

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Lucie Kosinová

*Syntéza a charakterizace AibB8LysB28ProB29-insulinu za účelem studia významu
T a R konformací insulinu*

*Synthesis and characterization of AibB8LysB28ProB29-insulin to study T and R
conformations of insulin*

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

RNDr. Lenka Žáková, PhD.

Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, dne

Podpis:

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce-specialistce RNDr. Lence Žákové, PhD. za odborné vedení, velkou podporu, pomoc a trpělivost během mé bakalářské práce a vedoucí práce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za ochotu a laskavost. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Jiráčkovi CSc. za jeho pomoc a cenné rady v experimentální části práce a stejně tak i celému kolektivu skupiny Dr. Jiráčka ÚOCHB AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě děkuji také své rodině a blízkým za velkou podporu při studiu.

Obsah

Seznam použitých zkratek	5
1. ÚVOD.....	6
1.1. Historie.....	6
1.2. Struktura insulínu	7
1.2.1. Primární struktura	7
1.2.2. Sekundární a terciární struktura.....	8
1.2.3. Kvartérní struktura.....	9
1.3. Insulinový receptor.....	11
1.4. Interakce insulín-insulinový receptor.....	12
1.5. Mechanismus působení insulínu	12
1.6. Význam T a R konformací insulínu	13
1.7. Příprava insulínu a jeho analogů	14
1.7.1. Celková chemická syntéza.....	14
1.7.2. Biosyntéza metodami genového inženýrství	15
1.7.3. Semisyntéza	15
1.8. Insulinové analogy a modifikace v molekule insulínu.....	16
1.8.1. Analogy s modifikacemi v pozicích B8, B28 a B29.....	16
1.8.2. AibB8LysB28ProB29-insulín; stručný úvod do problematiky	18
2. CÍL PRÁCE.....	19
3. MATERIÁL	20
4. METODY	21
4.1. Příprava S-sulfonátu A řetězce a S-sulfonátu AibB8LysB28ProB29-B řetězce ..	21
4.1.1. Štěpení řetězců a konverze na S-sulfonáty	21
4.1.2. Gelová chromatografie	22
4.1.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi	22
4.1.4. Hmotnostní spektrometrie.....	23
4.2. Rekombinace řetězců	23
4.3. Příprava buněk pro vazebné testy	24
4.4. Testování vazebné afinity AibB8LysB28ProB29-insulínu <i>in vitro</i>	24
5. VÝSLEDKY.....	26
5.1. Příprava S-sulfonátu A řetězce a S-sulfonátu AibB8LysB28ProB29-B řetězce ..	26
5.1.1. Purifikace a identifikace řetězců.....	26
5.2. Rekombinace řetězců	28
5.3. Testování vazebné afinity AibB8LysB28ProB29-insulínu <i>in vitro</i>	31
6. Diskuse	33

Souhrn.....	36
Abstract.....	37
Reference	38

Seznam použitých zkratek

ACN – acetonitril

Aib – α -aminoisomáselná kyselina

Boc – terc-butyloxykarbonylová skupina

BSA – hovězí sérový albumin

DCM – dichlormethan

Dipea – *N,N*-diisopropylethylamin

DMF – *N,N*-dimethylformamid

DTT – dithiothreitol

EDT – ethandithiol

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

Fmoc – 9-fluorenyl-methoxykarbonylová skupina

GuaHCl – guanidin-hydrochlorid

Gly/NaOH pufr – glycinový pufr

HBTU – 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonová kyselina

HOBt – *N*-hydroxybenzotriazol

IUB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

Pbf – pentametyldihydrobenzofuran

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

tBu – terc-butylová skupina

TFA – trifluoroctová kyselina

TIS – triisopropylsilan

Tris – tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Trt – tritylová skupina

Dále jsou užívány třípísmenné zkratky aminokyselin podle doporučení IUPAC-IUB (1).

Pokud není uvedeno jinak, jedná se o aminokyseliny v L-formě.

1. ÚVOD

Insulin (z lat. *insula*, ostrov) je významný peptidický hormon produkovaný β -buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Základní funkcí insulinu je regulace vstupu molekul glukosy do buněk organismu, čímž dalece ovlivňuje metabolismus sacharidů a následně i proteinů a lipidů. Nedostatek insulinu, popř. neschopnost organismu efektivně využívat insulin, vyvolává onemocnění diabetes mellitus (cukrovka), které, pokud není léčeno, může skončit těžkým poškozením mnoha orgánů a následně i smrtí (2). Podle Mezinárodní diabetologické federace (International Diabetes Federation, IDF) žilo v roce 2010 na naší planetě 285 milionů lidí ve věku 20-79 let trpících diabetem. IDF zároveň odhaduje, že v roce 2030 vystoupá toto číslo na 438 milionů (3). Přestože primární struktura insulinu je známa již více než půl století, 3D-strukturu aktivní formy molekuly, stejně jako mechanismus interakce insulinu s jeho receptorem, se stále nepodařilo objasnit. Vyřešení těchto otázek by přitom mohlo pomoci nejen v porozumění působení tohoto hormonu, ale hlavně v samotné léčbě diabetu.

1.1. Historie

Objevení insulinu spadá do první čtvrtiny 20. století. Předcházely mu dlouholeté výzkumy diabetu, které postupně objasňovaly jednotlivé souvislosti. V roce 1889 v Německu Oskar Minkowski a Josef von Mering při pokusech na psech zjistili, že odstranění pankreatu způsobuje vznik onemocnění diabetes mellitus. Jejich další experimenty vedly k poznatku, že slinivka musí produkovat látku, jež ovlivňuje metabolismus sacharidů (4). Roku 1901 americký lékař Eugene Opie přišel na souvislost diabetu s Langerhansovými ostrůvkami pankreatu, když pozoroval jejich morfologické změny u pacientů trpících diabetem (5). V dalších letech se pak objevily pokusy o izolaci látky jako potencionálního léku. V roce 1906 německý lékař Georg Ludwig Zülzer po prvních úspěších v léčení diabetických psů extraktem z pankreatu telat aplikoval neúspěšně lék lidskému pacientovi (6). Úspěch v léčení lidských pacientů trpících diabetem slavili až o patnáct let později Kanadčan Frederick Banting a jeho asistent Charles Best, kterým se v létě roku 1921 podařilo izolovat čistý insulin, když podvázali vývody slinivky skotu (7). Tímto extraktem bostonský diabetolog Elliott P. Joslin začal léčit 14letého diabetika, který

díky této léčbě přežil ještě dalších 13 let. Za své objevy získali roku 1923 Banting a jeho kolegové Nobelovu cenu.

