

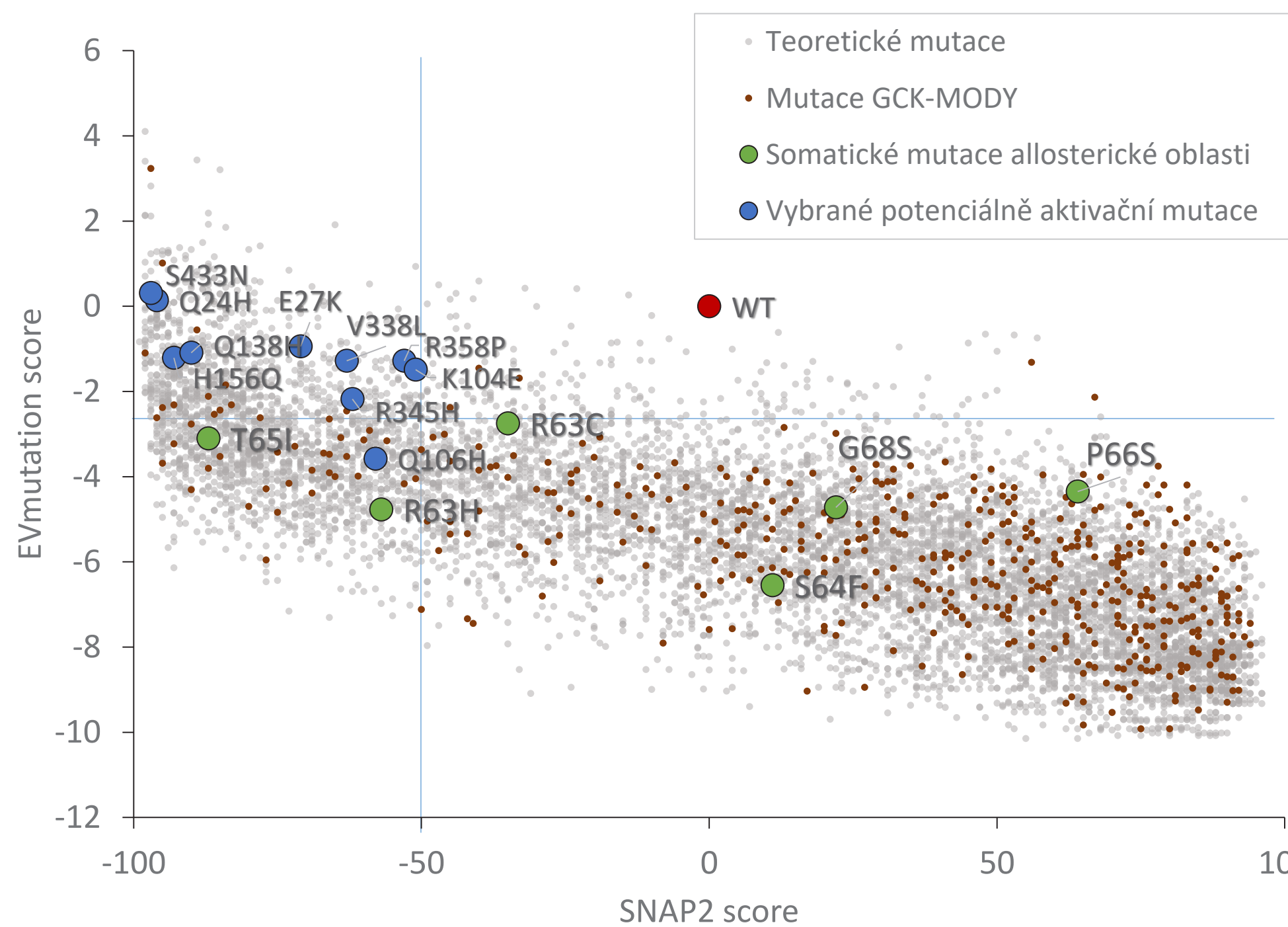
Glukokinasa: gen ovlivňující jak diabetes, tak zhoubné bujení?

