

## BIOSYNTÉZA, SEKRECE A DEGRADACE INSULINU

LENKA ŽÁKOVÁ a JIŘÍ JIRÁČEK

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo  
nám. 2, 166 10 Praha 6  
jiracek@uochb.cas.cz

Došlo 31.3.05, přijato 2.5.05.

Klíčová slova : insulin, biosyntéza, regulace, degradace

### Obsah

1. Úvod
2. Biosyntéza insulinu
3. Genová regulace
4. Regulace sekrece
5. Degradace insulinu
6. Závěr

### 1. Úvod

Insulin je globulární protein o relativní molekulové hmotnosti cca 6000 Da, který se skládá ze dvou polypeptidových řetězců A a B stabilizovaných dvěma interchinárními disulfidickými můstky. Třetí intrachinární disulfidický můstek je v řetězci A. Interchinární disulfidické můstky se nacházejí mezi cysteiny A7 a B7 a mezi A20 a B19, intrachinární disulfidický můstek spojuje cysteiny A6 a A11 (obr. 1). Řetězec A má spíše kyselý charakter a je tvořen 21 aminokyselinami, řetězec B je naopak spíše bazický a tvoří jej 30 aminokyselin. Insulin produkovaný  $\beta$ -buňkami pankreatu je jedním z klíčových hormonů organismu a ovlivňuje řadu důležitých metabolických pochodů, přičemž mezi nejdůležitější patří regulace vstupu molekul glukosy do buňky. Porucha insulinové sekrece či působení insulinu je spojeno se závažnými klinickými projevy – nejčastěji s onemocněním diabetes mellitus 1. a 2. typu.

Primární struktura byla vyřešena v první polovině 50. let (cit.<sup>1,2</sup>), sekundární a terciární struktura byla určena na konci šedesátých let<sup>3,4</sup>. Charakteristická, evolučně velmi konzervovaná terciární struktura insulinu, vytvořená během biosyntézy a formování molekuly, je krucíálně důležitá pro jeho biologickou aktivitu. Při studiu biosyntézy se zjistilo, že insulin vzniká z jednořetězcového prekurzoru, ve kterém se vysoce efektivním způsobem vytváří správné propojení disulfidických můstků, a tím i pozdější terciární struktura hormonu<sup>5</sup>. Později bylo prokázáno, že model jednořetězcového prekurzoru je společný i pro mnoho dalších peptidových hormonů a neuropeptidů<sup>6</sup>. Příkladem může být proopiomelanokortin (POMC), ze kterého vzniká několik biologicky aktivních peptidů<sup>7</sup>.

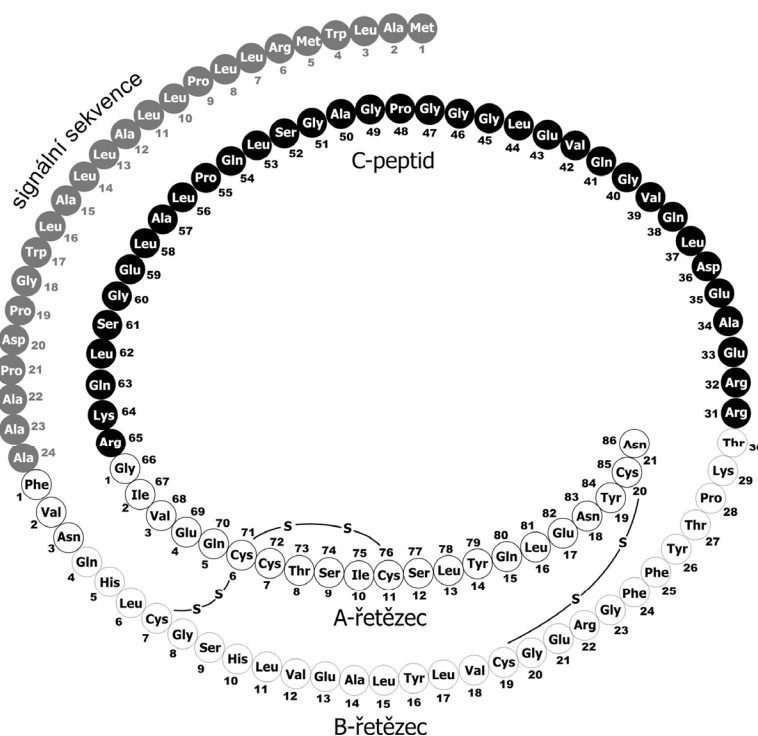
### 2. Biosyntéza insulinu

Insulin je syntetizován v  $\beta$ -buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu.  $\beta$ -Buňky, stejně jako všechny buňky secernující proteiny, obsahují drsné endoplasmatické retikulum a tvoří vezikuly (váčky) určené pro skladování proteinů.  $\beta$ -Buňky mají ještě jeden důležitý rys – u téměř všech živočichů jsou tyto buňky velice bohaté na zinek a vápník.

Biosyntéza insulinu (obr. 2) začíná na ribosomech drsného endoplasmatického retikula (RER), kde dochází k translaci preproinsulinu. Preproinsulin je prvotním prekurzorem insulinu, je to 12 kDa velká jednořetězcová molekula, která se skládá z 9 kDa proinsulinu, kterému na *N*-konci předchází 24 aminokyselin dlouhá tzv. signální sekvence<sup>8</sup> (obr. 1). Signální sekvence usnadňuje transfer vznikajícího peptidu přes dvojvrstvou membránu do lumen endoplasmatického retikula. V signální sekvenci je množství hydrofobních aminokyselin, které jsou zapojeny do řady molekulárních interakcí nutných k této translokaci. Během translokace nebo těsně po ní dochází k odštěpení signální sekvence signální peptidasou, specifickou membránovou proteasou umístěnou na vnitřní straně RER (cit.<sup>9</sup>). Signální sekvence je následně v RER rychle degradována. Vzniklý proinsulin je pro další zpracování transportován v membránových váčcích, které protein chrání před cytoplasmatickým prostředím buňky směrem k cisternám Golgiho aparátu (GA).

Proinsulin se skládá ze tří částí; *N*-terminální část začíná *N*-koncem B-řetězce insulinu, následuje tzv. C-peptid obsahující 26–31 aminokyselin a molekula končí A-řetězcem insulinu. Savčí proinsulin má od 78 (psí) do 86 (lidský, koňský, potkaní) aminokyselin. Rozdíl ve velikosti je vždy způsoben délkou vmezeřeného C-peptidu<sup>10</sup>. Teoreticky není nutné, aby délka vmezeřeného C-peptidu byla 26–31 aminokyselin. Z výzkumů vyplývá, že pro správnou terciární strukturu proinsulinu a tudíž i insulinu je zapotřebí minimální délka spojovacího peptidu 5–8 aminokyselin<sup>11</sup>. C-Peptid, který je společně s insulinem vylučován do krevního řečiště v ekvivalentním množství, má na rozdíl od obou dosti konzervovaných řetězců insulinu velkou variabilitu v aminokyselinovém složení. To naznačuje, že C-peptid nemá pravděpodobně žádnou fyziologickou funkci vně pankreatu, i když se o této otázce stále vedou diskuse<sup>12</sup>.