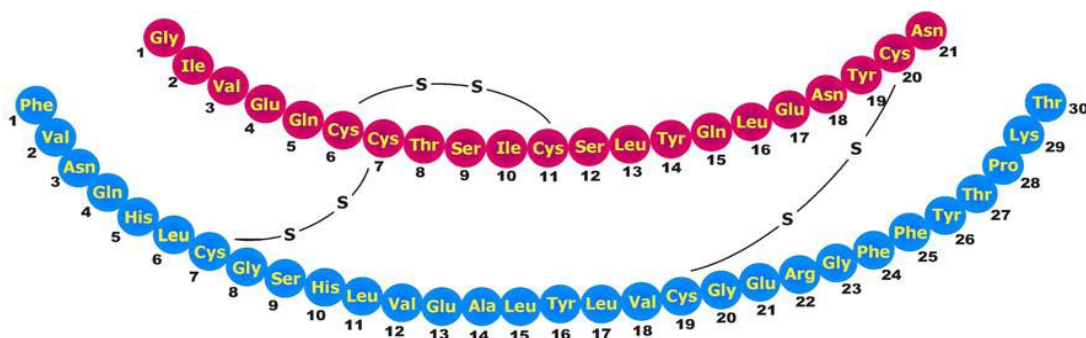
Roku 1926 americký biochemik John Jacob Abel jako první vykrytalizoval insulin a určil tvar jeho krystalu (8), roku 1934 pak britská vědkyně Dorothy Crowfoot Hodgkin pozorovala na krystalu insulinu první difrakci rentgenového záření (9). Roku 1951 Frederick Sanger se svými kolegy dinitrofenylovou metodou určil primární strukturu insulinu (10,11). Za svou práci obdržel roku 1958 Nobelovu cenu. Roku 1969 a v následujících letech publikovala skupina Dorothy Crowfoot Hodgkin z Oxfordu trojrozměrnou strukturu insulinu získanou pomocí rentgenostrukturní analýzy (12,13). Za určování struktury proteinů pomocí této metody získala vědkyně roku 1964 Nobelovu cenu. První syntetický insulin byl připraven na počátku šedesátých let 20. století nezávisle na sobě laboratořemi Panayotise Katsoyannise na univerzitě v Pittsburghu a Helmuta Zahna na univerzitě v německém městě Cáchy (14,15). Na konci 70. let byl pak lidský insulin poprvé syntetizován pomocí geneticky modifikovaných bakterií E. Coli (16).

V současné době je většina výzkumných center a také výroba insulinu úzce spjata především s farmaceutickými společnostmi, jako je např. Eli Lilly v USA nebo Novo Nordisk v Dánsku.

1.2. Struktura insulinu

1.2.1. Primární struktura

Insulin je polypeptid o relativní molekulové hmotnosti 5807. Skládá se ze dvou peptidových řetězců označovaných A a B (Obr. 1, str. 8). Řetězec A obsahuje 21 aminokyselin a má spíše kyselý charakter, zatímco řetězec B obsahuje 30 aminokyselin a má charakter mírně bazický. Oba řetězce jsou mezi sebou propojeny dvěma disulfidickými můstky mezi cysteiny v poloze A7-B7 a A20-B19. Řetězec A pak obsahuje jeden další disulfidický můstek mezi cysteiny v poloze A6-A11, důležitý pro správné skládání molekuly (11,17). Insuliny produkované různými organismy se zpravidla mezi sebou odlišují pouze v několika málo aminokyselinách (2). Molekula obsahuje úseky, které častěji podléhají mutacím, a naopak úseky, které jsou evolučně zafixované. Evolučně konzervované oblasti se nacházejí ve strukturně a funkčně důležitých částech molekuly a jejich změna má zpravidla fatální dopad na tvorbu či funkci insulinu (18).

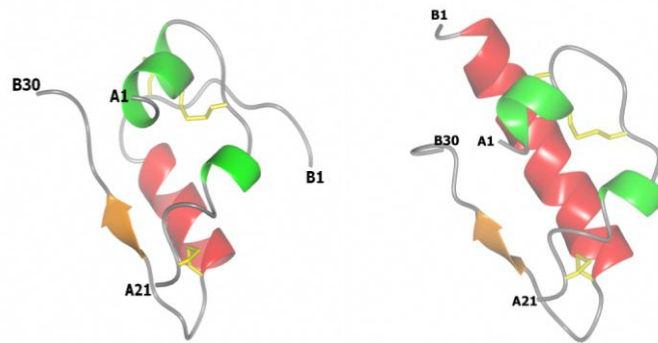


Obr. 1: Primární struktura lidského insulinu. A řetězec je znázorněn červeně, B řetězec modře. Převzato z (26).

První skupinou evolučně konzervovaných aminokyselin jsou ty, které tvoří jádro molekuly a napomáhají správnému skládání řetězců při tvorbě insulinu. Jsou to všechny cysteiny, leuciny A16, B6, B11 a B15, isoleucin A2, valin B18 a glyciny B8 a B23. Další skupinou jsou aminokyseliny, které jsou důležité jak při agregaci insulinu, tak při jeho interakci s receptorem. Jde zejména o aminokyseliny glycin A1, isoleucin A2, valin A3, tyrosin A19 a asparagin A21 z řetězce A a valin B12, tyrosin B16 a aromatický triplet fenylalanin B24, fenylalanin B25 a tyrosin B26 z řetězce B (17,19,20,21).

1.2.2. Sekundární a terciární struktura

V molekule insulinu se objevují strukturální oblasti α -šroubovice (α -helixu), β -struktury skládaného listu, β -otáčky, stejně jako rozvolněné struktury. Šroubovicová struktura přitom tvoří celkově asi 50-55% molekuly (22). Řetězec A obsahuje dvě α -helikální oblasti v pozicích A2-A8 a A13-A19 spojené β -otáčkou A9-A12. V řetězci B je dominantní centrální α -šroubovice B9-B19, za níž následuje β -otáčka B20-B23, na kterou navazuje C-konec B řetězce v β -strukturu skládaného listu. N-konec B řetězce se může nacházet ve dvou hlavních strukturálních stavech T a R (Obr. 2, str. 9). V T stavu (z angl. *tense*, napnutý) aminokyseliny B1-B8 nemají pevnou strukturu a nachází se ve formě volně nataženého řetězce. V R stavu (z angl. *relax*, uvolněný) přechází N-konec B řetězce do formy α -helixu a společně s aminokyselinami B9-B19 tvoří dlouhou α -šroubovicovou oblast B1-B19 (18,22).

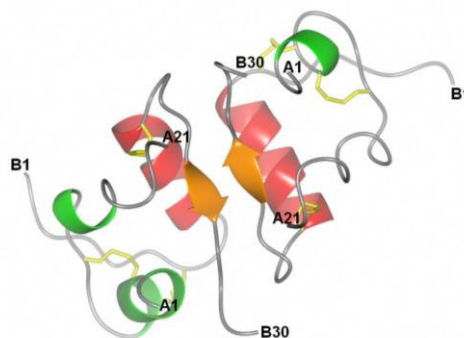


Obr. 2: Insulinový monomer v T stavu (vlevo) a R stavu (vpravo). A řetězec se dvěma α -helikálními strukturami je vyznačen zeleně, centrální α -helix B řetězce je vyznačen červeně a β -struktura skládaného listu na C-konci B řetězce oranžově. Žlutě jsou vyznačeny disulfidické můstky. Vytvořeno v programu CCP4MG.

