

PB1.6. Studium a regulace zásobních forem insulinu v sekrečních granulích slinivky (skupina Jiráček)

Cíle výzkumu

- Identifikovat hlavní strukturní formy insulinu v sekrečních granulích pankreatických β -buněk.
- Definovat roli rozdílných strukturních forem insulinu ve stabilitě insulinu a jeho uvolňování do krevního řečiště.
- Vyvinout nové ligandy pro racionální regulaci uvolňování insulinu z pankreatických buněk a pro nové způsoby uchovávání insulinu ve farmaceutických preparátech a pro jeho podávání pacientům.

Výzkumný plán a metodologie

(i) Experimenty *in vitro/silico*. Interakce insulinu s vybranými endogenními ligandy (např. dopaminem, serotoninem a argininem) budou studovány paralelně v *in vitro* a *in silico* experimentech, které by měly poskytnout věrohodné modely pro chování insulinu *in vivo*. Použijeme molekulární dynamiku a molekulární simulace abychom předpověděli způsoby vazby ligandů na insulin za definovaných podmínek (skupina P. Jungwirtha). Paralelně budou tyto ligandy krystalizovány společně s insulinem a budou určeny struktury těchto komplexů (skupina A. M. Brzozowskiho, University of York, UK). Stechiometrie a síla vazby ligandů na insulin budou studovány pomocí isothermální titrační mikrokalorimetrie a spektroskopických technik.

(ii) Experimenty s buněčnými liniemi *in vivo*. Budeme studovat schopnost dostupných stálých buněčných linií odvozených od β -buněk produkovat, skladovat a sekretovat insulin. Je známo, že některé permanentní pankreatické linie (odvozené od insulinomů) mají tendenci produkovat ve zvýšené míře proinsulin na úkor maturovaného insulinu. Je tudíž velmi důležité definovat a selektovat buněčnou linii s vlastnostmi pokud možno co nejvíce se podobajícími nativním pankreatickým buňkám. Rovněž budeme studovat vlastnosti zvířecích pankreatických tkání a primárních buněk odvozených z těchto tkání. Budeme optimalizovat izolační protokol intaktních sekrečních granulí z vybraných buněčných linií a tkání. Rovněž budeme studovat látky, jak nízkomolekulární, tak vysokomolekulární povahy, které jsou přítomné v sekrečních granulích za pomoci vysoce pokročilých technik hmotnostní spektrometrie (skupina J. Cvačky za použití nového hmotnostního spektrometru, jehož pořízení je plánováno v rámci tohoto projektu a spolupracující skupina prof. Carol Robinsonové na University of Oxford, UK) a za použití elektronové mikroskopie a imunohistochemických metod.

(iii) Experimenty se sekrečními granulemi *in vivo*. Neporušené nativní sekreční granule budou analyzovány za pomoci rentgenových paprsků (tzv. „single“ a „powder diffraction“), a za pomoci kryoelektronové mikroskopie („Cryo-Electron microscopy“) za účelem zjistit zda je insulin přítomný v krystalické či amorfní formě a případně určit struktury insulinu (spolupráce se skupinou prof. A. M. Brzozowskiho an University of York, UK, a za pomoci Diamond Light Source facility, Didcot, U.K.).

(iv) Experimenty s pankreatickými buňkami a umělými ligandy *in vivo*. Výsledky výzkumných plánů (i-iii) by měly vést k racionální studii o efektech vybraných ligandů na zásobní formy insulinu a na uvolňování insulinu v modelových buněčných liniích a tkáních. Struktury nejslibnějších ligandů budou chemicky modifikovány, optimalizovány tak aby bylo dosaženo požadovaných účinků ve fyziologii insulinu. V této fázi projektu budeme extenzivně využívat nově pořízené semipreparativní HPLC pro purifikaci syntetizovaných látek (skupina Jiráček).

Projekt bude realizován v těsné spolupráci se skupinami P. Jungwirtha, I. Pichové, J. Konvalinky a J. Cvačky.

Časový plán

2018-2019

- Studium interakce insulinu s endogenními ligandy *in vitro* a *in silico*.

2019-2022

- Studium schopností dostupných pankreatických permanentních buněčných linií, primárních linií a tkání produkovat, skladovat a sekretovat insulin
- Optimalizace experimentálních protokolů izolace nativních a neporušených sekrečních granulí.
- Analýza obsahu sekrečních granulí pomocí hmotnostní spektrometrie.

2020-2022

- Strukturní analýza insulinu v sekrečních granulích slinivky.

2021-2022

- Studium účinků vybraných ligandů na strukturu zásobních forem insulinu a na sekreci insulinu v modelových buněčných kulturách, primárních buňkách a tkáních.
- Chemická charakterizace nejzajímavějších ligandů a studium jejich efektů *in vitro* a *in vivo*.

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	
2018	1	<i>Biochemical Journal</i> <i>Diabetes</i> <i>Diabetologia</i> <i>Journal of Medicinal Chemistry</i> <i>ACS Chemical Biology</i> <i>Journal of Biological Chemistry</i> <i>Biochemistry</i> <i>PlosOne</i>
2019	1	
2020	2	
2021	2	
2022	2	
Celkem	8	

Patenty a patentové přihlášky

	Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové přihlášky (podané)	
2018	0	0	<i>Očekáváme patentové přihlášky v následujících oblastech: Nové ligandy pro modulování zásobních forem insulinu.</i>
2019	0	0	
2020	0	0	
2021	0	1	
2022	1	0	
Celkem	1	1	

Zahraniční spolupráce

- Dr. Andrzej M. Brzozowski ze Structural Biology Laboratory (YSBL) na University of York v U. K.,
- Skupina prof. Carol Robinsonové na University of Oxford v U. K.