Po translokaci a odštěpení signálního peptidu se molekula proinsulinu spontánně rychle složí do správné konformace a vytvoří disulfidické můstky, a tak se utvoří správná terciární struktura molekuly, která je transportována do GA pro další zpracování. Proinsulin je transportován v malých membránových váčcích z *cis* cistern do *trans* cistern GA, kde se proinsulin koncentruje v sekrečních granulích pučících z GA. Golgiho aparát hraje nezbytnou



Obr. 1. Sekvence a organizace řetězců v preproinsulinu (celá sekvence), proinsulinu (bílá a černá) a insulinu (bílá); uvedeno je číslování aminokyselin signální sekvence, i proinsulinu i insulinu

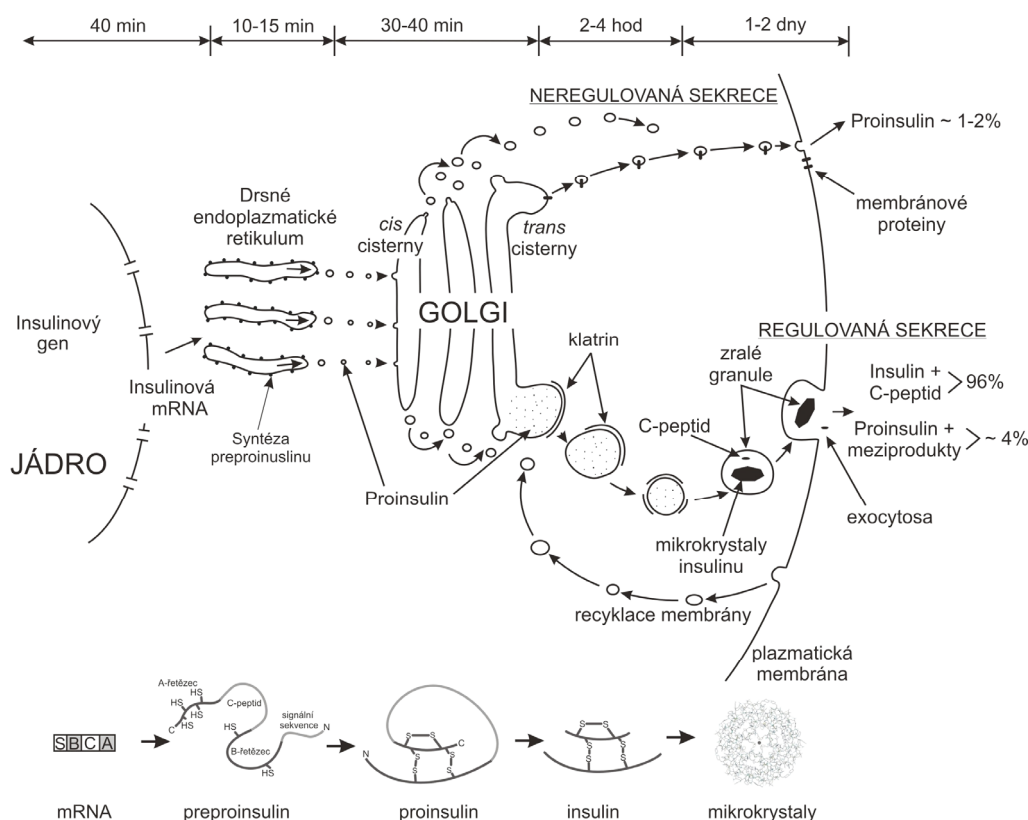
roli při zpracování a třídění proteinů ve všech sekrečních buňkách<sup>13</sup>. Sestává se z několika částí: v blízkosti RER jsou *cis* cisterny GA, které přecházejí přes *mid* cisterny GA až po *trans* cisterny GA, kde jsou prohormony štěpeny jejich proteasami a vznikají sekreční granule<sup>14</sup>.

Konverze proinsulinu začíná v *trans* cisternách GA a pokračuje v nově vytvořených sekrečních granulích. Proces trvá několik hodin, během kterých sekreční granule v cytosolu dozrají a jsou schopné sekrece insulinu. Nově vytvořené sekreční granule jsou charakteristické mnohem nižší hustotou svého obsahu než granule zralé.

Cytosolická část *trans* cisteren GA v místech, kde začínají pučet membránové granule s proinsulinem, bývá často pokryta klatrinem<sup>15</sup>. Klatrin je bílkovina, která částečně pokrývá i nezralé sekreční granule a postupně mizí se stupněm jejich zrání. Při spojení granulí s buněčnou membránou se již na povrchu granulí nevyskytuje<sup>16</sup>. V pankreatických  $\beta$ -buňkách jsou klatrinem pokryté nezralé granule mírně kyselé. V takových granulích je velké množství proinsulinu a málo insulinu. Jak granule dozrávají, stávají se více kyselé, což umožňuje aktivaci proteas uskutečňujících konverzi proinsulinu na insulin<sup>17</sup>. Současně s procesem konverze mizí pokrytí klatrinem. Ač se původně předpokládalo, že klatrin má hlavní význam při formování sekrečních granulí nebo při regulaci konverze proinsulinu či regulaci exocytosis, nyní se předpokládá, že jeho hlavní funkce spočívá ve zbavení zralých granulí konvertujících enzymů<sup>18</sup>.

Proinsulin v sekrečních granulích vytváří rozpustné hexamery, kdy je šest molekul proinsulinu koordinováno okolo zinečnatých iontů<sup>19</sup>. Bylo prokázáno, že proinsulin má 5× vyšší schopnost vázat zinek než insulin<sup>20</sup>. Nicméně existuje několik druhů živočichů, jako je morče, nutrie a i jiní hlodavci<sup>21</sup> a také např. ryba sliznatka<sup>22</sup>, kteří díky tomu, že v pozici B10 nemají histidin, potřebný pro vazbu zinku během agregace, nejsou schopni vytvářet hexamery proinsulinu nebo insulinu. Přítomnost zinečnatých iontů a stabilita hexameru naznačuje, že hexamerické uspořádání je s velkou pravděpodobností zachováno během celého procesu konverze. Pozice, kde dochází k odštěpení *N*-konce A-řetězce a *C*-konce B-řetězce od C-peptidu jsou stejně dobře exponovány v hexameru jako v monomeru, ale v hexameru jsou méně flexibilní<sup>23</sup>.