1.2.3. Kvartérní struktura

Biologicky aktivní formou insulinu je monomer, v této podobě se však molekula vyskytuje pouze při koncentracích nižších než 10^{-7} M při neutrálním pH. Při vyšších koncentracích insulinu dochází k dimerizaci a v přítomnosti Zn^{2+} iontů se tři dimery spojují v hexamer. Hexamerní insulin je biologicky významný, neboť v této formě je hormon skladován v pankreatu (18).

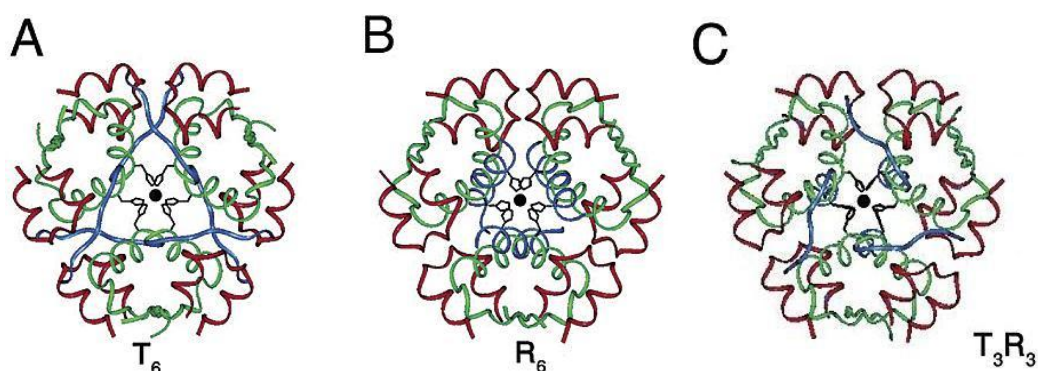
Dimer insulinu je tvořen dvěma molekulami s mírně rozdílnou konformací, označovanými jako molekula I a II, uspořádanými kolem dvoučetné rotační osy. Dimer tak vytváří antiparalelní strukturu β -skládaného listu (Obr. 3), jež je stabilizována čtyřmi vodíkovými můstky mezi aminokyselinami B24 a B26. Mimo to mezi oběma molekulami existuje řada van der Waalsových vazeb mezi nepolárními aminokyselinovými zbytky. Dimerizací dochází ke skrytí dvou nepolárních oblastí monomerů a dimer insulinu se tak stává více polární (22,18,23).



Obr. 3: Insulinový dimer (T stav). Antiparalelní β -struktura C-konců B řetězců je vyznačena oranžově. Vytvořeno v programu CCP4MG.

Uspořádáním tří dimerů podél trojčetné osy souměrnosti vzniká insulinový hexamer. Na ose symetrie se nalézají dva Zn^{2+} ionty, z nichž každý je koordinován pomocí tří imidazolových skupin histidinů B10 (z každého dimeru jeden) a třemi molekulami vody. Centrum hexameru je obklopeno šesti molekulami kyseliny glutamové B13 uspořádanými po dvojicích (dvě z každého dimeru) do kruhu. Tyto zbytky jsou v přímém kontaktu a vytvářejí mezi sebou tři vodíkové vazby. Kontakty mezi molekulami v hexameru jsou však celkově mnohem slabší než v dimeru (18,22,24).

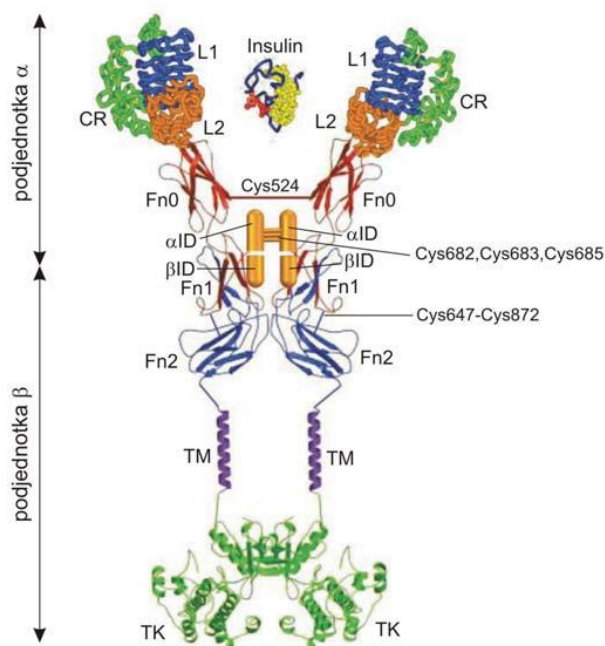
Hexamer může existovat ve třech různých stavech podle toho, v jaké konformaci se nachází N-konec B řetězce (18). Hexamer vázající 2 atomy Zn^{2+} má konformaci T_6 a všechny N-konce B řetězců molekul insulinu se tudíž nacházejí ve stavu T (Obr. 4A). Hexamer v přítomnosti fenolu má konformaci R_6 a všechny N-konce jsou ve stavu R (Obr. 4B). Mimo to se může ještě vyskytovat stav T_3R_3 , který se objevuje, pokud hexamer koordinuje čtyři atomy Zn^{2+} . V tomto případě se tři N-konce B řetězců nacházejí ve stavu T a tři ve stavu R (Obr. 4C).



Obr. 4: Krystalové struktury insulinu. Černé body uprostřed značí atomy zinku. (A) T_6 konformace hexameru vázajícího 2 atomy zinku, (B) R_6 konformace hexameru v přítomnosti fenolu, (C) T_3R_3 konformace hexameru vázajícího 4 atomy zinku. A řetězec je zobrazen červeně, B řetězec (mimo B1-B8) je zobrazen zeleně a oblast B1-B8 modře. Upraveno podle (26).

1.3. Insulinový receptor

Insulin putuje krevním řečištěm k cílovým buňkám, kde se váže na insulinový receptor. Ten se nachází v různých koncentracích ve všech tkáních obratlovců. Jedná se o membránový glykoprotein patřící do skupiny tyrosinkinasových receptorů, jeho relativní molekulová hmotnost je 460 kDa a poločas života 7 hodin. Receptor se skládá ze dvou α a dvou β podjednotek spojených vzájemně disulfidickými můstky, přičemž podjednotky α jsou extracelulární, zatímco podjednotky β jsou částečně extra- a částečně intracelulární. Spojením α a β podjednotky disulfidickým můstkem na cysteinech 647-872 vzniká heterodimer a spojením dvou heterodimerů čtyřmi disulfidickými můstky vzniká heterotetramer, který je schopen vázat molekulu insulinu. Na podjednotkách receptoru insulinu je možné rozlišit několik domén (Obr. 5). Jsou to dvě velké homologní domény L1 a L2, menší doména CR (cystein-rich) umístěná mezi nimi, dále pak tři domény fibronektinu typu III Fn0, Fn1 a Fn2, transmembránová doména TM a intracelulární tyrosinkinasová doména TK vykazující enzymatickou aktivitu (27,28).



