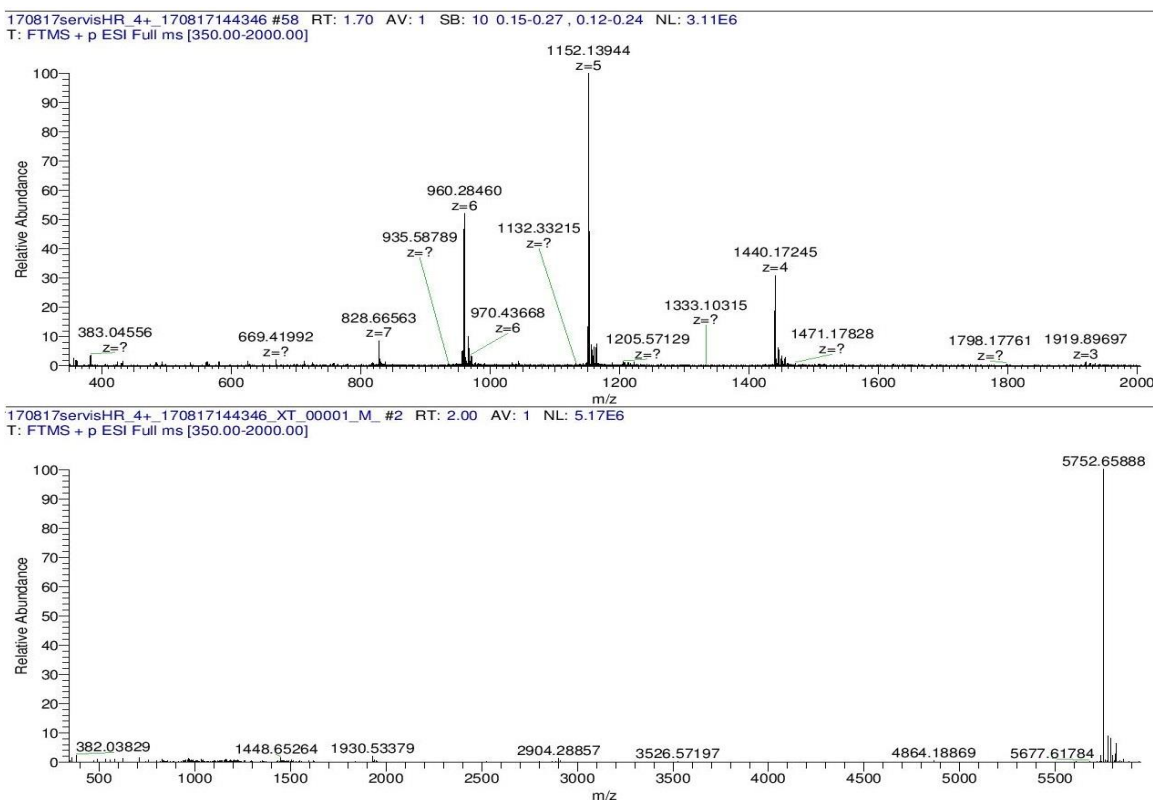
Reakce probíhala dle postupu v kapitole 3.7. Reakce probíhala 6-48 hod za laboratorní teploty, nebo za teploty 37 °C. Průběh reakce byl sledován analytickým RP-HPLC. Konečný a nezreagovaný produkt byly separovány semipreparativním RP-HPLC. Jejich hmotnost byla určena hmotnostní spektrometrií v ESI pozitivním iontovém módu. Experimentální hmotnosti a výtěžky, které jsou vztaženy k počátečnímu látkovému množství nezreagovaného produktu, jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7 | Teoretické a experimentálně zjištěné hmotnosti ochráněných insulinových analogů a jejich výtěžky.

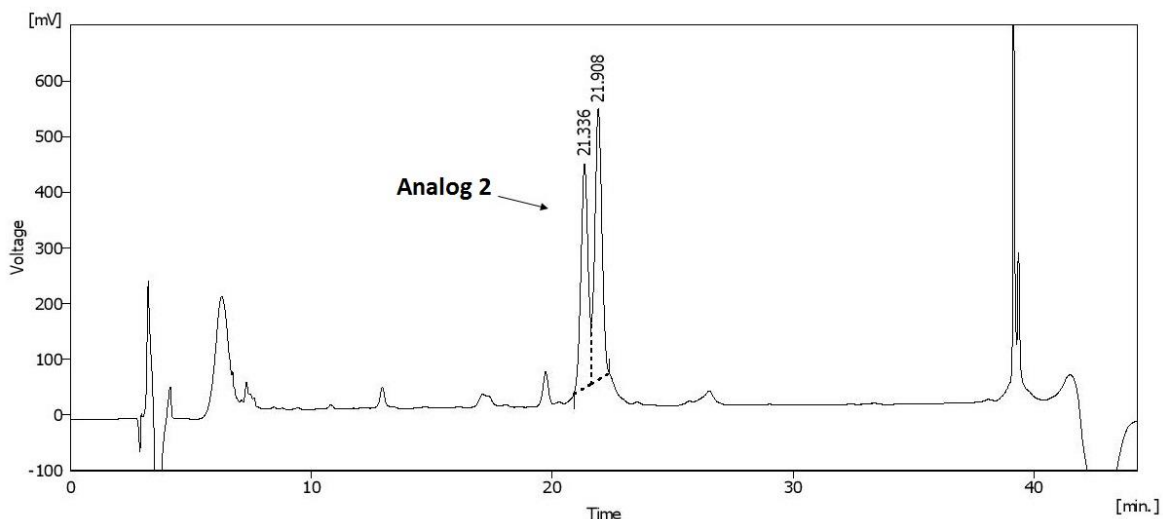
Analog (Konečný produkt)	$[MH^+]_{\text{teor}}$	$[MH^+]_{\text{exp}}$	Doba reakce [hod]	Výtěžek [%]
1. DOI-GFFHypTPKT-NH ₂	5752,648	5752,658	21	54
2. DOI-GFFHypTHypKT-NH ₂	5768,638	5768,652	6	73
3. DOI-GFFYPKTG-NH ₂	5758,64	5758,66	24	15
4. DOI-GFFYPKTGG-NH ₂	5815,65	5815,68	48	8



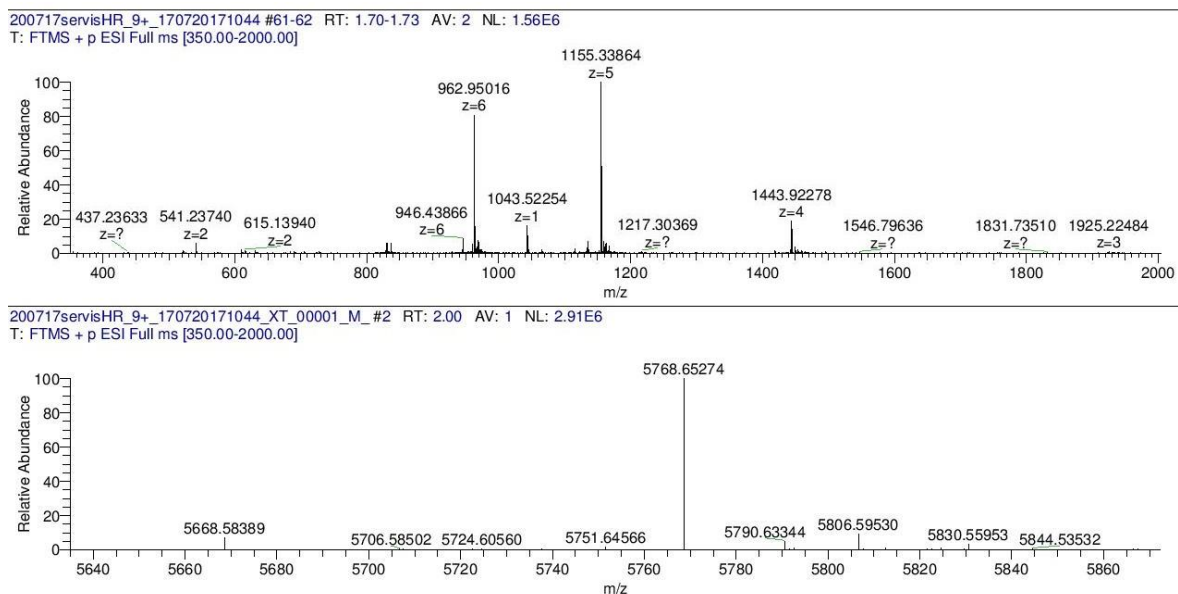
Obr. 31 | Chromatogram semipreparativní RP-HPLC reakční směsi po odstranění fenyloacetylové skupiny insulinového analogu 1 (DOI-GFFHypTPKT-NH₂). Eluce produktu nastala v čase 21,790 min. Byla měřena absorbance při 218 nm.