Ve středu zrajících granulí se vytváří houstnoucí centrální jádro, ve kterém konvertovaný hexamerní insulin vytváří mikrokristaly<sup>24</sup>. Krystalizaci insulinu napomáhá optimální hodnota pH uvnitř sekrečních granulí, která se pohybuje okolo 5,0–5,5 (cit.<sup>25</sup>). Uprostřed zralých granulí jsou mikrokristaly insulinu obklopené volně se pohybujícím odštěpeným C-peptidem. U živočichů, jejichž insuliny nejsou schopny vytvářet hexamery, se insulin nevyskytuje ve formě mikrokristalů, ale ve formě amorfního precipitátu<sup>21,23</sup>. Přítomnost krystalů v biologických procesech je nezvyklá a lze předpokládat, že má svou funkci. Jednou z těchto funkcí může být lepší ochrana krystalického insulinu před degradujícími enzymy. Další funkcí může být



Obr. 2. **Biosyntéza a sekrece insulinu v  $\beta$ -buňkách pankreatu**; v horní části obrázku je znázorněna časová závislost a v dolní části schéma biosyntézy od mRNA po mikrokristaly hexamerního insulinu (upraveno podle<sup>33,85</sup>)

snaha o úplnou konverzi hexamerního proinsulinu v insulin. Hotový insulin na rozdíl od proinsulinu krystalizuje, a to pomáhá výborné efektivitě konverze, která je až 95 % (cit.<sup>19</sup>). Tato teorie ovšem nebyla zatím ověřena<sup>26</sup>.

Všechny známé proinsuliny mají pár basických aminokyselin spojujících C-peptid s řetězcí insulinu<sup>27</sup>. C-Konec B-řetězce a N-konec C-peptidu spojuje nejčastěji dipeptid Arg-Arg a C-konec C-peptidu s N-koncem A-řetězce spojuje dipeptid Lys-Arg. K vyštěpení C-peptidu a konečné konverzi proinsulinu na insulin je zapotřebí dvou enzymů<sup>28</sup>. Jedním z nich je endopeptidasa se specifitou podobnou trypsinu, tzv. „trypsin-like“ enzym, který štěpí proinsulin za páry basických aminokyselin, tj. u lidského proinsulinu za Arg32 a za Arg65 (obr. 1). Druhým enzymem je exopeptidasa se specifitou podobnou karboxypeptidase B, tzv. „karboxypeptidase B-like“ enzym, která odstraňuje z C-konce B-řetězce a C-konce C-peptidu dvě basické aminokyseliny, v případě konverze lidského proinsulinu aminokyseliny Arg31, Arg32 a Lys64, Arg65 (cit.<sup>25</sup>). Tato exopeptidasa byla původně objevena v několika neuroendokrinních tkáních, a proto může nést i označení karboxypeptidasa H<sup>29</sup>, enkefalin konvertasa, či více užívané karboxypeptidasa E (CPE)<sup>30</sup>.

Během konverze proinsulinu na insulin se vytvářejí dva meziprodukty, a to proinsulin s vyštěpeným aminoky-

selinami Arg31 a Arg32 (des-31,32-proinsulin) nebo proinsulin s vyštěpenými aminokyselinami Lys64 a Arg65 (des-64,65-proinsulin) (obr. 1), přičemž poměr obou meziproduktů je 60–70 % des-64,65-proinsulinu a 30–40 % des-31,32-proinsulinu<sup>31</sup>. K transportu proinsulinu z RER, přes GA až do sekrečních granulí je zapotřebí energie, ale vlastní proteolytická konverze proinsulinu na insulin je děj nezávislý na dodané energii<sup>32</sup>.

V prostředí sekrečních granulí jsou hexamery insulinu velice stálé. Jestliže jsou ale vyplaveny do krevního řečiště, musí insulin přejít z pH okolo 5,5 (sekreční granule) do pH 7,4 (krev). V hexameru je šest glutamových kyselin v pozici B13 koordinováno okolo centra hexameru a pomáhají vzájemnými interakcemi udržovat jeho stabilitu, která je největší okolo pH 6. V krvi jsou tyto interakce nestabilní, protože dochází k deprotonaci karboxylu, a tím k ztrátě koordinace okolo zinečnatých iontů. To způsobí rozpad krystalů v krevním séru<sup>19</sup>.

Insulin je secernován z  $\beta$ -buňek pankreatu exocytosou. Při tomto procesu zralé granule migrují k vnější membráně podél mikrotubulární sítě uvnitř buněk. V blízkosti buněčné membrány se mikrotubuly spojují s mikrofilamenty, jež bezprostředně přiléhají k buněčné membráně. Jakmile sekreční granule doputují k buněčné membráně, dojde k splynutí jejich membrán a dojde k vylití obsa-

hu granulí ven z buňky. Exocytosa je děj závislý na energii a je řízena zejména hladinou glukosy v krvi.

Malé množství proinsulinu, okolo 1–2 %, je uvolněno z  $\beta$ -buněk tzv. neregulovanou sekrecí, tj. proinsulin uvolňovaný v malých váčcích vytvořených v různých částech Golgiho aparátu (obr. 2).

Ačkoliv insulin i jeho prekurzor proinsulin mají různé veliké molekuly, jsou si podobné v mnoha vlastnostech, jako jsou schopnost agregace, isoelektrický bod, rozpustnost či schopnost reakce s protilátkami proti insulinu<sup>33</sup>. Biologický poločas proinsulinu je okolo 20 min, insulinu okolo 5 min (cit.<sup>34</sup>). Přes podobné vlastnosti je biologická aktivita proinsulinu velice nízká, 3–5 % biologické aktivity insulinu. Takto nízká aktivita je způsobena tím, že vmezeřený C-peptid zabraňuje insulinu přejít do své aktivní konformace, která vyžaduje vysokou flexibilitu C-konce B-řetězce a jeho oddálení od N-konce A-řetězce<sup>35</sup>. N-Konec A-řetězce, který je v proinsulinu vzdálen od C-konce B-řetězce pouze 8 Å tak nemá možnost reagovat s insulinovým receptorem a spustit tak kaskádu signalizačních dějů vedoucích ke vstupu molekul glukosy do nitra insulinsenzitivní buňky. Přehledný článek o problematice interakce insulinu s jeho receptorem jsme publikovali v tomto časopise v roce 2002 (cit.<sup>36</sup>).