Miroslav Těšínský, Petr Heneberg
II. interní klinika FNKV a 3.LF UK, Praha

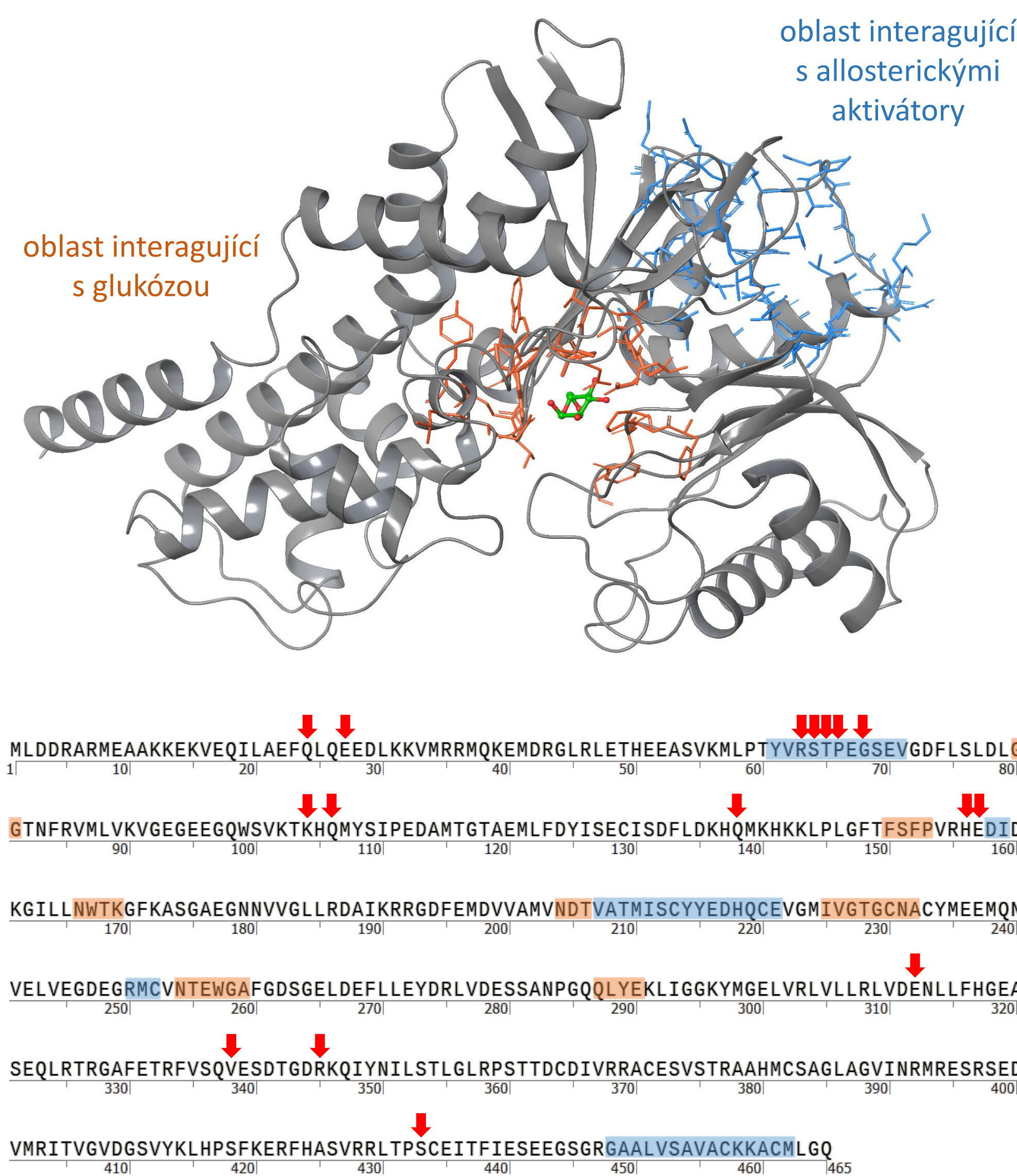
Úvod: Mutace v genu glukokinasy (*GCK*) mohou vést k rozvoji řady onemocnění. Inaktivační a inhibiční mutace *GCK* jsou jednou z nejčastějších příčin MODY diabetu (z angl. *maturity onset diabetes of the young*), zatímco aktivační mutace jsou spojeny s perzistující hyperinzulinemickou hypoglykemií v dětství (PHHI). V poslední letech byly v rámci genomických studií odhaleny i somatické mutace spojené s nádory (doposud 103 záměnových mutací [1]). Význam somatických mutací *GCK* v rozvoji rakovinného bujení zůstává neznámý.

