

INTERAKCE INZULÍNU S INZULÍNOVÝM RECEPTOREM

KAREL HUML^a, LENKA KLASOVÁ^{a,b}
a JANA BARTHOVÁ^b

^aÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^bKatedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 6, 128 00 Praha 2
e-mail: klasova@uochb.cas.cz

Došlo dne 31.VII.2001

Klíčová slova: inzulín, inzulínový receptor, interakce

Obsah

1. Úvod
2. Molekula inzulínu
3. Inzulínový receptor
4. Interakce inzulín/inzulínový receptor
5. Typy inzulínu a jejich účinnost
6. Závěr

1. Úvod

Neschopnost syntézy inzulínu nebo dysfunkce inzulínového receptoru v těle savců způsobují cukrovku a z ní vyplývající řadu dalších onemocnění. V populaci České republiky touto chorobou trpí asi 640 000 obyvatel, z nichž kolem 100 000 si musí inzulín aplikovat injekčně. Přibližně dalších 600 000 jsou tzv. skrytí diabetici, kteří dosud nebyli diagnostikováni. Od roku 1975 se tak v ČR počet onemocnění cukrovkou zdvojnásobil. Ve vyspělých zemích se v následujících 25 letech předpokládá nárůst této choroby o 42 %, v rozvojových zemích pak dokonce o 170 %. Cukrovka se tak stala civilizační chorobou, jejíž výskyt má charakter epidemie¹.

Proteinový hormon inzulín působí jako efektorová molekula, která aktivuje inzulínový receptor (IR). IR je alosterický enzym, pařící ke skupině receptorů s endogenní tyrosinkinázovou aktivitou (TK) (cit.²). Nedostatečná tvorba inzulínu je podstatou onemocnění diabetes mellitus I. typu, zatímco dysfunkce inzulínového receptoru a postreceptorových reakcí vede k diabetu mellitu II. typu, kterým trpí naprostá většina diabetiků. Tento typ diabetu závisí víceméně na věku, životěsprávě a způsobu života. Obezita, věk nad 60 let a hypertenze jsou hlavní rizikové faktory a příčiny vzniku diabetu II. typu.

Pro úspěšnou léčbu tohoto závažného onemocnění je zapotřebí poznat mechanismus interakce inzulínu s příslušným receptorem na molekulární úrovni. V posledních desetiletích byla navržena řada strukturních modelů této interakce^{3,4}, včetně modelů vysvětlujících negativní kooperativitu interakce inzulín/IR (afinita receptorů klesá s jejich vzrůstající obsaze-

ností)^{5,6}. K tomu přispěl nejen rozsáhlý výzkum biochemický, ale i metody rentgenostrukturní analýzy, elektronové mikroskopie a NMR, které dovolují popsat trojrozměrnou strukturu molekul s rozlišením jednotlivých atomů.

V případě inzulínu máme k dispozici terciární struktury většího počtu přírodních inzulínů i jejich analogů. O struktuře IR, vzhledem k její komplikovanosti, existuje méně informací. Přesto se v posledních dvou letech dosáhlo značného pokroku, zejména spojením výsledků experimentálních metod a počítačového modelování, které dávají relativně podrobný obraz o stavbě IR i jeho komplexu s inzulínem⁷⁻⁹.

V předložené práci je podán stručný obraz trojrozměrné struktury inzulínu, jeho receptoru a jejich interakce. Článek tak navazuje na publikaci o struktuře inzulínové molekuly v tomto časopise¹⁰.

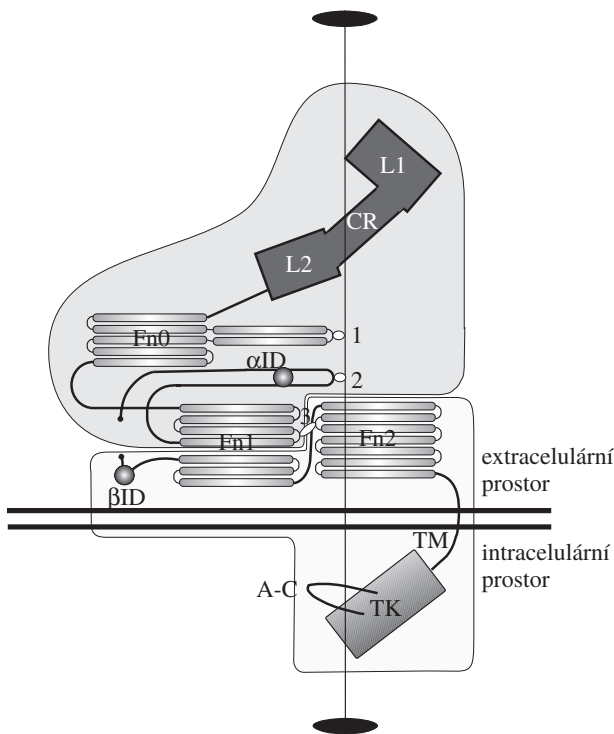
2. Molekula inzulínu

Molekula lidského inzulínu (molekulová hmotnost 5806 Da) se skládá ze dvou řetězců, kde řetězec A obsahuje 21 a řetězec B 30 aminokyselinových zbytků (dále jen zbytků). V krvi se inzulín v koncentracích 10^{-11} až 10^{-8} M vyskytuje ve formě monomeru^{11,12} s poločasem života 5 minut (cit.¹³), ve vyšších koncentracích je molekula inzulínu ve formě hexameru. Mikrokrystaly složené z pravidelných hexamerů představují depotní formu inzulínu. Hexamer inzulínu je tvořen třemi dimery inzulínu koordinovanými ionty Zn^{2+} (cit.^{10,11,14}).