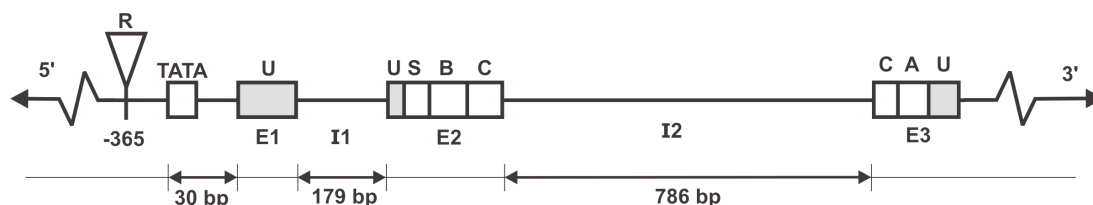
### 3. Genová regulace

Transkripce insulinového genu v  $\beta$ -buňkách pankreatu je regulována specifickými variabilními sekvencemi DNA lokalizovanými na 5' konci genu. Rozpoznáním těchto specifických DNA úseků proteinovými faktory přítomnými pouze v  $\beta$ -buňkách pankreatu se spustí selektivní transkripce genu.

Insulinový gen byl poprvé charakterizován v roce 1977 (cit.<sup>37</sup>). Od té doby byly charakterizovány insulinové geny různých živočišných druhů. Většina živočišných druhů má pouze jednu kopii genu pro insulin<sup>37,38</sup>, obsahující 3 exony oddělené 2 introny (obr. 3). Potkani a myši mají dva různé geny pro insulin, jež jsou si, vyjma chybějícího druhého intronu u jednoho z nich, podobné. U myši jsou oba geny lokalizované na dvou chromosomech, kdežto potkan má oba geny na jednom chromosome vzdálené od sebe přibližně 100 000 kb (cit.<sup>39</sup>). Lidský insulinový gen je

umístěn na krátkém raménku chromozomu 11 v regionu p15 (cit.<sup>40</sup>), je veliký asi 19 kb a obsahuje 1430 párů bází (bp). Genu pro insulin na chromosome předchází gen kódující tyrosinhydroxylasu ve vzdálenosti 2,7 kb a za ním ve vzdálenosti 1,6 kb následuje gen kódující insulin-like growth faktor II (IGF-II)<sup>41</sup>.

Sekvenční porovnání mezi různými geny kódujícími insulin u obratlovců ukazují, že mutace vedoucí k aminokyselinové substituci jsou mnohem méně časté u oblastí kódujících A a B řetězec než u oblastí kódujících C-peptid a signální sekvenci. Ačkoliv introny, které obsahuje insulinový gen, mají různou sekvenci a délku, která může být od 119 bp (morče a potkan – intron 1) až po více než 3500 bp (kuře – intron 2), umístění obou intronů je vysoce konzervováno. Intron 1 je umístěn v 5' ne-translatované části a intron 2 rozděluje sekvenci kódující aminokyseliny 6 a 7 v C-peptidu. Sekvence promotoru je lokalizovaná 22–24 bp před transkripčním startem a terminační signál je umístěn 20 nukleotidů před poly(A)-koncem mRNA. Gen pro lidský insulin má několik vlastností, které insulinové geny ostatních živočichů nemají. Jednou z těchto vlastností je unikátní repetitivní sekvence umístěná na 5' konci v pozici –365 sestávající se z různého počtu opakování 14–15 bp, které sice nemají vliv na expresi genu, ale mohou být užitečným ukazatelem pro genetické analýzy<sup>42</sup>. Dřívější studie porovnávaly přítomnost většího (třída 3) nebo menšího počtu (třídy 1 a 2) těchto opakování v souvislosti s výskytem diabetu a aterosklerózy. Ukázalo se, že lidé s alelami třídy 1 mají mnohem větší sklon k onemocnění diabetem typu I, a proto může tento úsek být důležitým genetickým příznakem u rizikových pacientů<sup>43</sup>. V průběhu let bylo identifikováno několik genetických mutací lidského genu pro insulin. Jedná se o neaktivní insuliny, které byly vždy nazvány podle místa nálezu těchto mutantů, a to insulin Los Angeles, insulin Chicago a insulin Wakayama<sup>44</sup>. Jedná se vždy o záměnu jedné aminokyseliny, v případě insulinu Chicago je to záměna PheB25 → LeuB25, v případě insulinu Los Angeles PheB24 → SerB24 a v případě insulinu Wakayama je to záměna ValA3 za LeuA3. Nízká biologická aktivita těchto mutantů je způsobena tím, že všechny substituce jsou v pozicích, které jsou přímo zodpovědné za vazbu insulinu na jeho receptor.



Obr. 3. **Struktura lidského insulinového genu** (upraveno podle<sup>44</sup>); gen obsahuje 3 exony E1–E3 a dva introny I1 a I2. Trojúhelníkem s označením R je na 5' konci označeno umístění unikátní repetitivní sekvence 14–15 opakování. U je označení pro ne-translatovanou část genu, S označuje sekvenci kódující signální sekvenci, B a A části kódující insulinové řetězce a C část kódující C-peptid



Mechanismus, jakým cAMP působí, byl dlouho nejasný, ale nakonec se prokázalo, že cAMP ovlivňuje hlavně tok vápenatých iontů. Zvýšená hladina cAMP zvýší vtok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů dovnitř buňky a také cAMP ovlivňuje distribuci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů uvnitř buňky ve prospěch jejich akumulace v cytosolu. Vtok vápenatých iontů do buněk iniciuje jednak fosforylaci proteinů a jednak přímo ovlivňuje  $\text{K}^+$  kanály, což vede k depolarizaci membrány, jak bylo diskutováno výše. Role cAMP je tedy hlavně v ovlivňování koncentrace vápenatých iontů uvnitř buňky tak, aby tyto ionty umožnily sekreci insulinu do krevního řečiště.

Hladina cAMP je regulována enzymy adenylátcyklasou a fosfodiesterasou. Adenylátcyklasa, lokalizovaná na plasmatické membráně, je aktivována některými hormony, mezi jinými také antagonistou insulinu glukagonem. Je také aktivována kalmodulinem, který v tomto mechanismu hraje pozitivní zpětnou vazbu po aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$  ionty (obr. 4). Při velmi vysokých koncentracích  $\text{Ca}^{2+}$  iontů kalmodulin naopak zvyšuje aktivitu fosfodiesterasy, která inhibuje cAMP. Vápenaté ionty tedy ovlivňují hladinu cAMP, kdy jejich vyšší koncentrace prostřednictvím kalmodulinu zvyšují hladinu cAMP a naopak velmi vysoké koncentrace hladinu cAMP snižují<sup>45</sup>.