Cíl: Chtěli jsme zjistit, jaké somatické záměnové mutace jsou pouze pasažérské a jaké vedou k podstatným změnám v enzymové kinetice a teplotní stabilitě, čímž by mohly přispívat k malignitě postižených buněk.

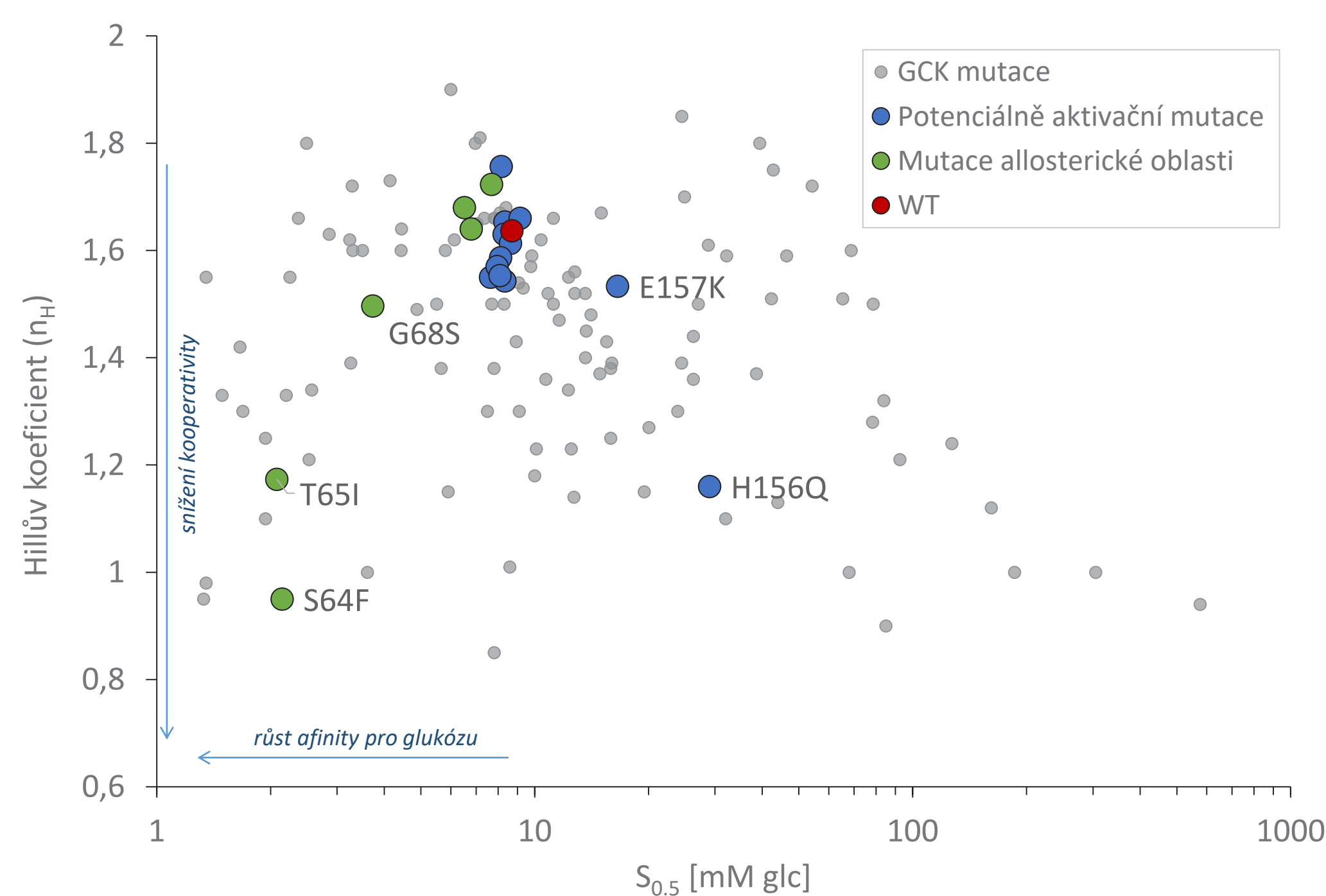
Metodika: Připravili jsme sérii 18 expresních konstruktů *GCK* nesoucích vybrané somatické záměnové mutace, exprimovali jsme je v *Escherichia coli* a následně jsme analyzovali enzymovou kinetiku rekombinantních proteinů. Mutace byly lokalizovány zčásti ve smyčce interagující s allosterickými aktivátory, zatímco kontrolní skupinu tvořily potenciálně aktivační mutace ve zbývajících oblastech proteinu, vybrané použitím predikčních algoritmů SNAP2 a EVmutation s nastavením navrženým nedávno na II. interní klinice k odlišení inaktivačních a potenciálně aktivačních mutací [2]. Aktivitu *GCK* jsme stanovili spektrofotometricky pomocí spřažené reakce s glukóza-6-fosfátdehydrogenasou při gradientu koncentrací glukosy a ATP. Zároveň jsme analyzovali vliv mutací na teplotní stabilitu *GCK*.