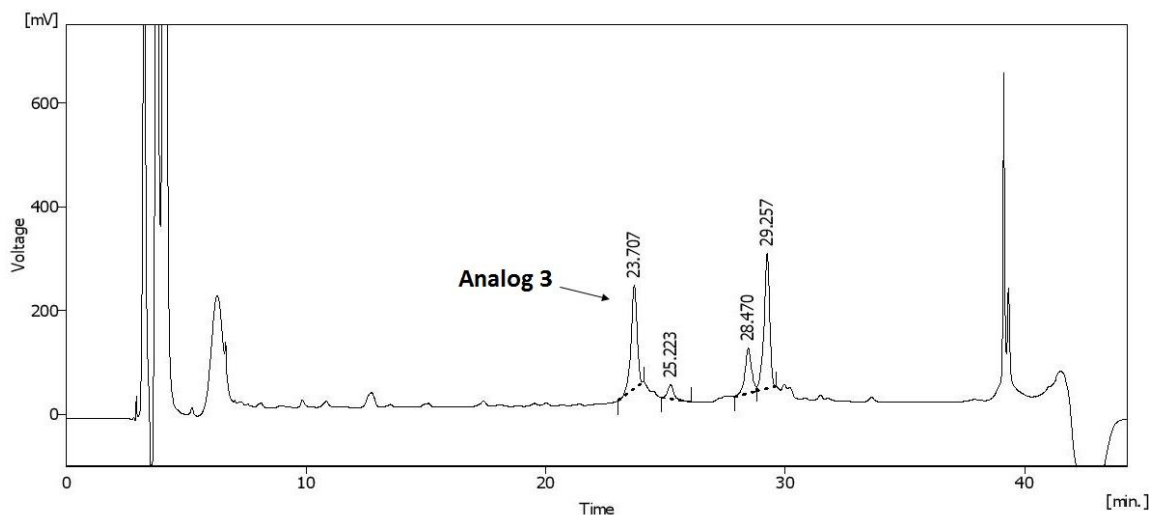
Obr. 32 | Hmotnostní spektrum konečného ochráněného insulinového analogu 1 (DOI-GFFHypTPKT-NH₂). Teoretická hmotnost je 5752,648, experimentálně určena hmotnost je 5752,658.



Obr. 33 | RP-HPLC semipreparace reakční směsi insulinového analogu 2 (DOI-GFFHypTHypKT-NH₂). Odchráněný produkt eluoval v čase 21,336 min. Byla měřena absorbance při 218 nm.

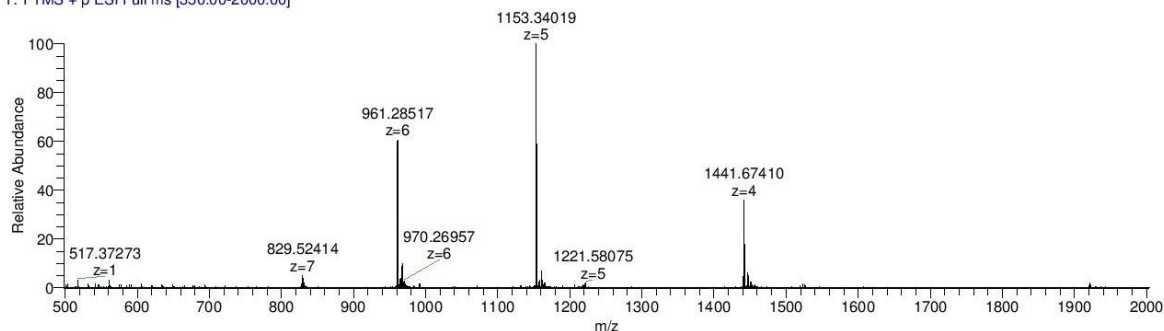


Obr. 34 | Hmotnostní spektrum insulinového analogu 2 (DOI-GFFHypTHypKT-NH₂). Teoretická hmotnost je 5768,638; experimentálně určená hmotnost je 5768,652.

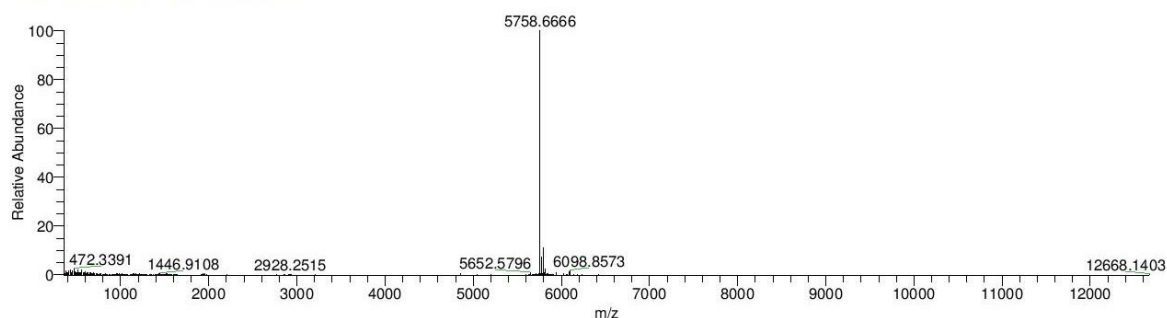


Obr. 35 | RP-HPLC chromatogram zachycující separaci produktu z reakční směsi po odchránění insulinového analogu 3 (DOI-GFFYPKTG-NH₂). Byly sbírané 4 frakce s vyznačenými retenčními časy. Byla měřená absorbance při 218 nm. Hmotnostní spektrometrie potvrdila vznik produktu s elučním vrcholem v čase 23,707 min.

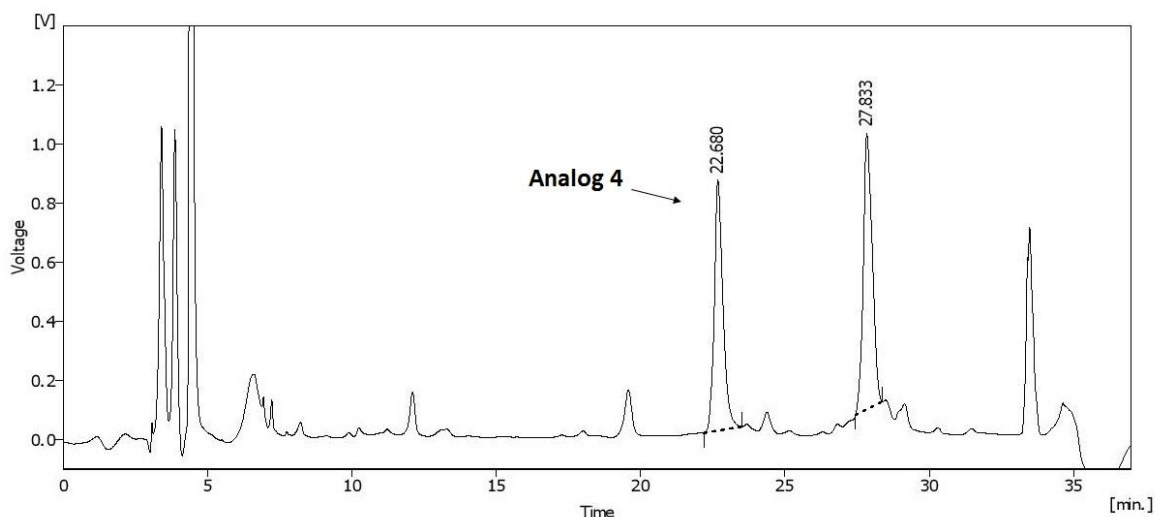
240817servisHR_6+_170824143443 #61-62 RT: 1.70-1.73 AV: 2 NL: 8.36E6
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