Obr. 5: Modelová struktura heterotetrameru insulinového receptoru s vyznačenými disulfidickými můstky. L1, L2 – homologní domény; CR – doména bohatá na cystein; Fn0, Fn1, Fn2 – domény fibronektinu typu III; α ID – vložená doména α podjednotky; β ID – vložená doména β podjednotky; TM – transmembránová doména; TK – tyrosinkinasová doména. Převzato z (28).

1.4. Interakce insulin-insulinový receptor

Za pomoci cílených mutací v molekule insulinu bylo zjištěno, jaké části molekuly jsou zodpovědné za vazbu na receptor. Jedná se především o invariantní aminokyseliny umístěné převážně na povrchu molekuly - konkrétně glycin A1, isoleucin A2, valin A3, glycin A5, tyrosin A19 a asparagin A21, leucin B6, valin B12, tyrosin B16, glycin B23, fenylalanin B24, fenylalanin B25 a tyrosin B26 (27,28). Aminokyseliny v polohách A1 až A3 jsou však ve známých krystalových strukturách insulinu stíněny C-koncovou částí B řetězce, a proto se předpokládá, že molekula insulinu musí při vazbě na receptor (či před vazbou na receptor) podléhat strukturním změnám vedoucím k vytvoření tzv. aktivní formy insulinu (29). Za jednu z nejdůležitějších částí molekuly, co se týče vazby na receptor, je považován právě C-konec B řetězce, tedy aminokyseliny B23 až B26, kde pravděpodobně dochází k primárnímu kontaktu s vazebným místem na receptoru. Předpokládá se, že po navázání insulinu na receptor dochází k odklonu C-konce B řetězce od centrální části molekuly, čímž dojde k odhalení dalších oblastí (např. aminokyselin A1-A3) potřebných pro interakci s receptorem.

Vazebná místa na insulinovém receptoru byla zkoumána různými metodami, od záměn jednotlivých aminokyselin přes afinitní značení až po alaninovou mutagenézi (27,28). Zjistilo se, že molekula insulinu se váže na dvě různé části dvou heterodimerů insulinového receptoru, k zajištění úplné afinity k receptoru je tudíž zapotřebí celý heterotetramer. Jeden heterodimer receptoru je také schopen vázat insulin, ovšem s nízkou afinitou. Navázáním jedné molekuly insulinu na receptor tedy dochází ke snížení afinity pro navázání dalších molekul – tento jev se nazývá negativní kooperativita (28).

1.5. Mechanismus působení insulinu

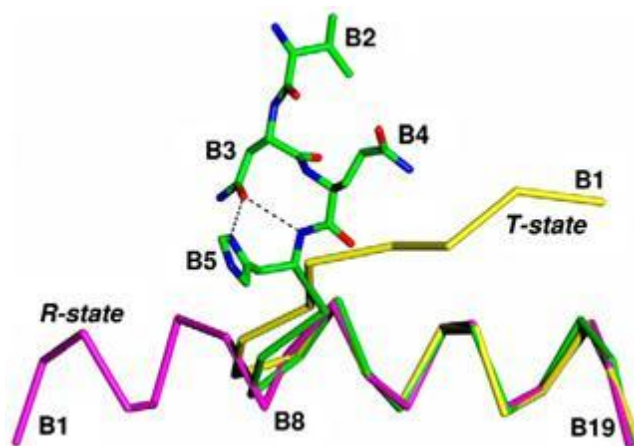
Buněčná membrána je kromě jaterních a mozkových buněk pro glukosu nepropustná. K její inkorporaci do buňky slouží specifické membránové přenašeče označované jako GLUT1-14. Nejdůležitější z nich je GLUT4, který zprostředkovává na insulinu závislý vstup glukosy do většiny buněk těla, především do buněk svalových a tukových. Navázání insulinu na receptor spustí širokou kaskádu následných reakcí. Po autofosforylaci tyrosinových zbytků na tyrosinkinasové doméně samotného receptoru dochází k rychlé fosforylaci proteinů IRS (insulin receptor substrates), dále pak ke

stimulaci fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3-K) a řady dalších proteinkinasy, až nakonec dojde k vyvolání translokace váčků s glukosovými přenašeči GLUT4 k membráně. Zde jsou přenašeče zabudovány do membrány a mohou odchyťovat molekuly glukosy z krve a přenášet je do nitra buňky (30,31).

1.6. Význam T a R konformací insulínu

Jak již bylo řečeno, N-konec B řetězce insulínu se může nacházet ve dvou základních strukturních stavech T a R (Obr. 2, str. 9). V T stavu se aminokyseliny B1-B8 nachází ve formě volně nataženého řetězce, v R stavu přechází do formy α -helixu a společně s aminokyselinami B9-B19 tvoří dlouhou šroubovicovou oblast B1-B19. Nejdůležitější aminokyselinou pro T/R přechod je glycin v pozici B8, kde dochází k ohybu peptidového řetězce v závislosti na T a R konformaci (32).

Biologický význam jednotlivých konformací N-konce B řetězce nebyl doposud objasněn a zůstává předmětem výzkumu. V různých studiích bylo prokázáno, že ve vodném roztoku je nativní hormon nejpravděpodobněji přítomen v T stavu; zároveň ale bylo zjištěno, že T konformace nativního insulínu je stejná jako konformace neaktivního insulinového analogu (29,33). Na základě těchto informací tedy nebylo možné rozhodnout, která z konformací je při vazbě insulínu na receptor preferována. Jednou z možností je, že oba stavy jsou nezbytné pro správnou biologickou účinnost hormonu. Nedávné studie ukázaly, že některé přirozeně se vyskytující mutace insulínu znesnadňují přechod mezi T a R stavem a vedou k neonatálnímu diabetu (34). Navíc v krystalových strukturách některých vysoce potentních analogů insulínu modifikovaných v C-konci B řetězce byla pozorována další strukturní forma N-konce B řetězce lišící se od klasické T a R konformace (35). Tato struktura je charakterizována pseudo β -otáčkou v poloze B5 a tvoří tak jakýsi přechod mezi stavy T a R (Obr. 6, str. 14).



Obr. 6: Unikátní konformace N-konce B řetězce vysoce potentního [MMeAlaB26]DTI-NH₂-insulinu. Pseudo β-otáčka analogu je zobrazena zeleně (pro rezidua v polohách B2-B5 jsou zobrazeny jednotlivé atomy). Struktura oblasti B1-B19 typická pro T stav insulinu je zobrazena žlutě, struktura typická pro R stav růžově. Vodíkové vazby jsou naznačeny přerušovanou čarou. Převzato z (35).

1.7. Příprava insulinu a jeho analogů

1.7.1. Celková chemická syntéza

Celková chemická syntéza insulinu byla vyvinuta v 60. letech 20. století (14,15). Jedná se o metodu přípravy insulinových analogů, která umožňuje substituce nekódovanými nebo modifikovanými aminokyselinami a to kdekoliv v molekule insulinu. Právě možnost substituce nepřírozenými aminokyselinami je hlavní výhodou oproti rekombinantní přípravě insulinu v geneticky modifikovaných mikroorganismech. Jedná se však o metodu finančně, časově i metodicky náročnou.