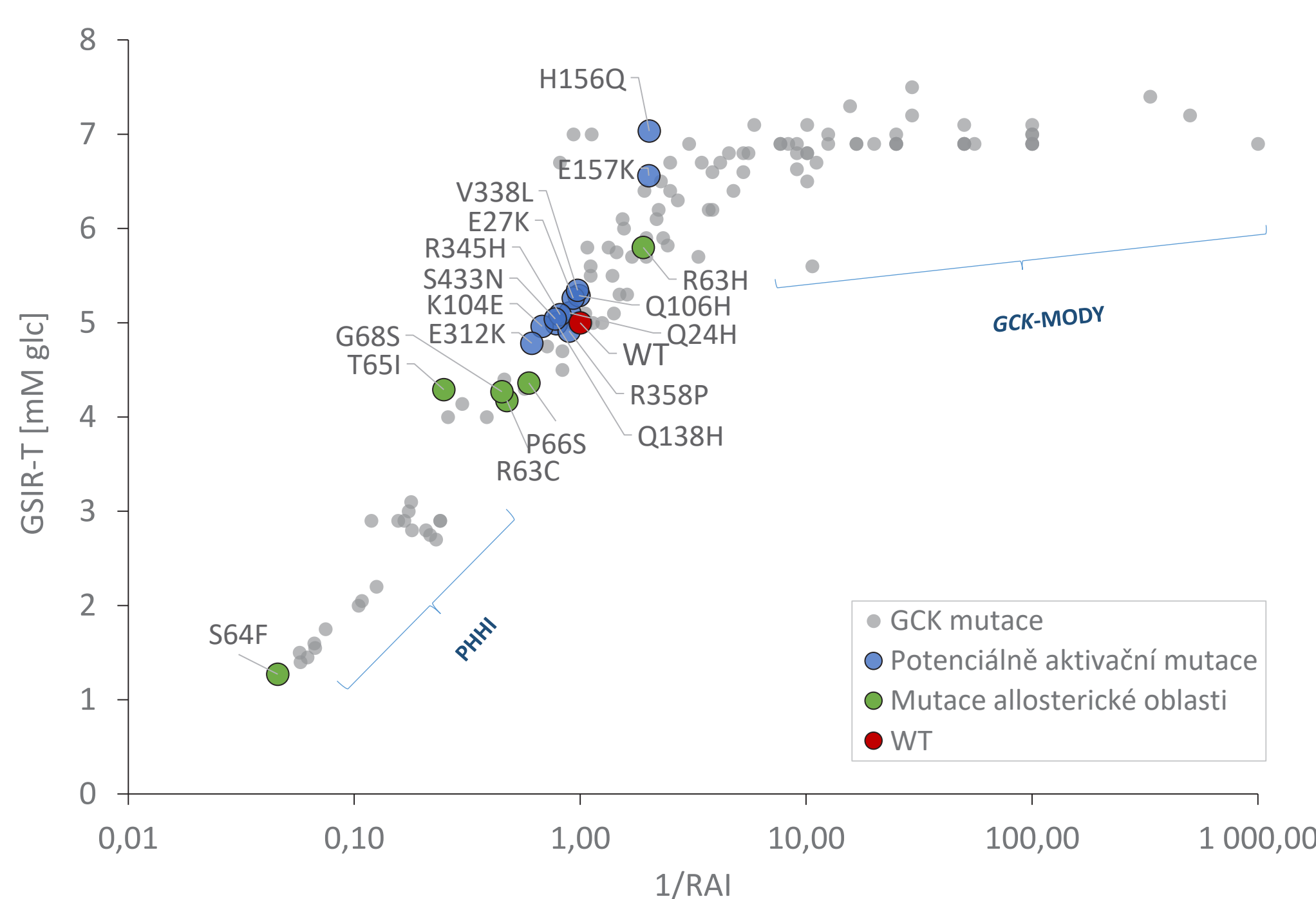
Obr. 1: Skóre mutací v GCK predikčních algoritmů SNAP2 a EVmutation. Na základě překročení limitních hodnot EVmutation score >-2,39, SNAP2 score <-50 (modré linky) byly vybrány potenciálně aktivační mutace.