Adenylátcyklásový systém je úzce spjat s fosfoinositolovou kaskádou. Je již dobře známo, že některé složky potravy jsou schopny aktivovat fosfolipasu C, membránový enzym, který hydrolyzuje fosfoinositol-4,5-bisfosfát ( $\text{PIP}_2$ ) na fosfoinositol-1,4,5-trifosfát ( $\text{IP}_3$ ) a diacylglycerol (DAG). Ve vodě rozpustný  $\text{IP}_3$ , jako druhý posel difunduje k ER, z něhož uvolní do cytoplazmy  $\text{Ca}^{2+}$ . Méně polární DAG, který zůstane v plasmatické membráně, působí jako druhý posel na proteinkinasu C, která fosforyluje celou řadu různých proteinů, a tím mění jejich aktivitu<sup>45</sup>. Uvažuje se, že zatímco systém  $\text{Ca}^{2+}$  iontů jako spouštěčů insulinové sekrece je zodpovědný za první fázi insulinové sekrece, tak fosfoinositolový systém ovlivňuje její druhou fázi<sup>45</sup>. Jakákoliv porucha v jednotlivých kaskádách těchto kontrolních mechanismů se může podílet na vzniku diabetu či jiného závažného onemocnění.

Během glykolýzy a Krebsova cyklu mohou do děje vstupovat a zvyšovat tvorbu ATP i mastné kyseliny a L-aminokyseliny (např. leucin), a tím následně cestou aktivace adenylátcyklasy ovlivňovat vzestup intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  (cit.<sup>50</sup>) (obr. 4).

Glukosa také mimo jiné přímo stimuluje biosyntézu insulinu podnícením translace mRNA<sup>51</sup>. Insulinová mRNA je normálně velmi stabilní, s biologickým poločasem okolo 30 h. Zvýšení hladiny krevní glukosy zvyšuje její poločas přibližně třikrát, a to společně s vystupňováním transkripce má za následek zvýšení hladiny mRNA na dobu 48–72 h. Tento mechanismus vysoce navýší produkci insulinu<sup>52</sup> a je schopen reagovat na zvýšenou hladinu glukosy v rozmezí minut, přičemž důsledky této stimulace trvají několik hodin.

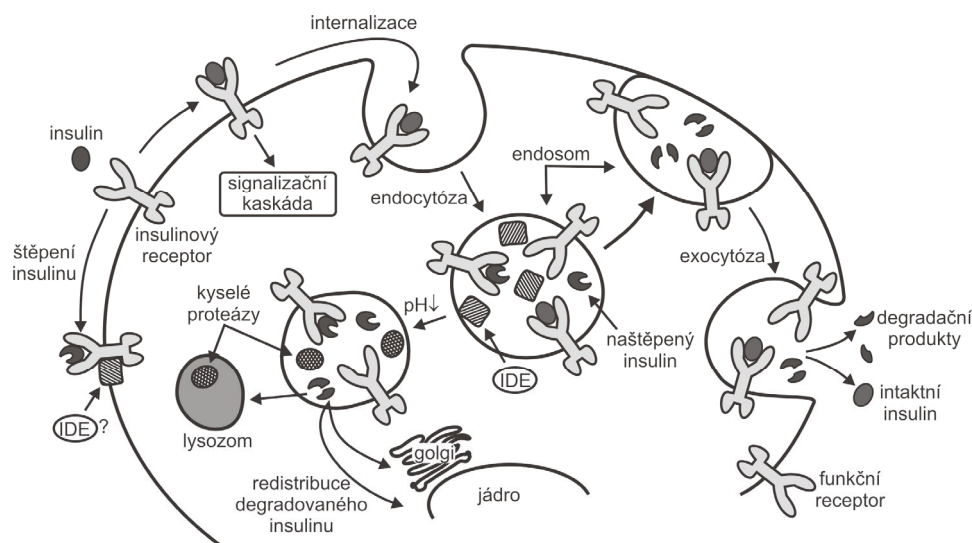
## 5. Degradace insulinu

Degradace insulinu je velmi složitý proces. Insulin, jak už bylo řečeno, má v krevní plazmě velmi krátký biologický poločas, který se pohybuje mezi 4–6 minutami. Takto krátký biologický poločas je důležitý pro velmi pohotovou regulaci hladiny krevní glukosy.

Asi před 50 lety bylo poukázáno na existenci enzymu s vysokou specifitou k degradaci insulinu. Byl nazván insulinasa<sup>53</sup>. Později byla ale existence insulinasy zpochybněna a prokázalo se, že jde o směs různých proteolytických enzymů. Později se ukázalo, že za majoritní degradaci insulinu je pravděpodobně zodpovědná pouze jediná proteasa, která může insulin štěpit bez nutnosti rozštěpení disulfidických můstků. Tento enzym se vyskytuje v mnoha tkáních<sup>54</sup> a za léta výzkumu v různých laboratořích dostal mnoho názvů od insulinasy, přes insulysin až po insulin proteasu (IP)<sup>55,56</sup>. Na konci 80. let se název ustálil na insulin degradujícím enzymu, se zkratkou IDE. Jedná se o metaloproteasu se  $\text{Zn}^{2+}$  v aktivním místě<sup>57</sup>. Insulin je substrát IDE s nejvyšší afinitou ( $K_m \sim 20$  nM), IDE ale může štěpit i mnoho jiných peptidů a proteinů, jako např. glukagon<sup>58</sup>, ANP (atrial natriuretic peptide)<sup>59</sup> a IGF-II (insulin-like growth factor II)<sup>60</sup>. IDE štěpí široké spektrum proteinů podobné velikosti a pro proteolýzu nevyžaduje specifickou aminokyselinovou sekvenci<sup>58</sup>. Předpokládá se, že IDE rozeznává specifickou terciární strukturu proteinů, tzn. že váže a degraduje pouze proteiny s vhodným prostorovým uspořádáním aminokyselin<sup>61,62</sup>. Plocha kontaktu IDE se substrátem je poměrně velká a zahrnuje značné množství interakcí. Tento enzym váže také IGF-I (insulin-like growth factor I), proinsulin, EGF (epidermal growth factor) s relativně vysokou afinitou, ale má velice nízkou schopnost tyto proteiny štěpit<sup>63</sup>. IDE byl identifikován v peroxisomech, v cytosolu<sup>63</sup>, v endosomech a částečně i na plasmatické membráně buněk<sup>64</sup>.

Druhým enzymem, který pravděpodobně hraje důležitou roli v insulinové degradaci je glutathion insulin transhydrogenasa (GIT)<sup>65</sup>, dnes nazývaná proteinová disulfidová isomerasa (PDI)<sup>66</sup>. Uplatnění tohoto enzymu v degradaci insulinu je stále diskutabilní<sup>67</sup>. Primární role PDI je při syntéze proteinů obsahujících disulfidové vazby. V endoplasmatickém retikulu PDI jako chaperon pomáhá těmto proteinům vytvořit správné disulfidové můstky a tím zaujmout správnou terciární strukturu<sup>68</sup>. V případě insulinu se naopak předpokládá, že PDI redukuje disulfidické můstky částečně proteolyticky štěpeného insulinu.