Krystalický inzulín se vyskytuje v řadě forem. Je to například forma T (tense) s rozvinutou částí B1 až B8, nebo forma R (relax), kdy uvedený úsek řetězce B má konformaci α šroubovice a navazuje tak na šroubovici v oblasti B9–B20 (cit.¹⁵). NMR experimenty prokázaly přítomnost konformace stavu T rovněž ve vodném roztoku hormonu¹⁶. Z toho někteří autoři usoudili, že stav T představuje aktivní formu inzulínu při interakci s IR (cit.¹⁷). Na druhé straně však bylo zjištěno, že konformace typu T, nalezená v krystalech nativního inzulínu, je stejná jako konformace neaktivního inzulínového analogu^{11,16}. Na základě těchto prací tak nebylo možno rozhodnout, která z forem je při interakci s IR preferována¹⁶. Z experimentů i počítačové simulace vyplývá, že aktivní forma se vytváří patrně až v blízkosti aktivního místa receptoru^{18,19}. Odtud vyplývá snaha řady laboratoří co nejpodrobněji popsat strukturu IR, resp. komplexu inzulín/IR.

3. Inzulínový receptor

Inzulínový receptor je membránový glykoprotein patřící do skupiny tyrosinkinázových receptorů tvořený dvěma α - a dvěma β -podjednotkami vzájemně kovalentně vázanými disulfidickými můstky^{2,20}. Je lokalizován na všech tkáňích obratlovců a jeho koncentrace na buňce může být od 40 molekul receptoru na erytrocytech po 200 000 molekul receptoru na adipocytech a hepatocytech. Molekulová hmotnost je 340 kDa a poločas života je 7 hodin¹³. Existence membránového IR



Obr. 1. Schéma inzulínového receptoru. Distribuce aminokyselinových zbytků v jednotlivých oblastech je uvedena v tabulce I. L1, L2 – homologní domény, oblast vazby inzulínu na IR; CR – cystein rich doména; Fn0, Fn1, Fn2 – domény fibronektinu typu III; α ID – vložená doména α -podjednotky; β ID – vložená doména β -podjednotky; TM – transmembránová doména; TK – tyrosinkinasa; A-C – aktivační, katalyzační smyčka; 1 – disulfidový můstek na Cys524, místo spojení dvou α -podjednotek; 2 – disulfidové můstky na Cys682, Cys683 a Cys 685, místo spojení dvou α -podjednotek; 3 – disulfidový můstek spojující α a β -podjednotku, spojení Cys647 na α -podjednotce a Cys872 na β -podjednotce

byla předpovězena již před více než 30 lety^{21–23}. Experimentální důkaz uvedené hypotézy podali Yip a jeho spolupracovníci²⁴ v roce 1978. Primární struktura byla stanovena Ebinou²⁵, Ullrichem a jejich kolegy v roce 1985 (cit.^{20,26}), kteří prokázali, že IR je proteinový heterotetramer formy β - α - α - β kovalentně vázaný disulfidovými můstky. IR je homologický s řadou receptorů, např. s receptorem pro IGF-I (insulin-like growth factor I), EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) aj. Gen pro IR je umístěn na krátkém raménku lidského chromosomu 19 a obsahuje 22 exonů. Prekurzor IR je syntetizován jako jeden polypeptidový řetězec, který se skládá ze dvou velkých extracelulárních domén (celá podjednotka α (735 zbytků) a 1/3 podjednotky β (194 zbytků), jedné transmembránové domény (23 zbytků) a intracelulární domény (2/3 podjednotky β (403 zbytků)). Odštěpením 4 zbytků se oddělí obě podjednotky, které jsou dále vázány pouze disulfidickými můstky. Vytvoří se tak heterodimer inzulínového receptoru skládající se z extracelulární podjednotky α (135 kDa) a částečně extra- a částečně intracelulární podjednotky β (95 kDa, 620 zbytků). V místě štěpení obou podjednotek může docházet k alternativnímu sestihu exonu 11 (zbytky 718–729), vytváří se tak 2 izoformy IR rozdílné 12