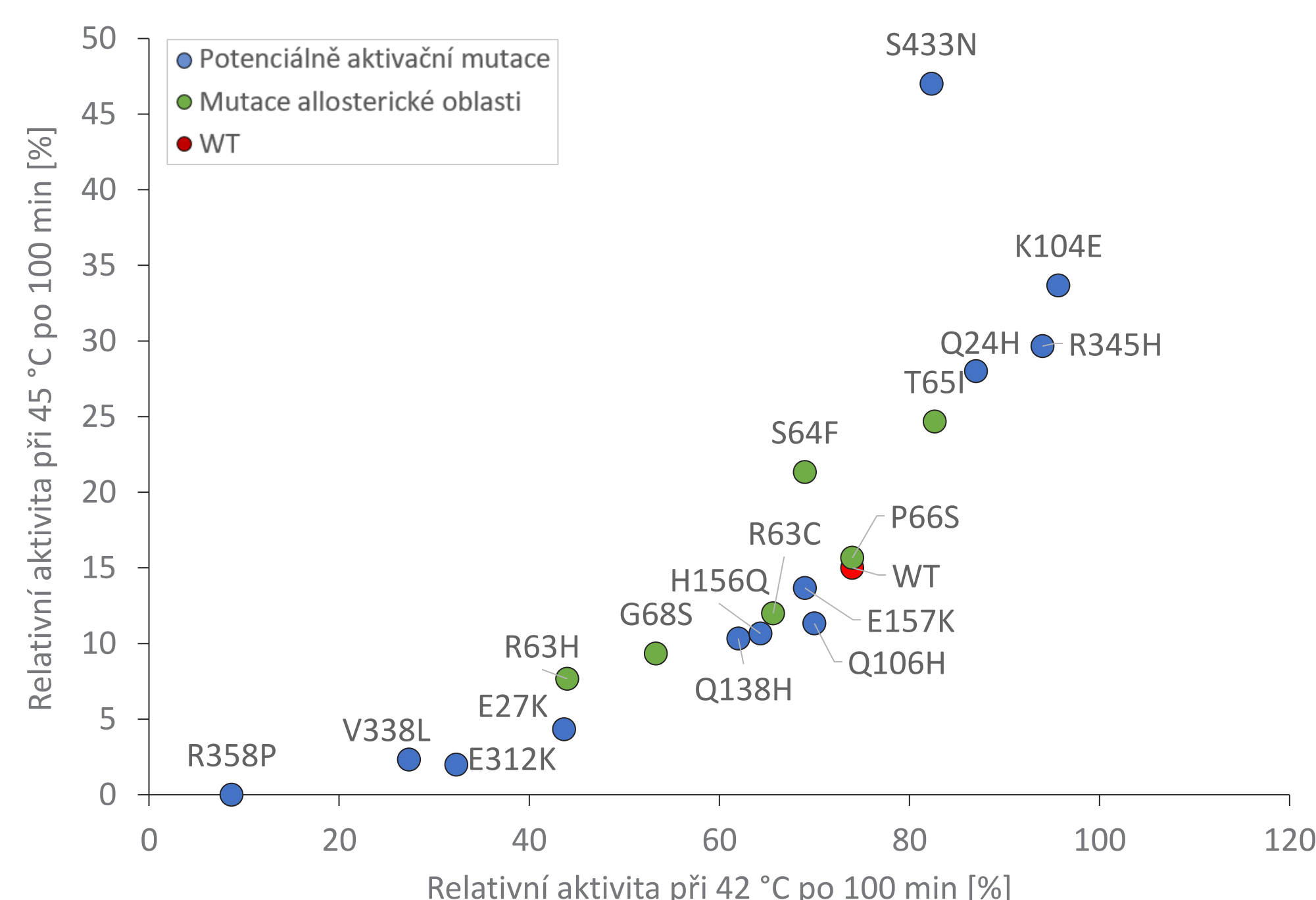
Obr. 2: Krystalová struktura GCK v komplexu s glukózou (PDB ID: 4NO7) a sekvence pankreatické GCK (isoforma 1) s vyznačenými pozicemi mutovaných míst. Barevně jsou odlišeny oblasti podílející se na vazbě allosterických aktivátorů a glukózy.