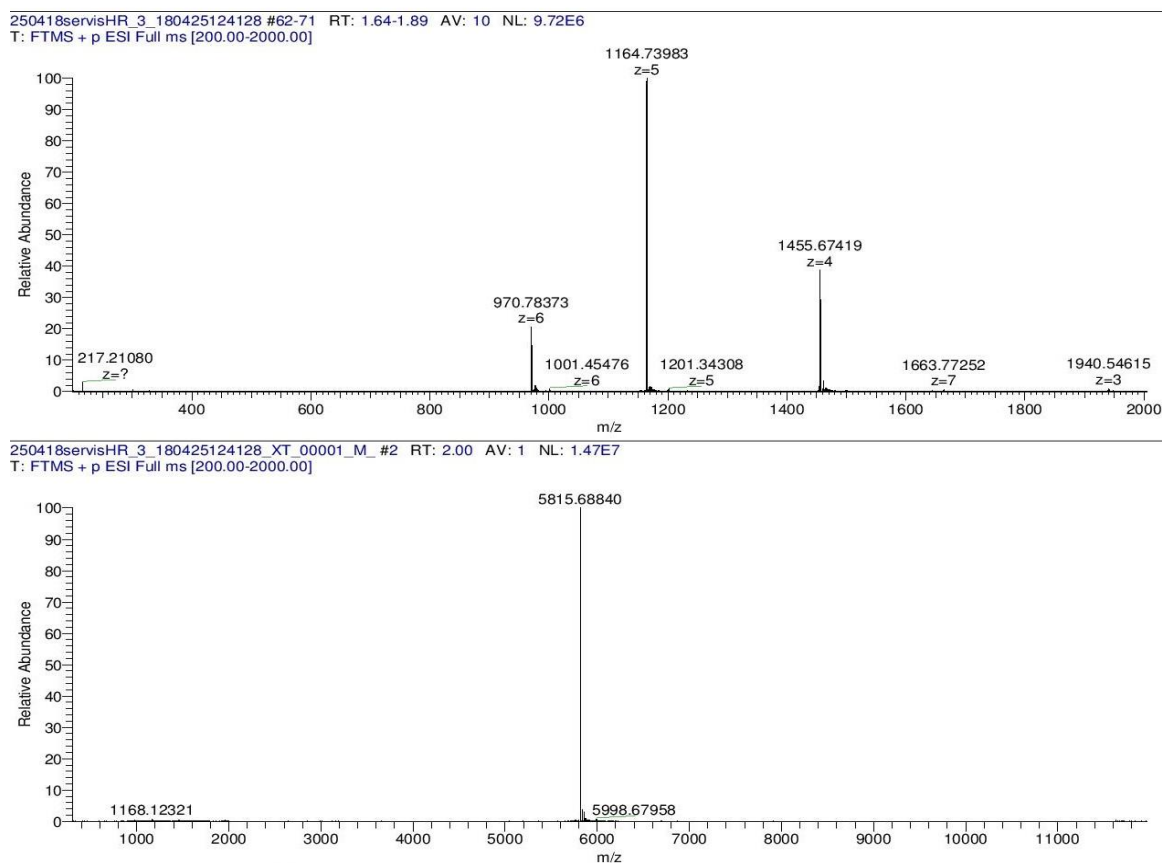
240817servisHR_6+_170824143443_XT_00001_M_170824144158 #2 RT: 2.00 AV: 1 NL: 1.59E7
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Obr. 36 | Hmotnostní spektrum odchráněného insulinového analogu 3 (DOI-GFFYPKTG-NH₂). Teoretická hmotnost je 5758,64, experimentální hmotnost je 5758,66.



Obr. 37 | RP-HPLC chromatogram zachycující separaci produktu z reakční směsi po ochránění insulinového analogu 4 (DOI-GFFYPKTGG-NH₂). Byla měřena absorbance při 218 nm. Hmotnostní spektrometrie potvrdila vznik produktu s elucí v čase 22,680 min.



Obr. 38 | Hmotnostní spektrum ochráněného insulinového analogu 4 (DOI-GFFYPKTGG-NH₂). Teoretická hmotnost je 5815,65, experimentální hodnota je 5815,68.

4.4 Testování vazebné afinity vůči oběma isoformám IR *in vitro*

Testování vazebných afinit probíhalo jako kompetice insulinového analogu s radioaktivně značeným lidským insulinem ($^{125}\text{I-TyrA14-HI}$) o vazebné místo na insulinovém receptoru.

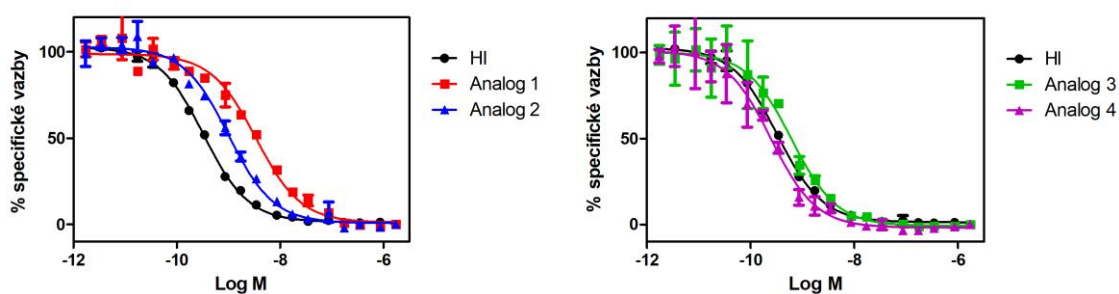
Pro testování vůči IR-A byla použita buněčná linie lidských lymfocytů IM-9 exprimujících výhradně tyto receptory. Pro testování vůči IR-B byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů s blokovanou expresí genů pro myší IGF-1R a transfekovaná lidským IR-B (R/IR-B).

Měření afinity každého analogu probíhalo celkem třikrát, měření afinity lidského insulinu probíhalo celkem čtyřikrát (Obr. 39, str. 60; Obr. 40, str. 61). Z výsledků vyhodnocených programem GraphPad Prism 5.0 byla vypočítána hodnota disociační konstanty K_d (nM); následně byla určena hodnota relativních vazebných afinit (%) vztažených k vazebné afinitě lidského insulinu k IR (100 %). Hodnota relativní vazebné afinity (%) byla vypočítána následovně: $[K_d \text{ lidský insulin} / K_d \text{ analog}] \times 100$.

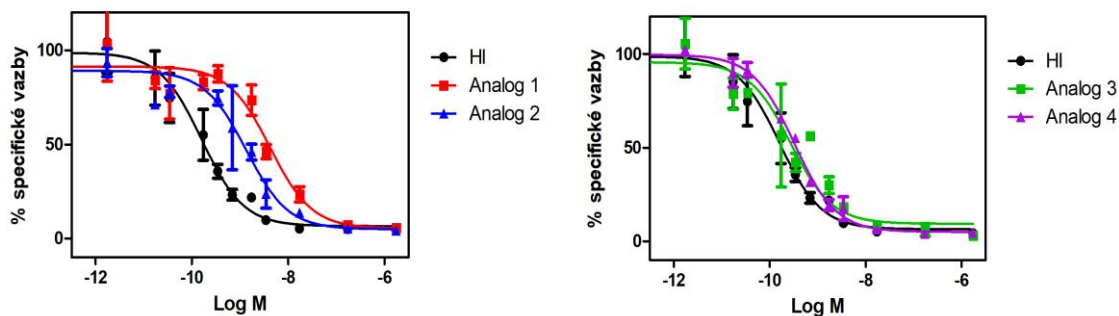
Záměna tyrosinu za hydroxyprolin v pozici B26 (analog 1) způsobila snížení vazebných afinit vůči oběma isoformám IR. Záměna dvou pozic – hydroxyprolinu v pozicích B26 a B28 (analog 2) snížila vazebnou afinitu vůči oběma isoformám na polovinu. Naopak, pozitivně působí záměna threoninu v pozici B27 za prolin a threoninu v pozici B30 za glycin s amidací C-konce (analog 3) a prodloužení řetězce o další glycin s karboxyamidací v pozici B31 (analog 4). Tyto analogy nejenže vykazují zvýšenou vazebnou afinitu vůči IR-A a IR-B (analog 4), také ale vykazují selektivitu vůči oběma isoformám IR-A a IR-B.