Tabulka I

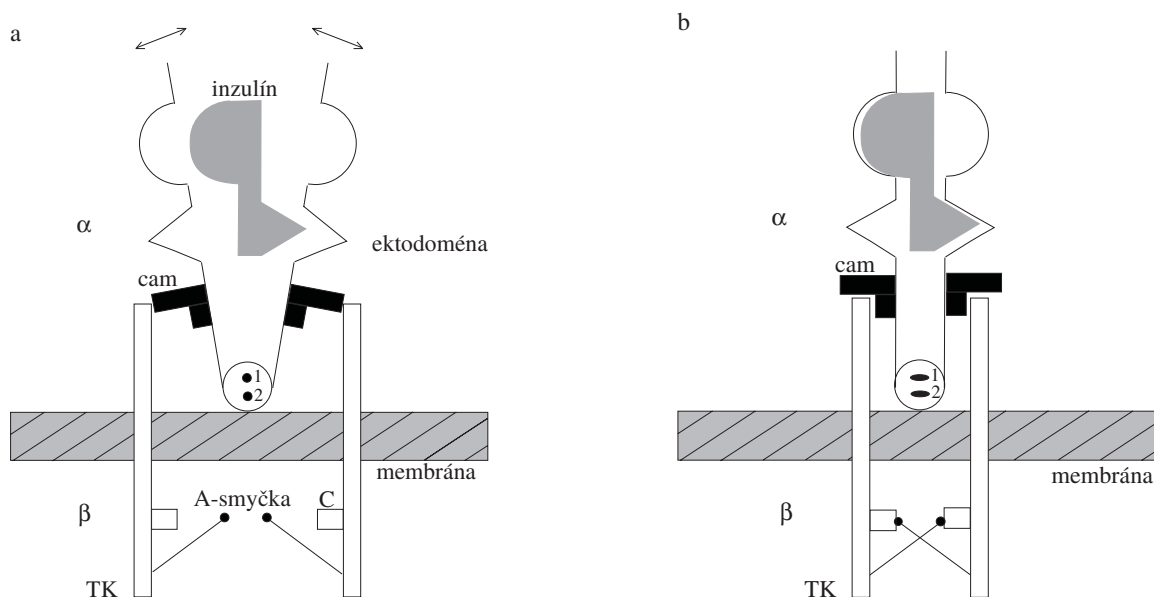
Distribuce aminokyselinových zbytků v inzulínovém receptoru

Název domény na receptoru	Oblast v sekvenci
<i>podjednotka α</i>	
L1	(N-konec) 1–158
CR	159–310
L2	311–470
Fn0	471–572
α Fn1	573–661
α ID	662–719 (C-konec)
<i>podjednotka β</i>	
β ID	(N-konec) 724–779
β Fn1	780–816
Fn2	817–913
EM (extracelulární vrstva membrány)	914–919
TM	930–952
IM (intracelulární vrstva membrány)	953–977
TK	978–1283
CTR (C-koncová oblast)	1284–1388 (C-konec)

zbytky v blízkosti C-konce podjednotky α (cit.²). Spojením disulfidickými můstky na podjednotce α dvou heterodimerů IR se vytváří kompletní heterotetramer IR, který je schopen navázat molekulu inzulínu.

Na podjednotkách je možno rozlišit několik domén (obr. 1). Na určení struktury jednotlivých domén se podílela řada autorů. Na sestavení prozatímní kvaternární struktury IR se využívalo i homologii s jinými receptory. Strukturu ektodomény IR na základě homologie s EGF poprvé stanovil Taylor a jeho spolupracovníci²⁷. Identifikovali dvě velké homologní domény (L1 a L2) a menší CR (cystein-rich) doménu umístěnou mezi nimi. Trojrozměrnou strukturu ektodomény IGF-I stanovil rentgenostrukturní analýzou Garrett a spol. v roce 1998 (cit.²⁸). Pozornost k této části IR směřuje kvůli domnělému vazebnému místu pro inzulín^{6,29–33}. Za doménami L1-CR-L2 jsou tři domény fibronektinu typu III (Fn0, Fn1 a Fn2), jejichž strukturu určili metodami NMR a RTG-krytalografie Casasnovas³⁴, Copie³⁵, Marino-Buslje³⁶ a jejich spolupracovníci. Fibronektin typu III je sedmivrstvá β -struktura. Doména Fn1 tvoří předěl mezi podjednotkami α a β , kdy čtyři β -struktury patří podjednotce α a tři podjednotce β . Transmembránovou doménu (TM) tvoří 23 zbytků α -helix. Intracelulární tyrosinkinasonou doménu (TK) stanovili krystalograficky Hubbar^{37,38} a jeho spolupracovníci. Výsledky počítačového modelování publikoval Ginalski³⁹. Na tyrosinkinasonou doménu dochází k autofosforylaci tří tyrosinových zbytků Tyr1158, Tyr1162 a Tyr1163 na aktivační smyčce. Touto autofosforylací dochází ke spuštění celé kaskády intracelulárních pochodů, vedoucích mimo jiné ke stimulaci transportu glukosy dovnitř buňky a následné lipogenezi.