Primární místo insulinové degradace je v játrech, kde se metabolizuje přibližně 80 % cirkulujícího insulinu. Množství metabolizovaného insulinu je variabilní na aktuálních fyziologických či patofyziologických podmínkách. Druhé nejvýznamnější místo insulinové degradace jsou ledviny. Ty odbourávají téměř 50 % insulinu cirkulujícího v periferním oběhu. Nadto ledviny odbourávají okolo 50 % cirkulujícího proinsulinu a 70 % C-peptidu mechanismem



Obr. 5. Schéma degradace insulinu

glomerulární filtrace<sup>69</sup>. Třetí nejdůležitější tkáň pro vazbu a odbourávání je sval. K degradaci insulinu dochází i v adipocytech, fibroblastech nebo lymfocytech<sup>70–72</sup>. Některé tkáně mají schopnost nejen vázat a degradovat insulín, ale i uvolňovat ho intaktní zpět do cirkulace<sup>73</sup>.

Prvním krokem degradace insulinu je vazba hormonu na insulínový receptor umístěný na buněčné membráně<sup>74</sup> (obr. 5). Tato vazba spustí buněčnou odpověď, kterou je kaskáda signálních dějů, jejichž hlavním důsledkem je vstup molekul glukosy do nitra buňky. Tato vazba také spustí degradační proces insulinu. Insulínový receptor sám o sobě insulín nedegraduje, ale vystavuje ho působení IDE. Insulín se degraduje v naprosté většině případů navázaný na receptor. Podstatná část insulinu se degraduje po internalizaci insulínového receptoru s navázaným insulínem intracelulárně v endosomech. Ještě před internalizací se malá část navázaného insulinu zcela nebo částečně degraduje přímo na plasmatické membráně pravděpodobně také za přispění IDE, pro kterou je insulín navázaný na receptor výborným substrátem<sup>75</sup>. Určitá část insulinu se i z vnitřku buňky vrací nedotčená nebo částečně degradovaná zpět do krevního oběhu. Takovýto insulín se může znovu vázat na svůj receptor a ovlivňovat metabolismus glukosy<sup>76</sup>.

Po internalizaci insulínového receptoru s navázaným hormonem začíná degradace insulinu v endosomech. Internalizace je jednou z vlastností insulínového receptoru. Ten má v blízkosti membrány oblast nazvanou NPEY podle aminokyselinové sekvence, která je součástí všech internalizujících se receptorů. Přes přítomnost uvedené sekvence je hlavním požadavkem pro internalizaci fosforylace tyrosinových zbytků v intracelulární části receptoru<sup>77</sup>. Ačkoliv se dříve předpokládalo, že se internalizovaný insulín začíná degradovat po spojení endosomů s lysosomy, je nyní známo, že proces degradace začíná už v raných stádiích

tvorby endosomů<sup>78</sup>. Po vytvoření endosomů dojde v jejich nitru působením protonových pump k rychlému okyselení prostředí, což způsobí disociaci insulinu z receptoru. Degradací proces ale začíná už před okyselením endosomů působením IDE, která je v endosomech přítomna a vyžaduje neutrální prostředí<sup>79</sup>. Po okyselení se na degradaci začínají podílet kyselé proteázy<sup>80</sup>. V endosomech je odbouráno nejvýše 50 % insulinu<sup>81</sup>. Zbýlý insulín je transportován do jiných částí buňky, včetně jádra, cytosolu nebo lysosomů. Mechanismus, jakým insulín přechází do jiných buněčných organel, není znám, nicméně je i tento proces spojený s vnitrobuněčným působením IDE (cit.<sup>73</sup>).

Kyselé proteázy jsou pro úplnou degradaci insulinu nezbytné. V kyselém prostředí ( $\text{pH} \leq 6$ ) IDE ztrácí svou proteolytickou aktivitu a právě kyselé proteázy, které jsou aktivní po okyselení endosomů a jsou přítomny také v lysosomech, dokončují odbourání částečně naštěpeného insulinu. Mezi tyto proteázy patří tzv. endosomální kyselá insulinasa (EAI), o níž se předpokládá, že má na degradaci insulinu velký podíl<sup>63,80,82,83</sup>.

Místa insulinu primárně štěpená IDE už byla identifikována a jelikož IDE rozeznává insulín podle jeho terciární struktury, je většina štěpených míst na povrchu molekuly. Na počátku dochází pravděpodobně ke štěpení vazeb AlaB14-LeuB15, PheB24-PheB25 a PheB25-TyrB26. Dalšími štěpenými vazbami jsou SerB9-HisB10, HisB10-LeuB11, GluB13-AlaB14 a TyrB16-LeuB17. Poté dochází k redukci disulfidových vazeb, pravděpodobně enzymem PDI. Tím vznikne neporušený A-řetězec a několik fragmentů B-řetězce<sup>81,84</sup>. Téměř současně dochází ke štěpení A-řetězce mezi LeuA13 a TyrA14. Tato místa štěpení odpovídají specifitě metaloproteas pro velké alifatické nebo nepolární aminokyseliny.

V parenchymatických buňkách jater byla v endosomech prokázána vysoká aktivita EAI, jež může v těchto

buňkách působit místo IDE. I když jde o enzym, který není IDE příbuzný, není metaloproteasa a má pH optimum 4–4,5, místa štěpení jsou téměř identická s IDE (cit.<sup>82</sup>). EAI je některými autory ztotožňována s katepsinem D (cit.<sup>83</sup>). Insulinové fragmenty, ať už vzniklé působením IDE či kyselých proteas, jsou dále štěpeny různými proteolytickými systémy včetně lysosomů.

Dlouhou dobu byla diskutována role lysosomů v degradaci insulinu. Ačkoliv byly v lysosomech prokázány degradační produkty insulinu, soudilo se, že lysosomy nehrají v degradaci téměř žádnou roli. Je pravděpodobné, že částečně degradovaný insulin může být posléze v lysosomech dokonale rozštěpen<sup>73</sup>.

Abnormality v odbourávání a degradaci insulinu se odrážejí v různých patologických stavech, mezi něž patří např. diabetes 2. typu nebo obezita.

Bohužel, dodnes neexistují vysoce selektivní inhibitory IDE ani EAI (katepsinu D). Jejich použití *in vivo* by umožnilo další zajímavý výzkum role degradujících enzymů v metabolismu insulinu na hladinu glukosy v krvi a nelze vyloučit jejich případné terapeutické využití.