Tab. 8 | Hodnoty disociačních konstant (K_d) jednotlivých analogů změřené vůči oběma isoformám insulinového receptoru a hodnoty relativních vazebných afinit (%) jednotlivých insulinových analogů. Hodnoty K_d byly získané z tří nezávislých měření, a proto mají tvar střední hodnoty \pm SD (z angl. standard deviation, směrodatná odchylka). Hodnota K_d pro lidský insulin byla získána celkem ze čtyř nezávislých měření. Hodnota relativních vazebných afinit byla vypočtena následovně: $[K_d \text{ lidský insulin} / K_d \text{ analog}] \times 100$. Měření pro IR-A probíhalo na buněčné linii lidských lymfocytů IM-9, pro měření vůči IR-B byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů s blokovanou expresí genů pro myši IGF-1R a transfekovaná lidským IR-B (R/IR-B).

Analog	IR-A		IR-B	
	$K_d \pm$ SD [nM]	Afinita [%]	$K_d \pm$ SD [nM]	Afinita [%]
HI DOI-GFFYTPKT	0,349 \pm 0,045	100	0,407 \pm 0,047	100
1. DOI-GFFHypTPKT-NH ₂	3,763 \pm 1,283	12,1	3,853 \pm 0,295	12,9
2. DOI-GFFHypTHypKT-NH ₂	1,045 \pm 0,298	43,6	0,981 \pm 0,471	53,7
3. DOI-GFFYPKTG-NH ₂	0,676 \pm 0,184	67,4	0,496 \pm 0,198	100
4. DOI-GFFYPKTGG-NH ₂	0,255 \pm 0,054	136,9	0,249 \pm 0,021	163,5



Obr. 39 | Vazebné křivky insulinových analogů změřené vůči IR-A. Černě – lidský insulin (HI). Analog 1 – [HypB26]insulin-NH₂; analog 2 – [HypB26,B28]insulin-NH₂; analog 3 – [ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30]insulin-NH₂; analog 4 – [ProB27,LysB28,ThrB29,Gly B30,GlyB31]insulin-NH₂.



Obr. 40 | Vazebné křivky insulinových analogů změřené vůči IR-B, z kterých byla odečtená hodnota K_d . Černě – lidský insulin. Analog 1 – [HypB26]insulin-NH₂; analog 2 – [HypB26,B28]insulin-NH₂; analog 3 – [ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30]insulin-NH₂; analog 4 – [ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30,GlyB31]insulin-NH₂.

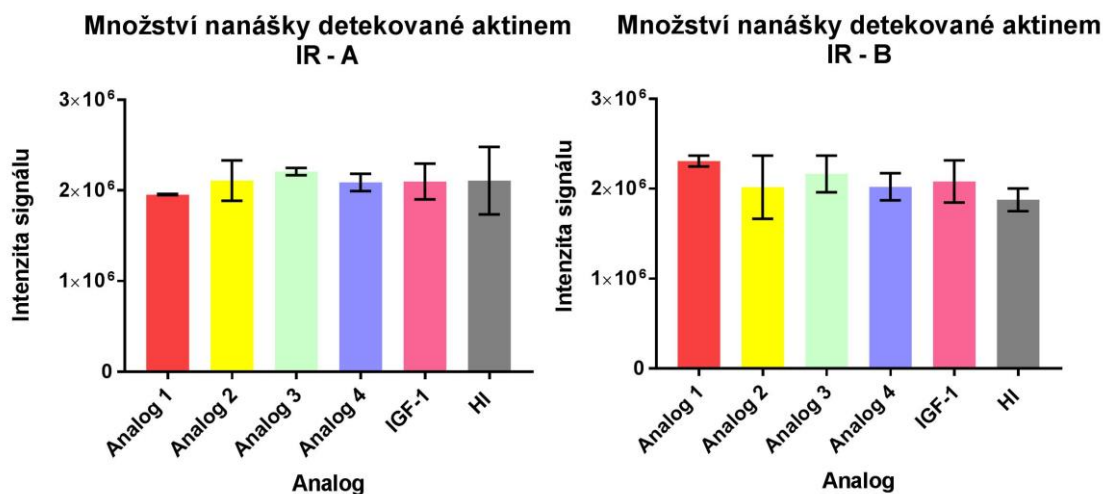
4.5 Metodika studia signalizace IR analogy a studium signálních odpovědí

Pro studium aktivace byly použité myší embryonální fibroblasty s vyřazeným IGF-1 genem a vloženými lidskými geny pro IR-A (buněčná linie R⁻/IR-A), IR-B (R⁻/IR-B). Byly použité analogy, HI a IGF-1 o koncentraci 10⁻⁸M (10 nM). Doba samotné stimulace byla 10 min a reakce byla zastavena vakuovým odsátím média a politím destičky tekutým dusíkem.

Kontrola stejné nanášky vzorků pro SDS-PAGE byla detekovaná protilátkou měřenou proti aktinu. Jak z Obr. 41 na str. 62 plyne, hodnoty s nízkou SD ukazují na stejné hodnoty chemiluminiscenčních signálu, které se pohybují v rozmezí kolem 2×10^6 .

Byla sledována míra autofosforylace receptorů a fosforylace proteinu Akt patřícího k signalizační kaskádě IR. Schopnost jednotlivých analogů aktivovat receptory odpovídá zhruba jejich vazebným afinitám. Analog 1 ([HypB26]insulin-NH₂) způsobil nízkou autofosforylaci obou receptorů a Akt signalizační kaskády. Analog 2 ([HypB26,B28]-insulin-NH₂) způsobuje autofosforylaci a fosforylaci Akt kaskády přiměřeně odpovídající jeho vazebné afinitě vůči oběma isoformám IR. Analogy 3 a 4 mají autofosforylaci průměrně odpovídající autofosforylaci HI vůči oběma isoformám IR a efektivně spouští fosforylaci Akt signalizační kaskády obou isoformem IR, u každého však trochu jinak. Je potřeba počítat s velkou směrodatnou odchylkou. Pro srovnání byl k signalizačním studiím přidán IGF-1, který má hodnotu vazebné afinity vůči IR cca. 1 %. Z toho je možné usoudit,

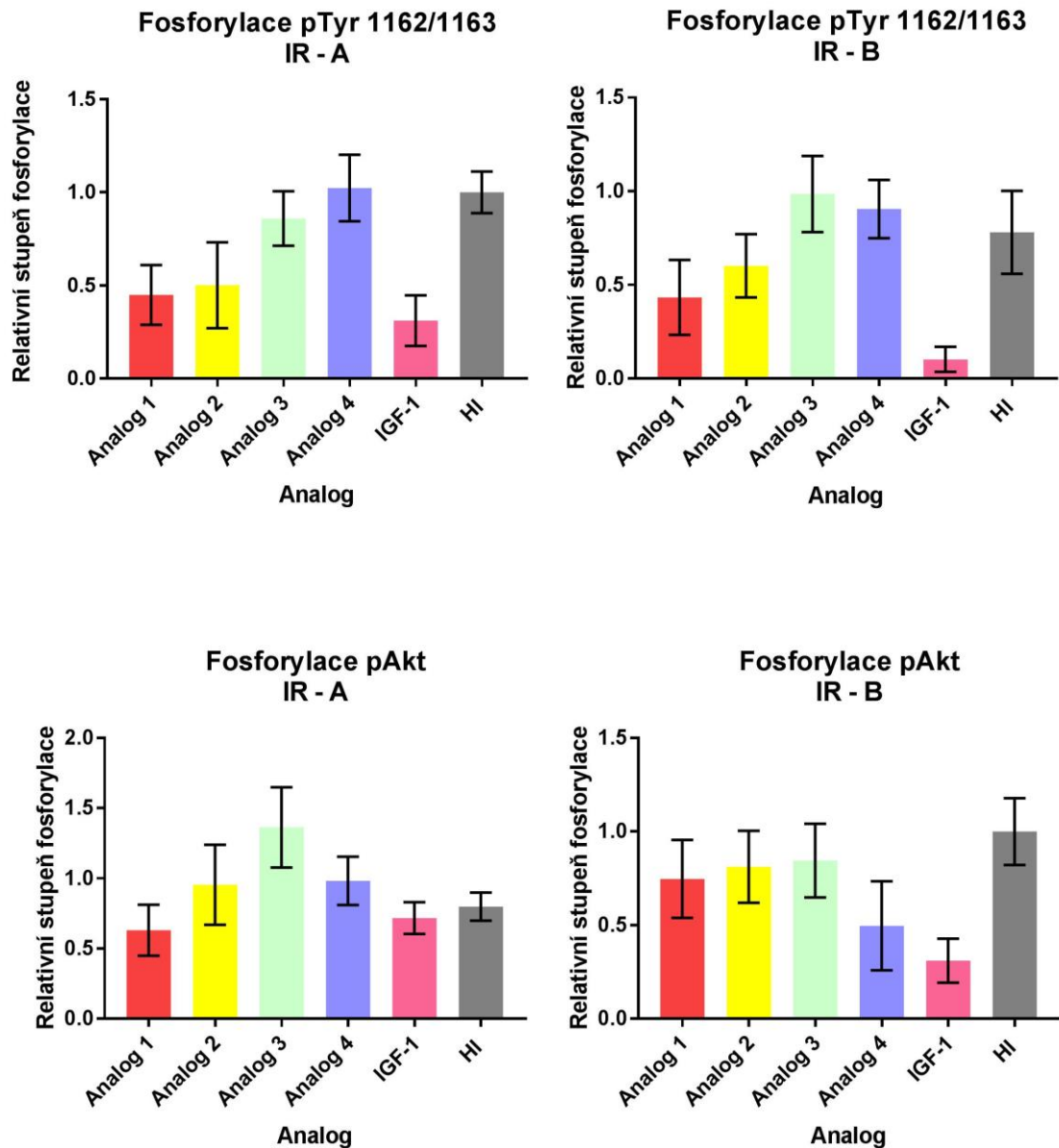
že nenastává specifická vazba IGF-1 na IR, která by spouštěla nežádoucí proliferaci buněk (Obr. 42, str. 63).