Na tyto dílčí poznatky o struktuře IR navázal Ottensmeyer s kolektivem, který v roce 1999 (cit.⁷) určil metodou skanovací



Obr. 2. Schematické znázornění interakce inzulínu s inzulínovým receptorem. Znázornění funkce úseku „cam“ při navázání inzulínu na IR. Ektodoména IR funguje jako „kleště“, jejichž sevření v důsledku navázání inzulínu způsobí vysmeknutí úseku „cam“ a následně přiblížení aktivačních smyček (A-smyčka), tím se tyrosinkinasové (TK) domény dostanou do pozice, kdy může docházet k autofosforylaci tyrosinových zbytků a spuštění kaskády nitrobuňkových dějů závislých na vazbě inzulínu; 1, 2 – disulfidické můstky mezi podjednotkami α ; C – katalytická oblast

transmisní elektronové kryomikroskopie (STEM) kvarterní strukturu nekovalentního komplexu inzulín/IR. Spojením uvedených informací a za pomoci molekulárního modelování byl vytvořen energeticky optimální model tohoto komplexu^{8,9}. Distribuce aminokyselinových zbytků v jednotlivých doménách IR je uvedena v tabulce I.

Dvě podjednotky α se váží kolmo na dvojčetnou osu souměrnosti disulfidickými můstky v pozicích Cys524, Cys682, Cys683 a Cys685. Disulfidický můstek, který váže podjednotky α a β dvou různých heterodimerů, je tvořen Cys647 ve Fn1 doméně podjednotky α a Cys872 ve Fn2 doméně podjednotky β . Katalytická smyčka je tvořena zbytky 1130 až 1137. Aktivační smyčka pak zbytky 1149 až 1170. Prostorová struktura některých oblastí, například C terminální domény nebo vložené domény β ID, není doposud přesně známa⁸.

4. Interakce inzulín/inzulínový receptor

Taylor a další^{5,19,32,40,41} vysvětlují aktivaci IR jeho deformací vyvolanou navázáním inzulínu. Předpokládáný mechanismus interakce inzulínu s IR spočívá ve vniknutí molekuly inzulínu do pasti tvořené třemi prvními doménami podjednotky α označovanými jako L1-CR-L2 (obr. 2).

Podjednotky β receptoru jsou drženy od sebe v potřebné vzdálenosti úsekem „cam“ domény CR, kde úsek cam hraje roli jakési mechanické vačky. Po zachycení inzulínové molekuly receptorem dojde k sevření „kleští“ tvořených doménami L1-CR-L2 obou monomerů, a tím i k vysmeknutí úseku cam. To umožní přiblížení transmembránových a intracelulárních částí podjednotky β obou monomerů, a tím i kontakt aktivačních a katalytických smyček protilehlých TK (obr. 2b), vedou-

cí k transfosforylaci TK a následnému spuštění laviny intracelulárních signálů. Deaktivace IR postupuje patrně opuštěním inzulínové molekuly z kleští třech prvních domén, následně se oddálí domény TK, přičemž dochází k defosforylaci.

Při studiu vazby inzulínu na IR se vycházelo z předpokladu, že kontaktu se účastní především ty zbytky inzulínu, které jsou zodpovědné za tvorbu dimeru, resp. hexameru inzulínu. Postupně se ukázalo, že vazebná interakce inzulínu s IR se děje na amfipatickém povrchu inzulínové molekuly. V jejím středu je hydrofobní oblast velikosti 150 \AA^2 tvořená: A1, A3, A19, B11, B12, B15, B16, B24, B25 a B26. Polární a nabitě skupiny: A4, A5, A18, A21, B9, B10, B13, B21, B22 a skupina COO^- konce řetězce B jsou uspořádány okolo ní. Hydrofobní povrch je zakryt koncovou pohyblivou částí řetězce B, která jej stíní před molekulami rozpouštědla. Úhel mezi amfipatickým povrchem a povrchem dimerizace je asi 20° (cit.¹⁷). Přibližně stejné skupiny zbytků uvádějí práce^{5,8,32,42}. V tabulce II jsou nejkratší kontakty mezi inzulínem a IR získané počítačovým modelováním⁸.

Přesné místo navázání inzulínu na IR není ještě známé. Rozcházejí se zde dva názory. Jedním je předpoklad interakce inzulínu s CR doménou⁴³⁻⁴⁶. Druhou je spolupráce obou domén L1 a L2 při interakci s inzulínem. Předpokládá se, že C-konec B-řetězce inzulínu kontaktuje N-konec IR (zbytky 20 až 121), zatímco N-konec B-řetězce inzulínu interaguje se zbytky 390 až 488 receptoru^{33,47}. Použitím fotoafinitního značení se ukázala možná interakce Phe88-Phe89-Asn90-Tyr91 na IR s PheB24-PheB25-TyrB26 inzulínu⁴⁷. Elektronovou kryomikroskopii⁷ se potvrdilo, že jedna část inzulínu se váže na L1 doménu prvního heterodimeru a jiná část inzulínu se naváže na L2 doménu druhého heterodimeru. Vzhledem k dvojčetné souměrnosti IR dimeru se může inzulínová mole-