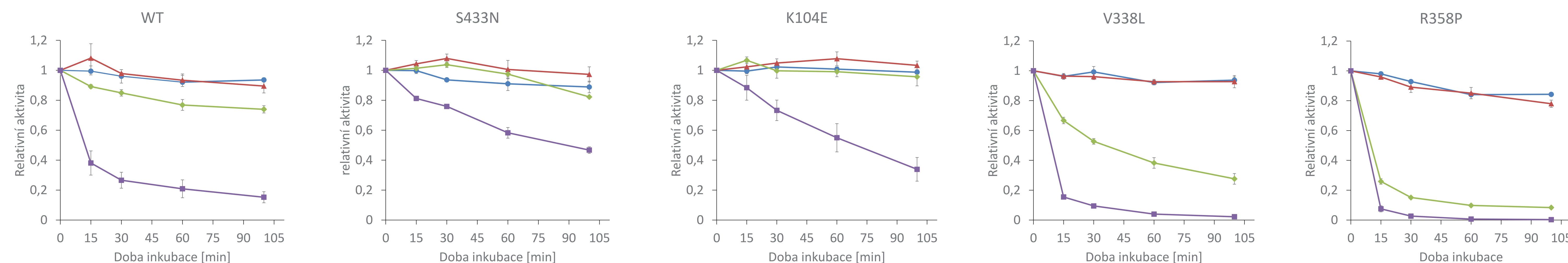
Obr. 3: Hillův koeficient GCK vyjadřující míru kooperativity a afinitu GCK pro glukosu vyjádřená jako $S_{0.5}$ při 5 mM ATP. Výrazné změny v kinetických parametrech GCK lze pozorovat u mutací z allosterické oblasti (G68S, T65I, S64F), jenž vykazují aktivační efekt. Naměřená data jsou porovnána s publikovanými daty [2].