## 6. Závěr

Uplynulo již více než 80 let od objevu insulinu a jeho podání prvním pacientovi. V průběhu následujících desetiletí byla vyřešena struktura insulinu a připraveno několik analogů používaných dnes v klinické praxi. Bylo rovněž dosaženo významných objevů týkajících se mechanismu působení insulinu, jeho interakce s receptorem a následných vnitrobuněčných dějů vedoucích ke vstupu glukosy do buňky. Přes všechny tyto objevy a úspěchy stále představuje diabetes mellitus jednu z nejvýznamnějších civilizačních chorob, která je spojena s vysokou morbiditou a mortalitou. Studium sekrece insulinu, regulace jeho exprese, degradace a mechanismu působení proto stále je a v budoucnu bude velmi aktuálním tématem. V této práci jsme se pokusili shrnout poslední znalosti z těchto oblastí výzkumu a doufáme, že článek bude inspirací pro naši chemickou a biochemickou veřejnost.

*Tato práce byla podporována výzkumným záměrem Z4 055 0506.*

## LITERATURA

1. Ryle A. P., Sanger F., Smith L. F., Kitai R.: *Biochem. J.* 60, 541 (1955).
2. Sanger F.: *Nature* 171, 1025 (1953).
3. Adams M. J., Blundell T. L., Dodson E. J., Dodson G. G., Vijayan M., Baker E. N., Harding M. M., Hodgkin D. C., Rimmer B., Sheat S.: *Nature* 224, 491 (1969).
4. Peking Insulin Structure Group: *Peking Rev.* 40, 11 (1971).
5. Steiner D. F., Cunningham D., Spigelman L., Aten B.: *Science* 157, 697 (1967).
6. Douglass J., Civelli O., Herbert E.: *Annu. Rev. Biochem.* 53, 665 (1984).
7. Eipper B. A., Mains R. E.: *Endocr. Rev.* 1, 1 (1980).
8. Chan S. J., Keim P., Steiner D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 73, 1964 (1976).
9. Walter P., Gilmore R., Blobel G.: *Cell* 38, 5 (1984).
10. Steiner D. F., Docherty K., Carroll R.: *J. Cell. Biochem.* 24, 121 (1984).
11. Liu M., Ramos-Castaneda J., Arvan P.: *J. Biol. Chem.* 278, 14798 (2003).
12. Steiner D. F., Rubenstein A. H.: *Science* 277, 531 (1997).
13. Farquhar M. G., Palade G. E.: *J. Cell Biol.* 91, 77s (1981).
14. Steiner D. F., Quinn P. S., Chan S. J., Marsh J., Tager H. S.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 343, 1 (1980).
15. Orci L., Glick B. S., Rothman J. E.: *Cell* 46, 171 (1986).
16. Orci L., Halban P., Amherdt M., Ravazzola M., Vassalli J. D., Perrelet A.: *Cell* 39, 39 (1984).
17. Orci L., Halban P., Perrelet A., Amherdt M., Ravazzola M., Anderson R. G.: *J. Cell Biol.* 126, 1149 (1994).
18. Molinete M., Dupuis S., Brodsky F. M., Halban P. A.: *J. Cell Sci.* 114, 3059 (2001).
19. Dodson G., Steiner D.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 189 (1998).
20. De P. J., Galansino G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 501 (1966).
21. Blundell T. L., Dodson G. G., Hodgkin D. C., Mercola D. A.: *Adv. Protein Chem.* 26, 279 (1972).
22. Cutfield J. F., Cutfield S. M., Dodson E. J., Dodson G. G., Emdin S. F., Reynolds C. D.: *J. Mol. Biol.* 132, 85 (1979).
23. Emdin S. O., Dodson G. G., Cutfield J. M., Cutfield S. M.: *Diabetologia* 19, 174 (1980).
24. Michael J., Carroll R., Swift H. H., Steiner D. F.: *J. Biol. Chem.* 262, 16531 (1987).
25. Kemmler W., Steiner D. F., Borg J.: *J. Biol. Chem.* 248, 4544 (1973).
26. Carroll R. J., Hammer R. E., Chan S. J., Swift H. H., Rubenstein A. H., Steiner D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 8943 (1988).
27. Steiner D. F., Cho S., Oyer P. E., Terris S., Peterson J. D., Rubenstein A. H.: *J. Biol. Chem.* 246, 1365 (1971).
28. Docherty K., Carroll R. J., Steiner D. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 79, 4613 (1982).
29. Davidson H. W., Hutton J. C.: *Biochem. J.* 245, 575 (1987).
30. Fricker L. D.: *Annu. Rev. Physiol.* 50, 309 (1988).
31. Kemmler W., Peterson J. D., Steiner D. F.: *J. Biol. Chem.* 246, 6786 (1971).
32. Orci L., Ravazzola M., Amherdt M., Madsen O., Vassalli J. D., Perrelet A.: *Cell* 42, 671 (1985).
33. Steiner D. F., v knize: *Handbook of Experimental Pharmacology* (Cuatrecasas, P. and Jacobs, S., ed.). Springer-Verlag, Berlin 1990.
34. Rubenstein A. H., Steiner D. F.: *Annu. Rev. Med.* 22, 1 (1971).