Při celkové chemické syntéze insulinu se nejprve musí připravit jednotlivé řetězce A a B. Příprava řetězců probíhá metodou syntézy na pevné fázi od C-konce peptidu (36). Ta je založena na postupném připojování aminokyselin chráněných na α-aminoskupině k předchozí aminokyselině, přičemž C-konec peptidu je ukotven na polymerním nosiči. V případě použití aminokyselin s postranním řetězcem obsahujícím funkční skupinu je nutné použít i postranní chránění těchto skupin. K dočasnému chránění α-aminoskupin se používá většinou acidolabilní skupina terc-butyloxykarbonyl (Boc) nebo naopak bazickolabilní skupina 9-fluorenyl-methoxykarbonyl (Fmoc) (36,37). Po odstranění N-α-chránící skupiny může být připojena další chráněná aminokyselina použitím

kondenzačních činidel. Po syntéze celého řetězce je peptid odštěpen nejprve z polymerního nosiče a následně jsou odstraněny chránící skupiny postranních řetězců.

Rozhodujícím krokem syntézy insulínu je spojení obou řetězců za správného uspořádání disulfidických můstků mezi cysteiny. Řetězce A (se 4 cysteiny) a B (se 2 cysteiny) mohou po oxidaci vytvořit velké množství kombinací disulfidických můstků, z nichž ovšem jen jedna je správná a biologicky aktivní. Nejpoužívanější je metoda dle Chance et al. (38), která využívá přirozené schopnosti řetězců insulínu spontánně se formovat do správného 3D-uspořádání. Řetězce A a B jsou syntetizovány ve formě S-sulfonátů, které jsou stále vůči oxidaci a snadno přečistitelné. Dalším krokem je pak stechiometrická redukce S-sulfonátů na volné SH skupiny a následná oxidace vzdušným kyslíkem za pozvolného formování disulfidických můstků. Tato metoda je poměrně jednoduchá a poskytuje uspokojivé výtěžky insulínu (38). Touto metodou byla připravena řada analogů (58,59) a byla použita i při přípravě analogu insulínu v mojí práci.

1.7.2. Biosyntéza metodami genového inženýrství

Metoda biosyntézy insulínu pomocí mikroorganismů (bakterií či kvasinek) se používá hlavně pro průmyslovou přípravu lidského insulínu, neboť poskytuje možnost vyrábět lidský insulín prakticky v neomezeném množství (39). Uměle vyrobený plasmid s genetickým kódem pro požadovaný polypeptid je vpraven do mikroorganismu, kde je následně exprimován. Někdy je tato metoda využívána také pro přípravu analogů se záměnami v peptidovém řetězci, na rozdíl od jiných způsobů přípravy je však použitelná pouze pro substituce přirozenými aminokyselinami (40,41).

1.7.3. Semisyntéza

Tato metoda poskytuje poměrně snadný způsob přípravy lidského insulínu z insulínů produkovaných jinými organismy a také výroby analogů. Nejčastěji spočívá v odštěpení koncové části C-konce B řetězce insulínu proteasou (např. trypsin, pepsin) a následném připojení modifikovaného peptidu s požadovaným pořadím aminokyselin stejnou proteasou za pozměněných reakčních podmínek (např. přítomnost organického rozpouštědla, rozdílné pH apod.) (42). Takto lze například připravit z vepřového insulínu

lidský, protože vepřový insulin se od lidského odlišuje pouze aminokyselinou v pozici B30, kde obsahuje alanin místo threoninu (43). Metoda je ovšem limitována pouze na určité úseky molekuly insulinu (např. C-koncový oktapeptid B řetězce).

1.8. Insulinové analogy a modifikace v molekule insulinu

Analogy insulinu byly a jsou připravovány nejen za účelem nalezení vhodných látek k léčbě diabetu, ale hlavně také kvůli porozumění mechanismu působení insulinu a jeho interakce s insulinovým receptorem. Modifikacemi jednotlivých aminokyselin v řetězcích insulinu a zjišťováním jejich vlivu na biologickou účinnost tohoto hormonu lze získat důležité informace o funkci daných aminokyselin v molekule.

Zkoumáním přirozeně se vyskytujících nefunkčních analogů insulinu, vznikajících genetickými mutacemi, bylo zjištěno, že tyto insuliny obsahují modifikace ve vysoce konzervovaných úsecích insulinové molekuly (44,45). Mimo přirozeně se vyskytující insulinové mutanty bylo do dnešního dne připraveno již mnoho desítek analogů insulinu s modifikacemi v různých částech molekuly (46). Výzkumy se přitom zaměřují především právě na analogy s modifikacemi v konzervovaných sekvencích aminokyselin, u kterých se předpokládá vliv na biologickou aktivitu hormonu.

V podstatě všechny modifikace v evolučně konzervovaných pozicích insulinu v obou řetězcích vedou k fatální ztrátě biologické aktivity a afinity vůči receptoru (46). V mojí práci se blíže zaměřím pouze na analogy vztahující se k pozicím B8, B28 a B29.

1.8.1. Analogy s modifikacemi v pozicích B8, B28 a B29

Zajímavý dopad na molekulu insulinu má záměna lysinu a prolinu v pozicích B28 a B29. Výměnou těchto aminokyselin vznikají sterické překážky a zanikají specifické kontakty prolinu, čímž se snižuje schopnost analogu vytvářet dimery (47). Takto modifikovaný insulin má *in vivo* velmi rychlý nástup účinku a zároveň velmi krátkou dobu trvání, a je tedy vhodný pro rychlé snížení hladiny glukosy při léčbě diabetu. Tento analog byl pod názvem Humalog® jako první uveden do klinické praxe. Stejný účinek má i analog Aspart, který má prolin v poloze B28 nahrazen kyselinou asparagovou (48).

Biologická účinnost a vazebná afinita těchto analogů je přitom přibližně stejná jako účinnost lidského insulinu.

Kvůli objasnění strukturní funkce glycinu v pozici B8 při přechodu mezi T a R stavem byla připravena řada analogů se záměnou v této pozici, z nichž nejdůležitější jsou uvedeny v Tabulce 1. Obecně lze říci, že evolučně konzervovaný glycin v této pozici je naprosto nenahraditelný a jakákoliv záměna vede k výraznému snížení jak aktivity a afinity analogu, tak i jeho strukturní stability (49, 50).