Tabulka II

Některé nejkratší vzdálenosti mezi postranními řetězci aminokyselinových zbytků inzulínu a inzulínového receptoru

Inzulín	Inzulínový receptor	Vzdálenost mezi postranními řetězci [pm]
<i>monomer I</i>		
GluA4	Arg86 (L1)	250 ^a
ThrA8	Arg86	260
LysB29	Asp12	260
LysB29	Gln4	250
GluA17	Arg331 (L2)	250
GlnA21	Ser323	530 ^b
<i>monomer II</i>		
SerB9	Gln34 (L1)	280
HisB10	Arg14	500 ^b
GluB13	Arg86	250
ValB12	Phe89	250
LeuB17	Leu87	250
TyrB16	Leu87	250
PheB24	Phe88	250
TyrB26	Tyr91	350 ^b
GluB21	His247 (CR)	250
GluB21	Gln249	250
ArgB22	Asp250	400 ^b
ArgB22	Glu287	250
ArgB22	His247	250
AsnA5	Arg331 (L2)	250
AsnA15	Arg331	250

^a Minimální vzdálenosti během rotace postranních řetězců,

^b interakce předpokládající přítomnost molekuly vody, vodíkové vazby nebo rotaci celých oblastí L1 a L2

kula zachytit v páru L1-CR-L2 domén ve dvou ekvivalentních orientacích otočením o 180° kolem dvojčetné osy IR. Získaný model však zároveň ukazuje, že úplná afinita vazby inzulínu na IR vyžaduje navázání molekuly na oba heterodimery IR zároveň. To vylučuje současnou plnou vazbu dvou inzulínových molekul, ve shodě s negativní kooperací vazby inzulínu s nízkou vazební afinitou monomerního inzulínu, jak ji předpokládal De Meyts a spol.⁵

5. Typy inzulínu a jejich účinnost

Při hodnocení účinnosti jednotlivých typů inzulínu je důležité definovat příslušná kritéria. Je potřebné u jednotlivých typů inzulínu nebo jeho analogů určit jejich biologickou afinitu a aktivitu. Biologická afinita udává schopnost vazby inzulínu, resp. jeho analogu na IR. Biologická aktivita je jakási biologická odpověď na navázání inzulínu na IR, např. schopnost buňky přijmout molekuly glukosy nebo schopnost z přijaté glukosy vytvořit triacylglycerol.

Biologická aktivita se nejdříve testovala pouze *in vivo*

nejčastěji tzv. křečovými testy⁴⁸, kdy se podáním velké dávky inzulínu vyvolala křečová odezva, nebo měřením množství glukosy v krvi po podání inzulínu, resp. jeho analogů⁴⁹. Časová a finanční náročnost těchto testů vedla k zavedení testů *in vitro*, kde se využívá buď plazmatických buněčných membrán nebo izolovaných buněk. Na tomto materiálu se nejčastěji měří biologická afinita, schopnost transportu glukosy, míra lipogeneze, či oxidace glukosy. K těmto pokusům jsou nejčastěji používány celé buňky – adipocyty (potkani^{23,50-52}, myši⁵³, lidské⁵¹), hepatocyty (potkani⁵⁴, myši⁵³, psi^{4,55}), lidské lymfocyty IM-9^{56,57}, lidské fibroblasty^{58,59} nebo izolované plazmatické membrány z adipocytů, hepatocytů či lidských placentárních buněk⁶⁰. Při zjišťování afinity k IR se měří schopnost kompetice inzulínu, resp. jeho analogu s radioaktivně značeným inzulínem, o vazebné místo na inzulínovém receptoru. Při stimulaci transportu glukosy se měří schopnost inzulínu, resp. jeho analogu stimulovat průnik nemetabolizovatelného radioaktivně značeného analogu glukosy přes plazmatickou membránu dovnitř buňky⁵². Při testování míry lipogeneze se měří schopnost inzulínu, resp. jeho analogu, syntetizovat triacylglycerol z radioaktivně značené glukosy. Uvedené testy *in vitro* jsou přibližně paralelní, nikoliv však identické^{42,61}. Je možné mít analog, který má výbornou afinitu k IR, ale jeho schopnost biologické odpovědi je malá.

Při konstrukci nových analogů inzulínu jsou také důležité požadavky na rychlost nástupu účinku¹⁹ a délku jeho trvání. Zajímavé jsou také vedlejší účinky, kdy například [AspB10] inzulín vzniklý substitucí Asp za His je karcinogenní³².