Legenda:

- [HypB26]insulin-NH₂
- [HypB26,B28]insulin-NH₂
- [ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30]insulin-NH₂
- [ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30,GlyB31]insulin-NH₂
- IGF-1
- HI - Lidský insulin

Obr. 41 | Kontrola stejné nanášky pro SDS-PAGE. Jsou vidět přibližně stejné hodnoty intenzity signálu všech nanášených vzorků. Kontrola byla provedena samostatně, u IR-A a IR-B. Hodnota intenzity chemiluminiscenčního signálu je vyjádřena graficky v podobě sloupcových grafů jako hodnota ± SD.



Legenda:

- [HypB26]insulin-NH₂
- [HypB26,B28]insulin-NH₂
- [ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30]insulin-NH₂
- [ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30,GlyB31]insulin-NH₂
- IGF-1
- HI - Lidský insulin

Obr. 42 | Aktivace receptorů IR-A a IR-B. Je vidět úroveň fosforylace pTyr1162/1163 v intracelulární části β -podjednotky IR-A/IR-B a pAkt metabolické dráhy po stimulaci insulinovými analogy, IGF-1 a HI. Koncentrace insulinových analogů, IGF-1 a HI byly 10^{-8} M (10 nM). Legenda pod grafy zobrazuje strukturu insulinových analogů. Relativní

stupeň fosforylace je vyjádřen vzhledem k přirozenému ligandu, tedy lidskému insulinu, a graficky je znázorněn v podobě sloupcových grafů jako hodnota \pm SD.

5 Diskuse

Výzkum návrhu a syntézy nové generace insulinových analogů se posledních málo let zaměřuje na vývoj nových receptorově selektivních insulinových analogů, s rozdílnou vazebnou afinitou vůči oběma isoformám IR-A/IR-B. Výzkum těchto analogů začal v roce 2011, kdy dvě vědecké skupiny firmy Novo Nordisk publikovaly analogy, které vykazují zvýšenou selektivitu buď vůči IR-A nebo IR-B^{82,83}.

Alternativním sestřihem IR vznikají dvě isoformy IR (IR-A a IR-B). Obě isoformy se vyznačují specifickou tkáňovou expresí. Isoforma IR-B je zodpovědná hlavně za metabolické efekty a nachází se především na hepatocytech (>90%), v kosterním svalstvu (~70%) a podkožním tuku (~70%). Isoforma IR-A má především mitogenní efekt a nachází se v mozku, slezině, embryonální tkáni a rakovinných buňkách. Primární úlohou insulinu ve svalové a tukové tkáni je aktivace GLUT4 váčků, které fungují jako transportní přenašeč vychytávající glukosu z krevního řečiště. Hepatocyty ale obsahují zejména GLUT2 transportéry, které nejsou regulované insulinem. Úlohou insulinu v hepatocytech je inhibice enzymů glukoneogeneze a glykogenolýzy, čímž se snižuje hladina glukosy v krvi, respektive se dále nezvyšuje. Po subkutánním podání insulinu vzniká problém s regulací glukosy, protože primárně nedochází k inhibici glukoneogeneze a glykogenolýzy, ale dochází k aktivaci GLUT4 transportéru ve svalové a tukové tkáni⁵⁵.

Dalším problémem zejména diabetiků II. typu byla hyperinsulinémie, kterou trpí většina z nich a která může být zvyšována dalším podáváním insulinu. Vysoké hladiny insulinu mohou způsobit zvýšenou vazbu na isoformu IR-A a také na IGF-1R, které mohou dále způsobovat nežádoucí proliferaci a diferenciaci buněk. Přímá souvislost mezi diabetem II. typu a rakovinným bujením byla už prokázána v mnoha studiích²⁴. Také existují spekulace v souvislosti s insulinovými analogy a vznikem rakoviny⁷⁵.

To je důvod, proč se dnešní výzkum zaměřuje na syntézu nových, receptorově selektivních IR-A/IR-B insulinových analogů. Analogy, které by měly potlačenou vazbu na IR-A (případně i na IGF-1R) a naopak zvýšenou afinitu k IR-B by mohly být považovány za „bezpečné“ zvláště pro diabetiky II. typu, jež si musejí aplikovat insulin.

V roce 2010 byl publikován článek o predikování aktivní formy insulinu⁸⁷. Insulin před navázáním na svůj receptor musí projít konformační změnou a přejít do tzv. aktivní formy. Nejdůležitější změna je odklon C-konce řetězce B od molekuly tak, aby jak C-konec řetězce B, tak i jiné části molekuly insulinu mohly přímo interagovat s IR (B26 ohyb). V dnešní době se zkouší několik způsobů, jak stabilizovat odklon C-konce

řetězce B do „preaktivní formy“, jako je např. fixace řetězce B pomocí cystinového, nebo triazolového můstku⁸⁵. Od první určení první krystalové struktury insulínu s insulínovým receptorem v roce 2013 (cit.⁶²) se začalo s návrhem a syntézou nových insulínových analogů, které by měly zajímavé farmakokinetické vlastnosti a byly by zajímavé pro klinickou praxi. Po této první strukturální práci docházelo ke zpřesňování interakce insulínu s IR jak dalšími krystalografickými studiemi²¹, nebo v současné době moderní kryo-elektronovou mikroskopií (kryo-EM)⁹⁰.

Tato bakalářská práce se zaměřila na syntézu nových insulínových analogů modifikacemi na C-konci řetězce B. Cílem těchto záměn byla (i) snaha o napodobení aktivní struktury insulínu vnesením aminokyseliny umožňující změnu konformace hlavního řetězce C-konce řetězce B, (ii) příprava takových analogů, které by měly co nejvíce rozlišnou afinitu vůči IR-A a IR-B ve prospěch IR-B. Pro modifikace jsme zvolili záměnu aminokyselin v pozicích B26-B30 za hydroxyprolin, který má stejně jako prolin schopnost ovlivnit konformaci hlavního řetězce a amidaci C-konce řetězce B, o které se ví, že zlepšuje afinitu vůči IR-B.

Příprava DOI proběhla s výtěžkem 65 %. Po nedostatečném štěpení trypsinem bylo přidáno další množství trypsinu, čímž se dosáhlo většího výtěžku. Cílem bylo zejména rozštěpit veškerý insulín, který by mohl později interferovat při čištění na gelové chromatografii. Největší ztráty produktu nastaly hlavně při čištění gelovou chromatografií, přesto je tento výtěžek postačující.