Tabulka 1: Nejdůležitější analogy insulinu s modifikací v poloze B8 a jejich vazebná afinita vzhledem k insulinu.

analog insulinu	vazebná afinita (%)	citace
insulin	100	
[AlaB8]insulin	1,0	51
[D-AlaB8]insulin	0,11	51
[AlaB8]DKP-insulin	3,6	51
[D-AlaB8]DKP-insulin	0,17	51
[L-SerB8]DKP-insulin	90	51
[D-SerB8]DKP-insulin	1,1	51
[D-ArgB8]DKP-insulin	0,05	51
[SerB8]insulin	23	49
[ThrB8]insulin	< 0,2	49
[LeuB8]insulin	< 0,2	49
[D-LysB8]insulin	< 0,5	52
[D-TrpB8]insulin	< 0,6	52

Pozn.: DKP-insulin je analog insulinu, který byl vytvořen pro studium insulinového monomeru a procesů agregace. Obsahuje modifikace v pozicích AspB10, LysB28 a ProB29, které velmi výrazně snižují agregaci insulinu. Má vyšší afinitu k insulinovému receptoru (cca 180%) než nativní insulin a jeho další analogy se často používají ke strukturně-aktivitním studiím (53).

1.8.2. *AibB8LysB28ProB29-insulin; stručný úvod do problematiky*

Jak již bylo řečeno, význam T a R konformace insulínu nebyl doposud objasněn. Z velkého množství struktur získaných rentgenostrukturní analýzou a ze spekter získaných cirkulární difrakcí je známo, že R konformace u insulínu je dosaženo pouze přidáním aditiv, jako jsou např. malé cyklické alkoholy (fenol, kresol, resorcinol atd.) (54). Tyto látky se vážou na specifická místa v insulínové molekule a umožňují přechod N-konce B řetězce do stavu R. Přirozeně se insulín nachází v T stavu, přičemž získání a biologická charakterizace insulínu v R stavu bez přidání stabilizačních látek by byly velkým příslibem pro objasnění významu T a R konformací insulínu.

Kyselina α -aminoisomáselná neboli kyselina 2-amino-2-methylpropanová (Aib) je neproteinogenní achirální aminokyselina, v přírodě jen zřídka se vyskytující jako součást některých antibiotik produkovaných nižšími houbami. Tato aminokyselina může díky své stereochemii zaujmout v polypeptidickém řetězci pouze konformaci pravo- nebo levotočivé šroubovice, čímž velmi silně indukuje α -helikální strukturu u následujících aminokyselin. Díky této vlastnosti se Aib používá v syntéze proteinů k vytvoření či stabilizaci šroubovicové struktury v peptidovém řetězci (55).

Zabudováním kyseliny α -aminoisomáselné do polypeptidického řetězce insulínu tedy můžeme předpokládat indukci α -šroubovicové struktury v dané oblasti. Pokud budeme touto aminokyselinou substituovat glycin v poloze B8, mohli bychom získat insulín se stabilní α -helikální strukturou v celém úseku B1-B19, tedy insulín v R stavu. Zjištěním vazebné afinity tohoto insulínu bychom pak mohli získat informace o preferenci/akceptovatelnosti R konformace insulínu při vazbě na receptor.

Jak je uvedeno výše, záměna lysinu v pozici B29 s prolinem v pozici B28 velmi výrazně (300x) snižuje agregační schopnosti insulínu (47). Této vlastnosti se využívá při přípravě analogů insulínu, u kterých by tvorba dimeru byla na obtíž při následných fyzikálně-chemických analýzách, jako je např. nukleární magnetická rezonance.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byla příprava a charakterizace AibB8LysB28ProB29-insulinu za účelem získání informací, které by mohly přispět k objasnění významu T a R konformací insulinu.

1. Příprava AibB8LysB28ProB29-insulinu celkovou chemickou syntézou.
2. Zjištění vazebné afinity AibB8LysB28ProB29-insulinu.

3. MATERIÁL

ACN – Scharlau Chemie, Sentmenat, Španělsko

BSA – Invitrogen, Carlsbad, California, USA

diethylether – Penta, Chrudim, ČR

Dipea – Aldrich, Milwaukee, USA

DMF – Fluka, Buchs, Švýcarsko

DTT – Sigma, St. Louis, USA

EDT – Fluka, Buchs, Švýcarsko

fenol – Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Fmoc-chráněné aminokyseliny – Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko

glukosa – Sigma, St. Louis, USA

Gly – Sigma, St. Louis, USA

Gua – Sigma, St. Louis, USA

HCl – Penta, Chrudim, ČR

HBTU – Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko

HEPES – Sigma, St. Louis, USA

hydrogenuhlíčitán amonný – Sigma, St. Louis, USA

hydroxid sodný – Penta, Chrudim, ČR

chlorid draselný – Sigma, St. Louis, USA

chlorid sodný – Penta, Chrudim, ČR

lidský insulin – Sigma, St. Louis, USA

lidský insulin značený radioizotopem ^{125}I – Perkin Elmer, Waltham, USA

octan sodný – Lachema, Neratovice, ČR

Sephadex G10, Sephadex G 50 – Pharmacia, Uppsala, Švédsko

siřičitan sodný – Sigma, St. Louis, USA

síran hořečnatý – Fluka, Buchs, Švýcarsko

tetrathionan sodný – Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

TFA – Fluka, Buchs, Švýcarsko

thioanizol – Fluka, Buchs, Švýcarsko

TIS – Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Tris – Sigma, St. Louis, USA

Wangova pryskyřice – Fmoc-Thr/Asn(tBu)-Wang resin, Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko

4. METODY

4.1. Příprava S-sulfonátu A řetězce a S-sulfonátu AibB8LysB28ProB29-B řetězce

Oba řetězce byly syntetizovány v servisním pracovišti Syntéza peptidů ÚOCHB AV ČR na automatizovaném syntetizátoru ABI 433A od firmy Applied Biosystems. Příprava probíhala metodou syntézy na pevné fázi podle Merrifielda (36) s použitím Fmoc chránící strategie. Tato strategie využívá jako semipermanentní N-koncovou chránící skupinu 9-fluorenyl-methoxykarbonyl (Fmoc) (37), který je odštěpitelný v bazickém prostředí. K chránění postranních skupin jednotlivých aminokyselin byly použity skupiny Boc, tBu, Trt a Pbf. Použitou pryskyřicí byla předem substituovaná Wangova pryskyřice (s předem připojeným threoninem pro B řetězec a asparaginem pro A řetězec). Syntéza byla prováděna v 0,1 mmol měřítku.

Každý kondenzační cyklus byl proveden 1-2x (délka trvání 30 minut), přičemž bylo vždy přidáno 10násobné množství dané Fmoc-chráněné aminokyseliny. Jako kondenzační činidla byly použity HBTU, HOBt a Dipea v DMF. Po navázání všech aminokyselin byl výsledný produkt promyt DCM a navázaný na pryskyřici předán k dalšímu použití.

4.1.1. Štěpení řetězců a konverze na S-sulfonáty

Štěpící směs použitá k odštěpení jednotlivých řetězců z pryskyřice a zároveň k odštěpení chránících skupin byla připravena smícháním 21 ml TFA, 0,75 ml vody, 0,75 ml thioanizolu, 0,375 ml EDT, 0,75 g fenolu a 0,15 ml TIS. Směs byla smíchána s řetězcem a za stálého míchání ponechána 2 hodiny za pokojové teploty. Poté byla zfiltrována přes fritu velikosti S3 do 200 ml studeného diethyletheru za stálého chlazení v ledové lázni, čímž vznikla sraženina peptidu. Sraženina byla dále přefiltrována přes fritu velikosti S4, propláchnuta větším množstvím studeného diethyletheru a následně vysušena.