Různé typy inzulínu je možné rozdělit podle několika hledisek. Zde si pro ilustraci uvedeme klasifikaci podle původu:

- přírodní (nativní): lidský, vepřový atd. Podrobný popis nalezneme v práci Blundella a spol.⁶²,
- genetické mutanty jako Chicago PheB25→LeuB25, Los Angeles PheB24→SerB24, Wakayama ValA3→LeuA3 (cit.^{4,11}) EBL3Q Gly B13→GlnB13 (cit.⁶³). Uvedené typy byly zjištěny u pacientů v oblastech, podle kterých jsou dané mutanty také pojmenovány. Jejich účinnost byla vesměs menší než 1 %,
 - analogy (syntetické, semisyntetické) vzniklé:
 - transpozicí dvojice či více dvojic zbytků. Nejznámější analog tohoto typu je tzv. Lispro, který se dostal na náš trh pod obchodním názvem Humalog. Jedná se o transpozici ProB28 a LysB29 (cit.⁶⁴),
 - substitucí za jiný zbytek (jeden nebo více) nebo D/L optický antipod⁶⁵,
 - derivací (chemická modifikace) za jinou chemickou skupinu než aminokyselinu nebo změna ve vedlejším řetězci,
 - delecí (vynecháním) vnitřní části řetězce či zkrácením konce řetězce⁶⁶,
 - skupina inzulínu příbuzných látek: IGF-I, IGF-II, EGF, PDGF, bombycin, PTH, relaxin, MIP (cit.⁶⁷).

Významnou skupinu pak tvoří látky vzniklé kombinací uvedených změn. Tak například doposud nejučinnější známý analog [D-AlaB26]des-(B27–B30)-destetrapeptid-inzulín-B26-amid vykazuje 12,5× vyšší afinitu na IR a 9,7× vyšší biologickou aktivitu než lidský inzulín. Jedná se o současnou delecí posledních 4 zbytků C-koncové části řetězce B a substitucí TyrB26→D-AlaB26 (cit.¹⁸).

V krátkosti se proto zmíníme jen o několika významných poznátcích, které byly vodítkem při konstrukci nových typů

inzulínu. Omezíme se na vlastnosti úseku B20–B30, který hraje významnou roli při interakci s IR. Při interpretaci výsledků se braly v úvahu podmínky sterické, rozdělení nábojů, hydrofobicita, vodíkové a iontové vazby, vliv vody a dynamické vlastnosti jednotlivých úseků řetězce. Tak například bylo prokázáno, že postupná delece čtyř koncových aminokyseliny zbytků řetězce B snižuje aktivitu inzulínu, přičemž takto vzniklé analogy jsou ale stále ještě účinné⁴². Výraznější změna (pokles na 25 % původní aktivity nativního inzulínu) nastává odtržením i TyrB26. Odstranění PheB25 znamená výrazné snížení biologické aktivity inzulínu. Ukazuje se, že v případě substituce Phe v poloze B25, koncová část řetězce B do jisté míry „překáží“ přiblížení inzulínu k aktivní oblasti na povrchu IR, což se projevuje snížením inzulínové aktivity⁴. Výjimku tvoří substituce Tyr místo Phe, kdy se snížení téměř neprojevuje. Podrobnější výsledky pro desptapeptid inzulínu uvádí práce Spodena a spol.⁶¹, kde se konstatuje, že význam aromatičtějšího kruhu není podstatný, ale naopak je rozhodující planarita postranního řetězce B25 v oblasti atomu C_γ. V případě delece pěti posledních zbytků v řetězci B se ukazuje, že amidace karboxylové skupiny eliminuje negativní vliv záporného náboje karboxylu a biologická aktivita takto zkráceného analogu (desptapeptid inzulín) zůstává nezměněna⁶⁸.

Odtržení PheB24 prakticky ruší inzulínovou aktivitu, patrně vlivem zhroucení geometrie inzulínové kličky B20–B23, o které se předpokládá, že rozhoduje o styku s IR (cit.^{42,69}). Uvedený model předpokládá, že v okamžiku kontaktu inzulínové molekuly s IR dochází k uvolnění oblasti B22–B30 z blízkosti šroubovice B9–B20 a odhalení hydrofobní oblasti lemované oblastí hydrofilní. Smyčka beta tvořená B20–B23 přitom zajišťuje otáčivost zbyvajících konce řetězce B (cit.^{5,16,19,69,70}).

Podrobnému studiu byl podroben analog Lispro (Humalog). Prolin v inzulínu má v poloze B28 stabilizující vliv na interakci monomer–monomer a předpokládá se, že substituce Lys v pozici B28 povede ke sterickým zábránám a zruší se specifický kontakt prolinového kruhu, a tím se zabrání dimeřizaci. Inzulín tak setrvává v monomerní aktivní formě⁶⁴. Humalog se tak stává analogem inzulínu s velmi rychlým účinkem.

6. Závěr

Rozsáhlé spektrum dosavadních výsledků dává dílčí informace. Bez znalosti trojrozměrné struktury komplexu inzulínu a jeho homologů s IR je obtížné odpovědět na některé základní otázky týkající se afinity a aktivity inzulínu. Pokrok současných experimentálních postupů a výpočetních metod dává však reálnou naději, že se podaří tyto problémy vyřešit v blízké budoucnosti.

Práce byla podpořena grantem MPO ČR PZ-22/32 a výzkumným záměrem Z4 055 905.