Byly připraveny 4 nové insulínové analogy záměnou v pozicích B26-B30 s amidací na C-konci (kap. 4.3). Výtěžky jednotlivých syntetických peptidů po purifikaci se pohybovaly od 20-80 % (Tab. 5, str. 45). Peptid 4 (GFFYPK(Pac)TGG-NH₂) měl výtěžek jen 20 % oproti ostatním peptidům, což bylo pravděpodobně způsobeno syntetizovanou sekvencí. Peptidy a DOI byly následně využity pro enzymatickou semisyntézu. Výtěžky se pohybovaly v rozmezí 5-20 % (Tab. 6, str. 50). Pro vyšší výtěžek by musela semisyntéza probíhat za kontinuální teploty 37 °C, při které byl ale hrozilo větší riziko vzniku vedlejších produktů. Pokud by výtěžek reakce nebyl dostačující, je zde možnost semisyntézu opakovat a poté spojit výsledné produkty. Odstranění fenylacetylové skupiny probíhalo při laboratorní teplotě, nebo při teplotě 37 °C po dobu 6-48 hod s výtěžkem 8-54 % (Tab. 7, str. 54). Insulínový analog 4 se ochraňoval cca. 48 hod, za přidání asi 7 mg PA. Na rozdíl od ostatních analogů, kde byl výsledkem ochránění lysinu vždy jeden produkt, deprotektace insulínového analogu 3 probíhalo za vzniku dvou dalších,

blíže nespecifikovaných produktů.

Následně byly všechny insulinové analogy testované vůči oběma isoformám IR, IR-A a IR-B (Tab. 8, str. 59). Analog 1 ([HypB26]insulin-NH₂) vykazuje téměř stejnou vazebnou afinitu pro oba receptory s poměrem 1,06 ve prospěch IR-B. Vazebné afinity jsou nízké, 12 % v porovnání s lidským insulinem. Analog se stejnou záměnou, ale zkrácený o 4 aminokyseliny [HypB26,desB27-B30]-insulin-NH₂ má 4-8 vyšší afinitu než lidský insulin na obě isoformy HI (nepublikované výsledky). Zdá se tedy, že zatímco ve zkráceném analogu záměna za hydroxyprolin způsobila jednak zvýšenou afinitu jednak poměrně výraznou selektivitu, u plně dlouhé verze tohoto analogu došlo k výraznému snížení obou těchto vlastností. Je to tedy pravděpodobně způsobeno tím, že změna konformace způsobená zavedením hydroxyprolinu do hlavního řetězce stočí zbylé 4 aminokyseliny do pozice nepříznivé pro interakci analogu s IR.

V analogu 2 ([HypB26,B28]insulin-NH₂) byl zaměněn jak tyrosin v pozici B26, tak prolin v pozici B28 za hydroxyprolin. Záměna prolinu v pozici B28 za hydroxyprolin měla pozitivní vliv a částečně zvýšila afinitu oproti analogu 1 a má polovičně sníženou afinitu vůči HI. Poměr afinit činil 1,23 ve prospěch IR-B. Pozitivně v tomto místě zřejmě působí hydroxyskupina hydroxyprolinu v pozici B28, která nekovalentními interakcemi může tvořit vazby s receptorem. Faktorem, který snižuje afinitu k IR, zůstává hydroxyprolin v pozici B26, který způsobuje konformační změny nepříznivé pro interakci s receptorem.

Analog 3 ([ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30]insulin-NH₂) vykazuje sníženou afinitu vůči IR-A, u IR-B je vazebná afinita srovnatelná s HI. Pozitivní je poměr afinit činící hodnotu téměř 1,5 ve prospěch IR-B. Delece threoninu v pozici B27 způsobila posun prolinu původně v pozici B28 do pozice B27. Zdá se, že tato modifikace nemá tak snižující efekt na afinitu jako prolin nebo hydroxyprolin v pozici B26. Amidace C-konce řetězce B u takto modifikovaného analogu také nemá velký vliv na afinitu.

Oproti analogu 3 má poslední analog ze série, analog 4 ([ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30,GlyB31]insulin-NH₂), vyšší afinitu na obě dvě isoformy IR, takže se zdá, že prodloužení C-konce řetězce B o jednu aminokyselinu a její amidace má určitě pozitivní vliv na vazebnou afinitu. Poměr afinit je 1,2 ve prospěch IR-B.

Studium signalizace IR a analogů v této práci je v kvantitativním porovnání s výsledkem vazebných testů těchto analogů. Byla sledována celková fosforylace receptoru

a fosforylace proteinu Akt, který představuje metabolickou část kaskády (Obr. 42, str. 63).

Analog 1 je ve shodě ve srovnání s výsledky vazebných testů. Způsobuje sníženou fosforylaci celkového receptoru a metabolické kaskády než HI. Malý rozdíl ve vazebných afinitách mezi receptory je vidět i v signální odpovědi u Akt metabolické kaskády.

Analog 2 kvantitativně odpovídá velikosti fosforylace celkového receptoru oproti HI. Má téměř poloviční hodnoty a u IR-B spouští dokonce silnější signální odpověď v metabolické kaskádě, než je tomu u IR-A, i když výsledek není signifikantní.

Výsledky z fosforylace analogů 3 a 4 jsou také srovnatelné s výsledkem vazebných testů. Oba dva mají schopnost fosforylace pTyr 1162/1163 i pAkt srovnatelnou s HI na obou dvou isoformách IR s výjimkou analogu 4 při fosforylace pAkt, kde se schopnost fosforylace analogem 4 jeví nižší. Kontrola množství nanášky byla kontrolována a detekována protilátkou proti aktinu. Na Obr. 41, str. 62 je vidět množství změřeného chemiluminiscenčního signálu, který se pohybuje u každého analogu kolem hodnoty 2×10^6 . Z toho je možné usuzovat stejné množství nanášky v každé jamce při SDS-PAGE.

Při složitosti vazby insulinu na jeho receptor, jehož struktura v komplexu dosud nebyla plně objasněna, je velmi obtížné designovat strukturu, o které bychom předpokládali, že bude mít kýžené vlastnosti. Vzhledem k tomu, že se obě isoformy IR liší pouze o 12 aminokyselin, je velmi obtížné predikovat celkovou interakci insulinu nebo jeho analogu s receptorem. V této práci jsme uplatnili poznatky z předchozího výzkumu ve snaze dále ještě odlišit schopnost vazby na IR-A a IR-B a vytvořit tak selektivní analogy insulinu. Zjistili jsme, že vnesení hydroxyprolinu do pozice B26 u plně dlouhého analogu insulinu má negativní vliv na interakci s receptorem, kdežto delece ThrB26 a posun prolinu na pozici B27 tuto interakci nijak neovlivňuje. Opět se nám potvrdilo, že prodloužení C-konce řetězce B a jeho amidace má pozitivní vliv na selektivitu vůči isoformě IR-B.

Závěrem lze říci, že analogy uveřejněné v této práci nám přinesly další informace týkající se návrhu receptorově selektivních analogů insulinu a výsledky budou uplatněny v návrhu dalších analogů. Pro další informace by bylo zajímavé u nejúspěšnějších analogů určit strukturu v komplexu s IR buď rentgenostrukturní nebo kryo-EM analýzou. Takováto data by určitě přispěla k návrhu nových, receptorově selektivních IR-A/IR-B insulinových analogů.

6 Závěr

V této studii se podařilo připravit nové IR-A/IR-B insulinové analogy. Tři z nich dokonce vykazují určitou receptorovou selektivitu. Ukázalo se, že vložení prolinu nebo hydroxyprolinu do pozic B26-B30 ovlivnilo málo receptorovou selektivitu na rozdíl od amidace glycinu v pozici B30, případně prodloužení řetězce o další glycin. Analog [ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30]insulin-NH₂ vykazuje nejvyšší selektivitu s poměrem afinit 1,5 vůči IR-B, díky kombinaci prolinu v pozici B27 a amidace glycinu na C-konci řetězce B. Analog [ProB27,LysB28,ThrB29,GlyB30,GlyB31]insulin-NH₂ vykazuje zvýšenou vazebnou afinitu vůči oběma isoformám IR-A a IR-B, ale poměr afinit je pouze 1,2 ve prospěchu IR-B. Vyšší vazebnou afinitu způsobuje prodloužení řetězce o jednu aminokyselinu, což je v souladu s našimi předchozími výsledky.