Obr. 4: Potřebná hladina glukózy v β -buňkách při níž dochází k sekreci inzulinu (GSIR-T). Hodnota RAI vyjadřuje relativní aktivitní index. Hodnota GSIR-T byla získána z minimálního matematického modelu, který zahrnuje adaptovaný stav, tj. kompenzace zdravou alelou. Naměřená data jsou porovnána s publikovanými daty [2].



Obr. 5: Graf teplotní stability variant GCK při 42 °C a 45 °C. Výrazný efekt, a to jak nárůst, tak i pokles, lze vidět u několika potenciálně aktivačních mutací vybraných na základě predikce (modře).



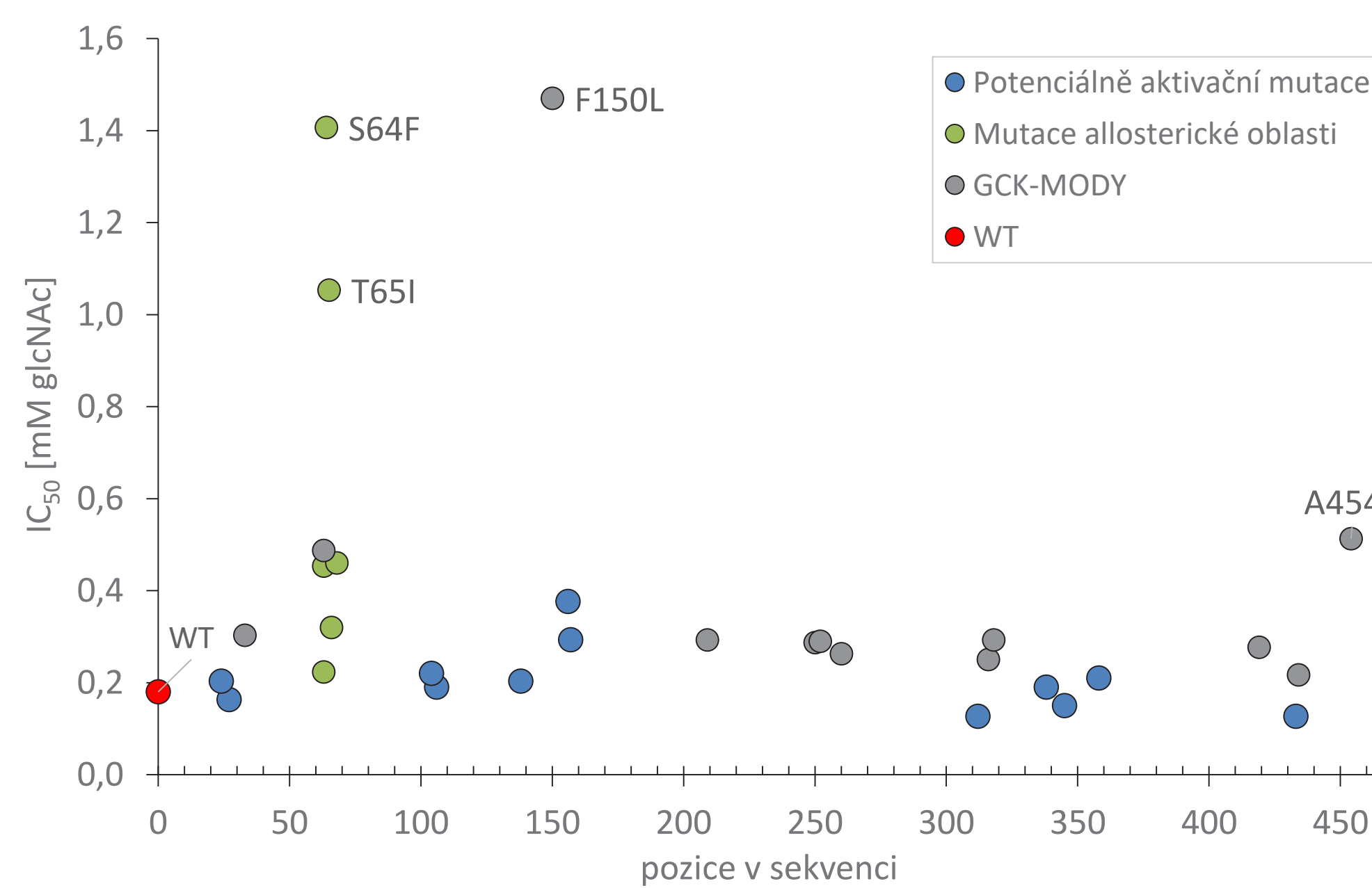
Obr. 6: Vliv teploty na stabilitu GCK. Mutace S433N a K104E mají stabilizační efekt, naopak mutace V338L a R358P stabilitu snižují oproti WT. Stabilita GCK byla měřena při 30 °C (—●—), 37 °C (—▲—), 42 °C (—▼—) a při 45 °C (—◆—). Hodnoty relativních aktivit jsou vyjádřeny jako průměr ze tří experimentů $\pm$ SE.