LITERATURA

- Škrha J.: *Lekar. Listy* 10, 11 (2001).
- White M. F., Kahn C. R.: *J. Biol. Chem.* 269, 1 (1994).
- Baker E.: *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 319, 369 (1988).
- Nakagawa S. H., Tager H. S.: *J. Biol. Chem.* 261, 7332 (1986).
- De Meyts P.: *Diabetologia* 37 Suppl. 2, S135 (1994).
- Schaffer L.: *Eur. J. Biochem.* 221, 1127 (1994).
- Luo R. Z., Beniac D. R., Fernandes A., Yip C. C., Ottensmeyer F. P.: *Science* 285, 1077 (1999).
- Ottensmeyer F. P., Beniac D. R., Luo R. Z., Yip C. C.: *Biochemistry* 39, 12103 (2000).
- Slade A., Luh J., Ho S., Yip C. M.: *Biophys. J.* 2001, 80.
- Huml K., Barth T.: *Chem. Listy* 92, 294 (1998).
- Pittman I., Tager H. S.: *Biochemistry* 34, 10578 (1995).
- Shi Y. Y., Yun R. H., van Gunsteren W. F.: *J. Mol. Biol.* 200, 571 (1988).
- Ganong W. F.: *Reviews in Medical Physiology*, 13. vyd. Prentice Hall, Connecticut 1987.
- Adams M.: *Nature* 224, 491 (1969).
- Ciszak E., Smith G. D.: *Biochemistry* 33, 1512 (1994).
- Hua Q. X., Shoelson S. E., Kochoyan M., Weiss M. A.: *Nature* 354, 238 (1991).
- Liang D.: *Sci. China, Ser. B* 35, 418 (1992).
- Kurapat G., De Wolf E., Grotzinger J., Wollmer A.: *Protein Sci.* 6, 580 (1997).
- Brandenburg D.: *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107 Suppl. 2, S6 (1999).
- Ullrich A., Gray A., Tam A. W., Yang-Feng T., Tsubokawa M., Collins C., Henzel W., Le Bon T., Kathuria S., Chen E.: *EMBO J.* 5, 2503 (1986).
- House P. D., Weidemann M. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 541 (1970).
- Freychet P., Roth J., Neville, Jr. D. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1833 (1971).
- Cuatrecasas P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 1264 (1971).
- Yip C. C., Yeung C. W., Moule M. L.: *J. Biol. Chem.* 253, 1743 (1978).
- Ebina Y., Ellis L., Jarnagin K., Edery M., Graf L., Clauser E., Ou J. H., Masiarz F., Kan Y. W., Goldfine I. D.: *Cell* 40, 747 (1985).
- Ullrich A., Bell J. R., Chen E. Y., Herrera R., Petruzzelli L. M., Dull T. J., Gray A., Coussens L., Liao Y. C., Tsubokawa M.: *Nature* 313, 756 (1985).
- Bajaj M., Waterfield M. D., Schlessinger J., Taylor W. R., Blundell T.: *Biochim. Biophys. Acta* 916, 220 (1987).
- Garrett T. P., McKern N. M., Lou M., Frenkel M. J., Bentley J. D., Lovrecz G. O., Elleman T. C., Cosgrove L. J., Ward C. W.: *Nature* 394, 395 (1998).
- Schaefer E. M., Erickson H. P., Federwisch M., Wollmer A., Ellis L.: *J. Biol. Chem.* 267, 23393 (1992).
- Woldin C. N., Hing F. S., Lee J., Pilch P. F., Shipley G. G.: *J. Biol. Chem.* 274, 34981 (1999).
- Tulloch P. A., Lawrence L. J., McKern N. M., Robinson C. P., Bentley J. D., Cosgrove L., Ivancic N., Lovrecz G. O., Siddle K., Ward C. W.: *J. Struct. Biol.* 125, 11 (1999).
- De Meyts P., Wallach B., Christoffersen C. T., Urso B., Gronskov K., Latus L. J., Yakushiji F., Ilondo M. M., Shymko R. M.: *Horm. Res.* 42, 152 (1994).
- Fabry M., Schaefer E., Ellis L., Kojro E., Fahrenholz F., Brandenburg D.: *J. Biol. Chem.* 267, 8950 (1992).
- Casasnovas J. M., Springer T. A., Liu J. H., Harrison S. C., Wang J. H.: *Nature* 387, 312 (1997).
- Copie V., Tomita Y., Akiyama S. K., Aota S., Yamada