Nejúspěšnější z těchto analogů by mohly být v budoucnu prozkoumány v komplexu s IR nějakou z metod určení 3D struktury, jako je rentgenostrukturní analýza nebo kryo-EM. Spolu s těmito informacemi o struktuře to může mít vliv na budoucí návrh nových, lepších, receptorově selektivních IR-A/IR-B insulinových analogů.

7 Zdroje

- (1) Bliss, M. *Diabetes Care* **1993**, 16 (3), str. 4-7.
- (2) Paulose, K. P. *J. Assoc. Physicians India* **1999**, 47 (2), 255.
- (3) Rosenfeld, L. *Clin. Chem.* **2002**, 48 (12), str. 2270-2288.
- (4) Sanger, F. *Science* **1959**, 129 (3359), str. 1340-1344.
- (5) Keen, H.; Pickup, J. C.; Bilous, R. W.; Glynne, A.; Viberti, G. C.; Jarrett, R. J.; Marsden, R. *Lancet* **1980**, 316 (8191), str. 398-401.
- (6) Garg, S. K.; Carmain, J. A.; Braddy, K. C.; Anderson, J. H.; Vignati, L.; Jennings, M. K.; Chase, H. P. *Diabet. Med.* **1996**, 13 (1), str. 47-52.
- (7) Hirsch, I. *N. Engl. Med.* **2005**, 352 (2), str. 174-183.
- (8) Derewenda, U.; Derewenda, Z.; Dodson, G. G.; Hubbard, R. E.; Korber, F. *Br. Med. Bull.* **1989**, 45 (1), str. 4-18.
- (9) Žáková, L. Nové insulinové analogy modifikované v C-koncové části B-řetězce: Disertační práce PřF Uk v Praze, katedra biochemie a ÚOCHB AV ČR, Praha, 2004.
- (10) Adams, M. J.; Blundell, T. L.; Dodson, E. J.; Dodson, G. G.; Vijayan, M.; Baker, E. N.; Harding, M. M.; Hodgkin, D. C.; Rimmer, B.; Sheat, S. *Nature* **1969**, 224 (5218), str.491-495.
- (11) X. Chang; A. M. M. Jørgensen; Bardrum, P.; Led, J. J. **1997**, 36 (31), str. 9409–9422.
- (12) Suckale, J.; Solimena, M. *Trends Endocrinol. Metab.* **2010**, 21 (10), str. 599-609.
- (13) Ciszak, E.; Smith, G. D. *Biochemistry* **1994**, 33 (6), str. 1512–1517.
- (14) Conlon, J. M. *Peptides* **2001**, 22 (7), str. 1183-1193.
- (15) Weiss, M. A. v knize *Vitamins and hormones*; NIH Public Access, 2009; kap. 80, str. 33-49.
- (16) Mccord, J. M. *Assessment* **1981**, 3 (51), str. 1981-1981.

- (17) Markussen, J.; Diers, I.; Hougaard, P.; Langkjaer, L.; Norris, K.; Snel, L.; Sorensen, A. R.; Sorensen, E.; Voigt, H. O. *Protein Eng.* **1988**, *2* (2), str. 157-166.
- (18) Ciszak, E.; Beals, J. M.; Frank, B. H.; Baker, J. C.; Carter, N. D.; Smith, G. D. *Structure* **1995**, *15* (3), str. 61-65.
- (19) Smith, G. D.; Pangborn, W. A.; Blessing, R. H.; IUCr. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2005**, *61* (11), str. 1476-1482.
- (20) Moller, D. E.; Yokota, A.; Caro, J. F.; Flier, J. S. *Mol. Endocrinol.* **1989**, *3* (8), str. 1263-1269.
- (21) Menting, J. G.; Yang, Y.; Chan, S. J.; Phillips, N. B.; Smith, B. J.; Whittaker, J.; Wickramasinghe, N. P.; Whittaker, L. J.; Pandyarajan, V.; Wan, Z. I.; Yadav, S. P.; Carroll, J. M.; Strokes, N.; Roberts, C. T.; Ismail-Beigi, F.; Milewski, W.; Steiner, D. F.; Chauhan, V. S.; Ward, C. W.; Weiss, M. A.; Lawrence, M. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (33), str. 3395-3404.
- (22) Boucher, J.; Kleinridders, A.; Kahn, C. R. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6* (1), str. 91-114.
- (23) Pollak, M. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8* (12), str. 915-928.
- (24) Belfiore, A.; Malaguarnera, R. *Endocr. Relat. Cancer* **2011**, *18* (4), str. 125-147.
- (25) Keen, H. *Proc. R. Soc. Med.* **1972**, *65* (8), str. 742-743.
- (26) Suckale, J.; Solimena, M. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, str. 7156-7171.
- (27) Rawdon, B. B.; Andrew, A. *Histol. Histopathol.* **1993**, *8* (3), str. 567-580.
- (28) Devaskar, S. U.; Giddings, S. J.; Rajakumar, P. A.; Carnaghi, L. R.; Menon, R. K.; Zahm, D. S. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (11), str. 8445-8454.
- (29) Žáková, L.; Jiráček, J. *Chem. List.* **2005**, *99* (11), str. 772-781.
- (30) Walter, P.; Gilmore, R.; Blobel, G. *Cell* **1984**, *38* (1), str. 5-8.
- (31) Steiner, D. F.; Rubenstein, A. H. *Science* **1997**, *277* (5325), str. 531-532.
- (32) Farquhar, M. G.; Palade, G. E. *J. Cell Biol.* **1981**, *91* (3), str. 77-103.
- (33) Orci, L.; Halban, P.; Perrelet, A.; Amherdt, M.; Ravazzola, M.; Anderson, R. G. *J.*

Cell Biol. **1994**, 126 (5), str. 1149-1156.

- (34) Docherty, K.; Carroll, R. J.; Steiner, D. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, 79 (15), str. 4613-4617.
- (35) Kemmler, W.; Steiner, D. F.; Borg, J. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248 (13), str. 4544-4551.
- (36) Dodson, G.; Steiner, D. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8 (2), str. 189-194.
- (37) Ullrich, A.; Shine, J.; Chirgwin, J.; Pictet, R.; Tischler, E.; Rutter, W. J.; Goodman, H. M. *Science* **1977**, 196 (4296), str. 1313-1319.
- (38) Owerbach, D.; Bell, G. I.; Rutter, W. J.; Brown, J. A.; Shows, T. B. *Diabetes* **1981**, 30 (3), str. 267-270.
- (39) Bell, G. I.; Gerhardt, D. S.; Fong, N. M.; Sanchez-Pescador, R.; Rall, L. B. *Biochemistry* **1985**, 82 (19), str. 6450-6454.
- (40) Cuatrecasas P., Jacobs S., *The Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer-Verlag: Berlin, 1990.
- (41) Müller, D.; Baumeister, H.; Buck, F.; Richter, D. *Eur. J. Biochem.* **1991**, 202 (2), str. 285-292.
- (42) Authier, F.; Posner, B. I.; Bergeron, J. J. *Clin. Invest. Med.* **1996**, 19 (3), str. 149-160.
- (43) Roth, R. A.; Mesrirow, M. L.; Yokono, K.; Baba, S. *Endocr. Res.* **1984**, 10 (2), str. 101-112.
- (44) Duckworth, W. C. *Endocr. Rev.* **1988**, 9 (3), str. 319-345.
- (45) Hamel, F. G.; Bennett, R. G.; Duckworth, W. C. *Endocrinology* **1998**, 139 (10), str. 4061-4066.
- (46) Rabkin, R.; Ryan, M. P.; Duckworth, W. C. *Diabetologia* **1984**, 27 (3), str. 351-357.
- (47) Jochen, A.; Hays, J.; Lee, M. *J. Cell. Physiol.* **1989**, 141 (3), str. 527-534.
- (48) Stentz, F. B.; Harris, H. L.; Kitabchi, A. E. *Endocrinology* **1985**, 116 (3), str. 926-934.
- (49) Luo, B.; Chan, W. F. N.; Lord, S. J.; Nanji, S. A.; Rajotte, R. V.; Shapiro, A. M. J.;