35. Dodson E. J., Dodson G. G., Hubbard R. E., Reynolds C. D.: *Biopolymers* 22, 281 (1983).
36. Huml K., Klasová L., Barthová J.: *Chem. Listy* 96, 698 (2002).
37. Ullrich A., Shine J., Chirgwin J., Pictet R., Tischer E., Rutter W. J., Goodman H. M.: *Science* 196, 1313 (1977).
38. Bell G. I., Pictet R. L., Rutter W. J., Cordell B., Tischer E., Goodman H. M.: *Nature* 284, 26 (1980).
39. Soares M. B., Schon E., Henderson A., Karathanasis S. K., Cate R., Zeitlin S., Chirgwin J., Efstratiadis A.: *Mol. Cell Biol.* 5, 2090 (1985).
40. Owerbach D., Bell G. I., Rutter W. J., Brown J. A., Shows T. B.: *Diabetes* 30, 267 (1981).
41. Bell G. I., Gerhard D. S., Fong N. M., Sanchez-Pescador R., Rall L. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82, 6450 (1985).
42. Bell G. I., Selby M. J., Rutter W. J.: *Nature* 295, 31 (1982).
43. Permutt M. A., Rotwein P., Andreone T., Ward W. K., Porte D., Jr.: *Diabetes* 34, 311 (1985).
44. Tager, H. S., v knize: *Handbook of Experimental Pharmacology* (Cuatrecasas P. and Jacobs S., ed.). Springer-Verlag, Berlin 1990.
45. Prentki M., Matschinsky F. M.: *Physiol. Rev.* 67, 1185 (1987).
46. Hedekov C. J.: *Physiol. Rev.* 60, 442 (1980).
47. Malaisse W. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 522, 284 (1988).
48. Malaisse W. J., Orci L.: *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 9, 112 (1979).
49. Malaisse W. J., Garcia-Morales P., Dufrane S. P., Sener A., Valverde I.: *Endocrinology* 115, 2015 (1984).
50. Bartoš, V., Pelikánová, T., v knize: *Praktická diabetologie*. Maxdorf, Praha 2003.
51. Itoh N., Okamoto H.: *Nature* 283, 100 (1980).
52. Rabinovitch A., Blondel B., Murray T., Mintz D. H.: *J. Clin. Invest.* 66, 1065 (1980).
53. Mirsky I. A., Perisutti G.: *J. Biol. Chem.* 228, 77 (1957).
54. Duckworth, W. C., v knize: *Handbook of Experimental Pharmacology* (Cuatrecasas, P. and Jacobs, S., ed.). Springer-Verlag, Berlin 1990.
55. Burghen G. A., Kitabchi A. E., Brush J. S.: *Endocrinology* 91, 633 (1972).
56. Duckworth W. C., Heinemann M. A., Kitabchi A. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 69, 3698 (1972).
57. Ebrahim A., Hamel F. G., Bennett R. G., Duckworth W. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1398 (1991).
58. Authier F., Posner B. I., Bergeron J. J.: *Clin. Invest. Med.* 19, 149 (1996).
59. Muller D., Baumeister H., Buck F., Richter D.: *Eur. J. Biochem.* 202, 285 (1991).
60. Roth R. A., Mesriow M. L., Yokono K., Baba S.: *Endocr. Res.* 10, 101 (1984).
61. Hamel F. G., Gehm B. D., Rosner M. R., Duckworth W. C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1338, 207 (1997).
62. Duckworth W. C., Hamel F. G., Peavy D. E., Liepnies J. J., Ryan M. P., Hermodson M. A., Frank B. H.: *J. Biol. Chem.* 263, 1826 (1988).
63. Duckworth W. C.: *Endocr. Rev.* 9, 319 (1988).
64. Hamel F. G., Bennett R. G., Duckworth W. C.: *Endocrinology* 139, 4061 (1998).
65. Katzen H. M., Tietze F.: *J. Biol. Chem.* 241, 3561 (1966).
66. Bjelland S., Wallevik K., Kroll J., Dixon J. E., Morin J. E., Freedman R. B., Lambert N., Varandani P. T., Nafz M. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 747, 197 (1983).
67. Assoian R. K., Tager H. S.: *J. Biol. Chem.* 257, 9078 (1982).
68. Freedman R. B.: *Cell* 57, 1069 (1989).
69. Rabkin R., Ryan M. P., Duckworth W. C.: *Diabetologia* 27, 351 (1984).
70. Jochen A., Hays J., Lee M.: *J. Cell Physiol.* 141, 527 (1989).
71. Stentz F. B., Harris H. L., Kitabchi A. E.: *Endocrinology* 116, 926 (1985).
72. Buffington C. K., El-Shiekh T., Kitabchi A. E., Matteri R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 412 (1986).
73. Duckworth W. C., Bennett R. G., Hamel F. G.: *Endocr. Rev.* 19, 608 (1998).
74. Terris S., Steiner D. F.: *J. Biol. Chem.* 250, 8389 (1975).
75. Seta K. A., Roth R. A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 167 (1997).
76. Levy J., Olefsky J. M.: *Endocrinology* 120, 450 (1987).
77. Backer J. M., Kahn C. R., Cahill D. A., Ullrich A., White M. F.: *J. Biol. Chem.* 265, 16450 (1990).
78. Hamel F. G., Posner B. I., Bergeron J. J., Frank B. H., Duckworth W. C.: *J. Biol. Chem.* 263, 6703 (1988).
79. Hamel F. G., Mahoney M. J., Duckworth W. C.: *Diabetes* 40, 436 (1991).
80. Authier F., Rachubinski R. A., Posner B. I., Bergeron J. J.: *J. Biol. Chem.* 269, 3010 (1994).
81. Seabright P. J., Smith G. D.: *Biochem. J.* 320, 947 (1996).
82. Authier F., Danielsen G. M., Kouach M., Briand G., Chauvet G.: *Endocrinology* 142, 276 (2001).
83. Authier F., Metioui M., Fabrega S., Kouach M., Briand G.: *J. Biol. Chem.* 277, 9437 (2002).
84. Duckworth W. C., Garcia J. V., Liepnies J. J., Hamel F. G., Hermodson M. A., Frank B. H., Rosner M. R.: *Biochemistry* 28, 2471 (1989).
85. Dodson G. G., Dodson E. J., Turkenburg J. P., Bing X.: *Biochem. Soc. Trans.* 21, 609 (1993).

**L. Žáková and J. Jiráček** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Biosynthesis, Secretion and Degradation of Insulin**

Insulin was isolated and used as a therapeutic agent for the first time more than 80 years ago. In subsequent decades, the structure of insulin was fully resolved and several insulin analogues were introduced in clinical prac-

tice. Important discoveries were made concerning the mechanism of action of insulin, its interaction with receptors, and insulin-dependent cellular processes. Despite all these successes, diabetes mellitus remains one of the most important human diseases with high morbidity and mortality. Therefore, studies of insulin secretion, regulation of its expression, and mechanism of action still remain important topics. The review summarizes the latest knowledge in the field.



Katedra analytické chemie PŘF  
Univerzity Palackého v Olomouci  
ve spolupráci  
s Českou společností chemickou,  
firmou Merck, s.r.o. Praha  
a firmou Waters, s.r.o. Praha



pořádá ve dnech

**30. - 31. ledna 2006**

### **SOUTĚŽ MLADÝCH ANALYTICKÝCH CHEMIKŮ “o cenu firmy Merck”**

Vážené kolegyně a kolegové,

dovolujeme si Vás pozvat na 9. ročník soutěže o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie, která se uskuteční ve dnech **30. a 31. ledna 2006** na půdě katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Veškeré informace o soutěži včetně předběžné přihlášky naleznete na:

<http://ach.upol.cz/soutez>

Předběžné přihlášky na soutěž se přijímají do **12.12.2005**. Závaznou přihlášku spolu s tří až pěti stránkovým abstraktem očekáváme do **8.1.2006**.

Těšíme se na Vaši účast

*Juraj Ševčík a Jan Petr za organizační výbor*