Výsledky: Značnou změnu v enzymové kinetice a celkově aktivační efekt vykazovaly mutace nacházející se ve smyčce interagující s allosterickými aktivátory (S64F, T65I, G68S). Efekt byl způsoben zvýšenou afinitou ke glukóze a sníženou mírou kooperativity enzymu, přičemž u mutace S64F jsme zjistili 20násobný nárůst aktivity enzymu. Zároveň u mutací v aktivační smyčce docházelo ke snížení kompetitivní inhibice. Zbývajících 15 mutací bylo ve vztahu k enzymatické aktivitě neutrálních. Avšak u poloviny z nich jsme pozorovali značné ovlivnění teplotní stability. Významnější ztrátu aktivity oproti divokému typu GCK vykazovaly při 45 °C po 100 minutách inkubace mutace R358P, E312K, V338L, zatímco mutace Q24H, R345H, K104E, S433N významně zvyšovaly stabilitu enzymu.

Závěr: Předkládaná studie prezentuje první data dokládající vliv somatických s nádory asociovaných mutací v *GCK* na kinetiku a stabilitu tohoto enzymu. Navazující experimenty se zaměří na vliv studovaných mutací na buněčné úrovni.

Reference:

- COSMIC, the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer, Dostupné z: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, Cit. 5. 3. 2018
- Šimčíková, D., Kocková, L., Vackářová, K., Těšínský, M., and Heneberg, P. (2017) Evidence-based tailoring of bioinformatics approaches to optimize methods that predict the effects of nonsynonymous amino acid substitutions in glucokinase. *Sci. Rep.* 7, 9499
- Gloyn, A. L., Odili, S., Buettger, C., Njolstad, P. R., Shiota, C., Magnuson, M. A., and Matschinsky, F. M. (2004) Glucokinase and the Regulation of Blood Sugar. in *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics*, pp. 92–109, KARGER, Basel



Obr. 5: Koncentrace inhibitoru N-acetylglucosaminu (GlcNAc) při níž je dosaženo 50% inhibice (IC_{50}). Naměřená data jsou porovnána s dříve publikovanými daty [2]. Mutace S64F, T65I, A454E se nacházejí v allosterické oblasti. Mutace F150L se nachází v místě vazby glukózy.