- Anderson, C. C. *Scand. J. Immunol.* **2007**, *65* (1), str. 22-31.
- (50) Seta, K. A.; Roth, R. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *231* (1), str. 167-171.
- (51) Levy, J.; Olefsky, J. M. *Endocrinology* **1987**, *120* (2), str. 450-456.
- (52) Ebina, Y.; Ellis, L.; Jarnagin, K.; Edery, M.; Graf, L.; Clauser, E.; Ou, J. H.; Masiarz, F.; Kan, Y. W.; Goldfine, I. D. *Cell* **1985**, *40* (4), str. 747-58.
- (53) De Meyts, P.; Whittaker, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1* (10), str. 769-783.
- (54) Jiráček, J.; Žáková, L. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2017**, *8* (6), str. 1-8.
- (55) Belfiore, A.; Frasca, F.; Pandini, G.; Sciacca, L.; Vigneri, R. *Endocr. Rev.* **2009**, *30* (6), str. 586-623.
- (56) McKern, N. M.; Lawrence, M. C.; Streltsov, V. A.; Lou, M.-Z.; Adams, T. E.; Lovrecz, G. O.; Elleman, T. C.; Richards, K. M.; Bentley, J. D.; Pilling, P. A.; Hoyne, P. A.; Cartledge, K. A.; Pham, T. M.; Lewis, J. L.; Sankovich, S. E.; Stoichevska, V.; Da Silva, E.; Robinson, C. P.; Frenkel, M. J.; Sparrow, L. G.; Fernley, R. T.; Epa, V. C.; Ward, C. W. *Nature* **2006**, *443* (7108), 218–221.
- (57) Croll, T. I.; Smith, B. J.; Margetts, M. B.; Whittaker, J.; Weiss, M. A.; Ward, C. W.; Lawrence, M. C. *Structure* **2016**, *24* (3), str. 469-76.
- (58) Žáková, L.; Kazdová, L.; Hančlová, I.; Protivínská, E.; Šanda, M.; Buděšínský, M.; Jiráček, J. *Biochemistry* **2008**, *47* (21), str. 5858-5868.
- (59) De Meyts, P. *BioEssays* **2004**, *26* (12), str. 1351-1362.
- (60) Leyer, S.; Leithauser, H. G. M.; I, D. B.; Wollmer, A.; Hocker, H. **1995**, *46* (5), str. 397-407.
- (61) Hua, Q. *Protein Cell* **2010**, *1* (6), str. 537-551.
- (62) Menting, J. G.; Whittaker, J.; Margetts, M. B.; Whittaker, L. J.; Kong, G. K. W.; Smith, B. J.; Watson, C. J.; Žáková, L.; Kletvíková, E.; Jiráček, J.; Chan, S. J.; Steiner, D. F.; Dodson, G. G.; Brzozowski, A. M.; Weiss, M. A.; Ward, C. W.; Lawrence, M. C. *Nature* **2013**, *493* (7431), str. 241-245.
- (63) Whittaker, L.; Hao, C.; Fu, W.; Whittaker, J. *Biochemistry* **2008**, *47* (48), str.

12900-12909.

- (64) Ward, C. W.; Lawrence, M. C. *BioEssays* **2009**, *31* (4), str. 422-434.
- (65) Mynarcik, D. C.; Yu, G. Q.; Whittaker, J. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (5), str. 2439-2442.
- (66) Menting, J. G.; Ward, C. W.; Margetts, M. B.; Lawrence, M. C. *Biochemistry* **2009**, *48* (23), str. 5492-5500.
- (67) Huang, K.; Xu, B.; Hu, S.-Q.; Chu, Y.-C.; Hua, Q.; Qu, Y.; Li, B.; Wang, S.; Wang, R.; Nakagawa, S. H.; Theede, A. M.; Whittaker, J.; De Meyts, P.; Katsoyannis, P. G.; Weiss, M. A. *J. Mol. Biol.* **2004**, *341* (2), str. 529-550.
- (68) Kosinová, L.; Veverka, V.; Novotná, P.; Collinsová, M.; Urbanová, M.; Moody, N. R.; Turkenburg, J. P.; Jiráček, J.; Brzozowski, A. M.; Žáková, L. *Biochemistry* **2014**, *53* (21), str. 3392-3402.
- (69) Jiracek, J.; Zakova, L.; Antolikova, E.; Watson, C. J.; Turkenburg, J. P.; Dodson, G. G.; Brzozowski, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (5), str. 1966-1970.
- (70) Žáková, L.; Kletvíková, E.; Lepšík, M.; Collinsová, M.; Watson, C. J.; Turkenburg, J. P.; Jiráček, J.; Brzozowski, A. M. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70* (10), str. 2765-2774.
- (71) Chen, W. J.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265* (6), str. 3116-3123.
- (72) Siddle, K. *J. Mol. Endocrinol.* **2011**, *47* (1), str. 1-10.
- (73) Barthel, A.; Schmoll, D.; Unterman, T. G. *Trends Endocrinol. Metab.* **2005**, *16* (4), str. 183-189.
- (74) Siddle, K. *Front. Endocrinol.* **2012**, *3* (2), str. 1-24.
- (75) Borgoño, C. A.; Zinman, B. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2012**, *41* (1), str. 1-24.
- (76) Bolli, G. B.; Di Marchi, R. D.; Park, G. D.; Pramming, S.; Koivisto, V. A. *Diabetologia* **1999**, *42* (10), str. 1151-1167.
- (77) Zaykov, A. N.; Mayer, J. P.; Dimarchi, R. D. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (6),

str. 425-439.

- (78) Rosenstock, J.; Schwartz, S. L.; Clark, C. M.; Park, G. D.; Donley, D. W.; Edwards, M. B. *Diabetes Care* **2001**, *24* (4), str. 631-636.
- (79) Havelund, S.; Plum, A.; Ribel, U.; Jonassen, I.; Vølund, A.; Markussen, J.; Kurtzhals, P. *Pharm. Res.* **2004**, *21* (8), str. 1498-1504.
- (80) Hirose, T. *Diabetol. Int.* **2016**, *7* (1), str. 16-17.
- (81) Varewijck, A. J.; Janssen, J. A. M. J. L. *Endocr. Relat. Cancer* **2012**, *19* (5), str. 63-75.
- (82) Vienberg, S. G.; Bouman, S. D.; Sørensen, H.; Stidsen, C. E.; Kjeldsen, T.; Glendorf, T.; Sørensen, A. R.; Olsen, G. S.; Andersen, B.; Nishimura, E. *Biochem. J.* **2011**, *440* (3), str. 301-308.
- (83) Glendorf, T.; Stidsen, C. E.; Norrman, M.; Nishimura, E.; Anders R. Sørensen, Kjeldsen, T. *PLoS One* **2011**, *6* (5), :e20288.
- (84) Andersen, M.; Nørgaard-Pedersen, D.; Brandt, J.; Pettersson, I.; Slaaby, R. *PLoS One* **2017**, *12* (6), str. 1-14.
- (85) Víková, J.; Collinsová, M.; Kletvíková, E.; Budšínský, M.; Kaplan, V.; Záková, L.; Veverka, V.; Hexnerová, R.; Aviñó, R. J. T.; Straková, J.; Selicharová, I.; Vank, V.; Wright, D. W.; Watson, C. J.; Turkenburg, J. P.; Brzozowski, A. M.; Jiráček, J. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), str. 1-12.
- (86) Žáková, L.; Barth, T.; Jiráček, J.; Jana Barthová, A.; Zórad, Š. *Biochemistry* **2004**, *43* (8), str. 2323-2331.
- (87) Jiráček, J.; Záková, L.; Antolíková, E.; Watson, C. J.; Turkenburg, J. P.; Dodson, G. G.; Brzozowski, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (5), str. 1966-70.
- (88) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), str. 2952-3015.
- (89) Fields, G. B.; Noble, R. L. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35* (3), str. 161-214.
- (90) Scapin, G.; Dandey, V. P.; Zhang, Z.; Prosser, W.; Hruza, A.; Kelly, T.; Mayhood, T.; Strickland, C.; Potter, C. S.; Carragher, B. *Nature* **2018**, *556* (7699), str. 122-125.

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
----------------------------	----------	-----------------	----------