Řetězce s volnými SH skupinami byly následně převedeny na S-sulfonáty použitím sulfitylyzačního pufru o složení 100 mM Tris, 250 mM siřičitan sodný, 80 mM tetrathionan sodný a 7 M GuaHCl. Jeho pH bylo upraveno pomocí HCl na hodnotu 8,6. Sraženina peptidu byla rozpuštěna ve 25 ml tohoto pufru a směs byla míchána 3 hodiny za pokojové teploty.

4.1.2. Gelová chromatografie

Peptid v sulfitolyzačním roztoku byl odsolen na nízkotlaké chromatografické koloně Sephadex G10 o celkovém objemu 1000 ml. Gelová chromatografie probíhala za pokojové teploty, mobilní fází byl 50 mM hydrogenuhličitán amonný, rychlost průtoku 0,7 ml/min, frakce byly jímány pomocí automatického sběrače frakcí po 15 minutách. Po skončení chromatografie byla proměřena absorbance jednotlivých frakcí na spektrofotometru Lambda 25 od firmy Perkin Elmer při vlnové délce 276 nm. Frakce obsahující příslušný insulinový řetězec byly spojeny a lyofilizovány. Lyofilizát byl následně rozpuštěn v roztoku obsahujícím asi 50% ACN v 0,1% TFA v deionizované vodě a přečištěn pomocí preparativního provedení RP-HPLC.

4.1.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) byla prováděna na přístrojích firmy Waters (čerpadlo Waters 600, UV/VIS detektor Waters 2487). Data byla zpracována chromatografickým programem Clarity Lite od firmy Data Apex.

Analytické provedení HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC)

Pro analýzu reakční směsi a ověření čistoty jednotlivých řetězců i výsledného analogu pomocí analytického provedení RP-HPLC byla použita analytická kolona Nucleosil 120-5-C18 o rozměru 250 × 4 mm firmy Watrex. Gradientová eluce (Tab. 2, str. 23) byla prováděna roztokem o stoupající koncentraci ACN v deionizované vodě obsahující 0,1% TFA. Průtok byl 1 ml za minutu. Absorbance eluátu byla proměřována při vlnových délkách 218 a 276 nm.

Preparativní provedení HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC)

Po odsolení gelovou chromatografií byly jednotlivé řetězce stejně tak jako výsledný analog purifikovány a izolovány pomocí preparativního provedení RP-HPLC. Byly k tomu použity preparativní kolony Nucleosil 120-5-C18 firmy Watrex – pro preparaci řetězců rozměr 250 × 21 mm (průtok 9 ml/min), pro preparaci analogu rozměr 250 × 8 mm (průtok 3 ml/min). Gradientová eluce (Tab. 2, str. 23) byla prováděna roztokem o stoupající koncentraci ACN v deionizované vodě obsahující 0,1% TFA. Absorbance eluátu byla proměřována při vlnové délce 218 a 276 nm.

Tabulka 2: Gradientové eluce použité při RP-HPLC. Gradient 1 byl použit pro analytické provedení a při preparaci výsledného analogu, gradient 2 byl použit pro preparaci jednotlivých řetězců.

gradient 1							
čas (min)	0	1	21	35	36	37	37,1
obsah ACN (%)	8	28	36	44	72	72	8
gradient 2							
čas (min)	0			30		31	
obsah ACN (%)	8			80		8	

4.1.4. Hmotnostní spektrometrie

Identifikace jednotlivých řetězců i výsledného analogu byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie v Laboratoři hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR na přístroji LTQ Orbitrap XL od firmy Thermo Fisher Scientific. Jedná se o hybridní hmotnostní spektrometr pracující s Fourierovou transformací a kombinující metody lineární iontové pasti a orbitrapu (elektrostatická past), který běžně dosahuje přesnosti lepší než 5 ppm.

4.2. Rekombinace řetězců

Rekombinační reakce, při které se spojí A a B řetězce insulinu a vytvoří se tři vodíkové můstky (dva mezi řetězci A a B a třetí v řetězci A), je rozdělena do dvou částí: redukce a oxidace. V první části dochází k redukci S-sulfonátových skupin řetězců za vzniku SH skupin, které jsou pak v druhé části podrobeny pomalé oxidaci vzdušným kyslíkem za vzniku disulfidických můstků.

Redukce

Řetězce A a AibB8LysB28ProB29-B byly rozpuštěny v odvzdušněném 0,1 M Gly/NaOH pufru o pH 10,5 a smíchány v hmotnostním poměru 2:1. Přesná koncentrace řetězců byla stanovena spektrofotometricky na spektrofotometru Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) a podle ní bylo vypočteno množství DTT odpovídající 1,3 ekvivalentu SH skupin obsažených v řetězcích. DTT byl rozpuštěn ve stejném odvzdušněném 0,1 M Gly/NaOH pufru a přidán k řetězcům. Směs byla míchána 15 minut bez přístupu vzduchu za pokojové teploty.

Oxidace

Redukce byla ukončena přidáním 1,5násobku objemu zavzdušněného 0,1 M Gly/NaOH pufru o pH 10,5. Směs byla za stálého míchání za přístupu vzduchu ponechána v 5°C po dobu 2-4 dní. Poté byla oxidace ukončena přidáním 3 ml 99% kyseliny octové.

Po ukončení rekombinace byla směs nanesena na nízkotlakou chromatografickou kolonu Sephadex G50 medium o celkovém objemu 500 ml. Gelová chromatografie probíhala za pokojové teploty, mobilní fází byla 1 M kyselina octová, rychlost průtoku 0,5 ml/min, frakce byly jímány pomocí automatického sběrače frakcí po 12 minutách. Po skončení chromatografie byla proměřena absorbance jednotlivých frakcí na spektrofotometru při vlnové délce 276 nm. Frakce obsahující příslušný insulinový řetězec byly analyzovány pomocí analytického provedení RP-HPLC (viz 4.1.3.), spojeny a lyofilizovány. Lyofilizát byl následně rozpuštěn v roztoku obsahujícím asi 80% ACN v 0,1% TFA v deionizované vodě a analog byl izolován pomocí preparativního provedení RP-HPLC (viz 4.1.3.).

4.3. Příprava buněk pro vazebné testy

Buněčná linie IM-9 byla pěstována podle doporučení dodavatele ATCC (Manassas, USA; LGC Standards, Poland). Buňky rostly při teplotě 37°C ve zvlhčené atmosféře se zvýšeným obsahem CO₂ (5%) v médiu RPMI-1640 obsahujícím 10% BSA, 100 U/ml penicilinu/streptomycinu a 2 mM Gln (všechny chemikálie od firmy Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Buňky byly pasážovány 3x týdně.