- K. M., Venable R. M., Pastor R. W., Krueger S., Torchia D. A.: *J. Mol. Biol.* 277, 663 (1998).
36. Marino-Buslje C., Mizuguchi K., Siddle K., Blundell T. L.: *FEBS Lett.* 441, 331 (1998).
 37. Hubbard S. R., Wei L., Ellis L., Hendrickson W. A.: *Nature* 372, 746 (1994).
 38. Hubbard S. R.: *EMBO J.* 16, 5572 (1997).
 39. Ginalski K., Wojciechowski M., Lesyng B.: *Acta Biochim. Pol.* 46, 601 (1999).
 40. Taylor S. I., Cama A., Accili D., Barbetti F., Quon M. J., de la Luz S. M., Suzuki Y., Koller E., Levy-Toledano R., Wertheimer E.: *Endocr. Rev.* 13, 566 (1992).
 41. Pullen R. A., Lindsay D. G., Wood S. P., Tickle I. J., Blundell T. L., Wollmer A., Krail G., Brandenburg D., Zahn H., Gliemann J., Gammeltoft S.: *Nature* 259, 369 (1976).
 42. Mirmira R. G., Nakagawa S. H., Tager H. S.: *J. Biol. Chem.* 266, 1428 (1991).
 43. Yip C. C., Hsu H., Patel R. G., Hawley D. M., Maddux B. A., Goldfine I. D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 321 (1988).
 44. Yip C. C., Grunfeld C., Goldfine I. D.: *Biochemistry* 30, 695 (1991).
 45. Rafaeloff R., Patel R., Yip C., Goldfine I. D., Hawley D. M.: *J. Biol. Chem.* 264, 15900 (1989).
 46. Gustafson T. A., Rutter W. J.: *J. Biol. Chem.* 265, 18663 (1990).
 47. Wedekind F., Baer-Pontzen K., Bala-Mohan S., Choli D., Zahn H., Brandenburg D.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370, 251 (1989).
 48. Grant K. I., von Holt C.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368, 239 (1987).
 49. Trethewey J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7, 189 (1989).
 50. Gammeltoft S., Gliemann J.: *Biochim. Biophys. Acta* 320, 16 (1973).
 51. Pedersen O., v knize: *Handbook on Receptor Research, Insulin Receptor* (De Pirro R., Lauro R., ed.), str. 83. Acta Medica, Roma 1985.
 52. Macho L., Fickova M., Zorad S.: *Endocr. Regulations* 31, 89 (2001).
 53. Schluter K., Peterson K. G., Schuttler A., Brandenburg D., Kerp L., v knize: *Insulin, Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones* (Brandenburg D., Wollmer A., ed.), str. 433. W. de Gruyter, Berlin-New York 1980.
 54. Gammeltoft S., Kristensen L. O., v knize: *Handbook on Receptor Research, Insulin Receptor* (De Pirro R., Lauro R., ed.), str. 57. Acta Medica, Roma 1985.
 55. Mirmira R. G., Tager H. S.: *J. Biol. Chem.* 264, 6349 (1989).
 56. Pezzino V., Vigneri R., v knize: *Handbook on Receptor Research, Insulin Receptor* (De Pirro R., Lauro R., ed.), str. 129. Acta Medica, Roma 1985.
 57. Gavin III. J. R., Gorden P., Roth J., Archer J. A., Buell D. N.: *J. Biol. Chem.* 248, 2202 (1973).
 58. Podlecki D. A., Frank B. H., Kao M., Horikoshi H., Freidenberg G., Marshall S., Ciaraldi T., Olefsky J. M.: *Diabetes* 32, 697 (1983).
 59. Podskalny J. M., Kahn C. R., v knize: *Handbook on Receptor Research, Insulin Receptor* (De Pirro R., Lauro R., ed.), str. 117. Acta Medica, Roma 1985.
 60. Inouye K., Watanabe K., Tochino Y., Kanaya T., Kobayashi M., Shigeta Y.: *Experientia* 37, 811 (1981).
 61. Spoden M., Gattner H. G., Zahn H., Brandenburg D.: *Int. J. Pept. Protein Res.* 46, 221 (1995).
 62. Blundell T. L., Wood S. P.: *Nature* 257, 197 (1975).
 63. Brzovic P. S., Choi W. E., Borchardt D., Kaarsholm N. C., Dunn M. F.: *Biochemistry* 23, 13057 (1994).
 64. Chance R. E., Frank B. H., Radznik J. M., DiMachi R. D.: *Drug Today* 34 Suppl. C, 1 (1998).
 65. Blundell T., Dodson G., Hodgkin D., Mercola D.: *Adv. Protein Chem.* 26, 279 (1972).
 66. Weitzel G., Bauer F. U., Eisele K.: *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 357, 187 (1976).
 67. Murray-Rust J., McLeod A. N., Blundell T. L., Wood S. P.: *Bioessays* 14, 325 (1992).
 68. Fischer W. H., Saunders D., Brandenburg D., Wollmer A., Zahn H.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366, 521 (1985).
 69. Nakagawa S. H., Tager H. S.: *Biochemistry* 32, 7237 (1993).
 70. Bao S. J., Xie D. L., Zhang J. P., Chang W. R., Liang D. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2975 (1997).
- K. Huml^a, L. Klasová^{a,b}, and J. Barthová^b** (^a*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^b*Faculty of Natural Sciences, Charles University, Prague*): **Insulin/Insulin Receptor Interaction**

An ever-increasing number of patients who suffer from diabetes mellitus is a worldwide problem. Therefore, an extensive study of insulin and its receptor is of high priority of many recent studies. Particularly, a detailed knowledge of the molecular structure and conformational changes of insulin along the metabolic path is very important. The paper shows some interesting features of the topic.