4.4. Testování vazebné afinity AibB8LysB28ProB29-insulinu *in vitro*

Testování vazebné afinity insulinového analogu k insulinovému receptoru probíhá jako kompetice mezi analogem a insulinem značeným radioaktivním izotopem ¹²⁵I na tyrosinu v poloze A14 o vazebná místa na insulinovém receptoru. Testování se provádí na lidských lymfocytech IM-9, které jsou bohaté na insulinový receptor typu A. Testování probíhá za stálé koncentrace značeného insulinu a stejného množství buněk IM-9 a rostoucí koncentrace testovaného insulinu nebo jeho analogu. Testování bylo provedeno

metodou dle De Meytse (56). Buňky o koncentraci 2 miliony/ml byly inkubovány s rostoucí koncentrací insulinu resp. insulinového analogu a značeným lidským ^{125}I -insulinem (20 000 cpm) o konstantní koncentraci. Reakce probíhala ve vazebném pufru o následujícím složení: 100 mM HEPES, 100mM chlorid sodný, 5 mM chlorid draselný, 1,3 mM síran hořečnatý, 1 mM EDTA, 10 mM glukosa, 15 mM octan sodný a 1% BSA v celkovém objemu 500 μl při pH 7,6 a teplotě 15°C po dobu 2,5 hodiny. Po ukončení inkubace byly připraveny duplikáty o objemu 200 μl a centrifugovány při 15 000 g a 4°C po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán a radioaktivita navázaná v peletách byla stanovena pomocí γ -počítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, USA). Vazebná data byla analyzována programem GraphPad Prism 5.0 metodou analýzy podle modelu vazby do jednoho vazebného místa (one-site fitting model).

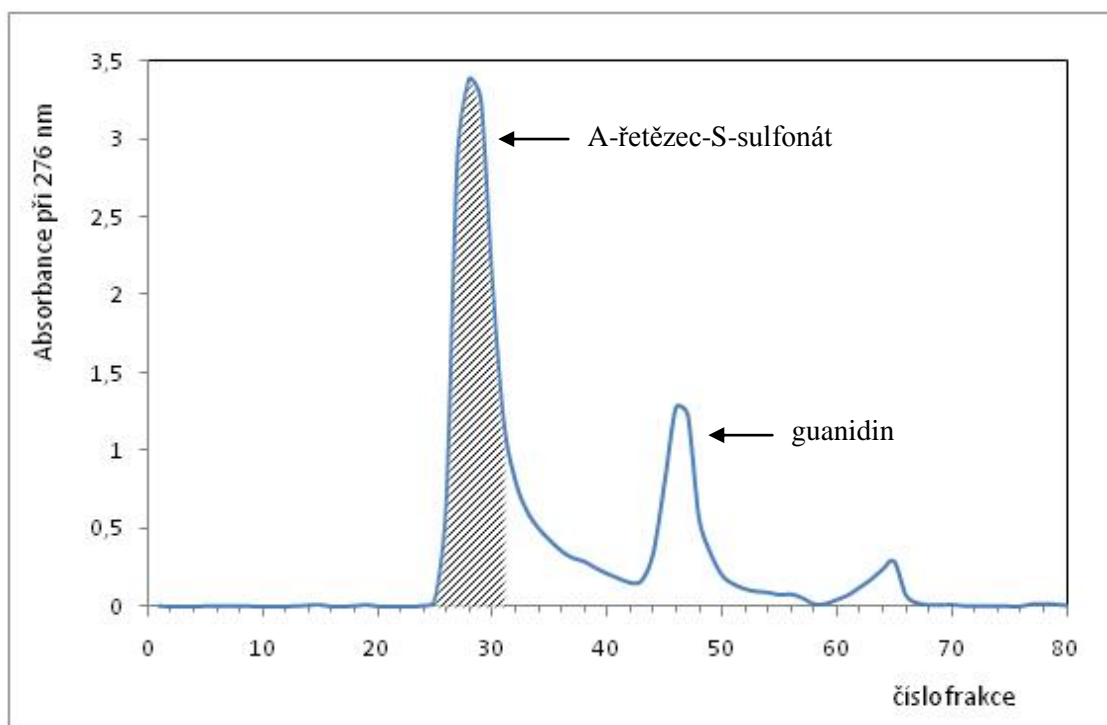
5. VÝSLEDKY

5.1. Příprava S-sulfonátu A řetězce a S-sulfonátu AibB8LysB28ProB29-B řetězce

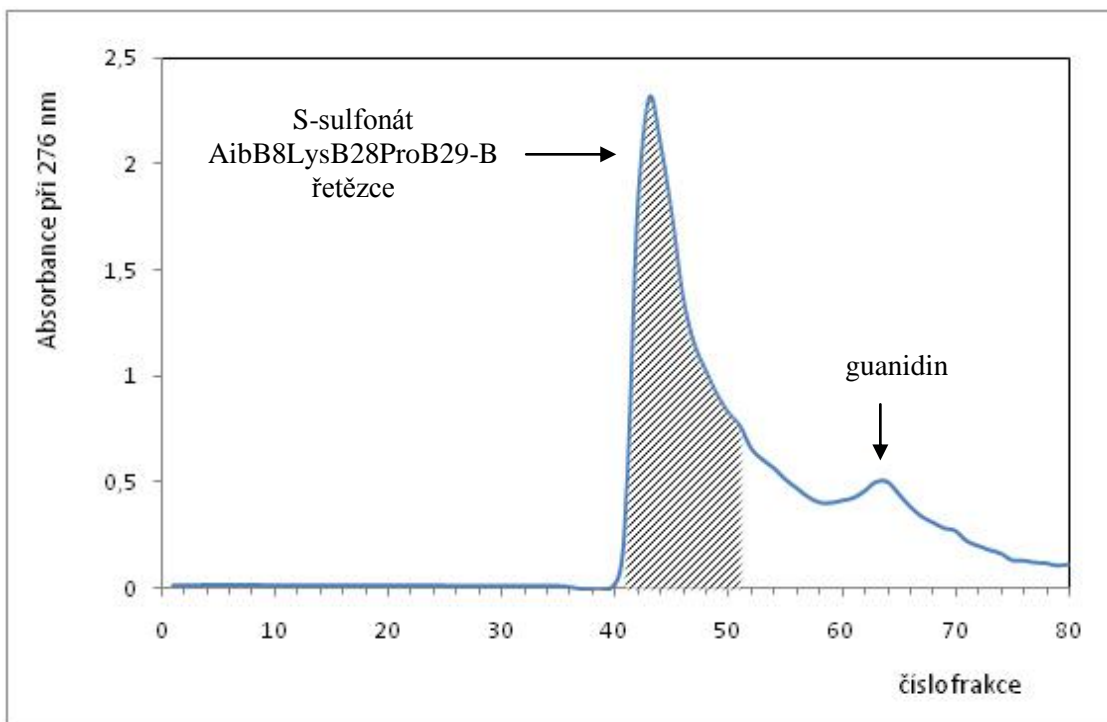
Oba řetězce byly po syntéze na pevné fázi nejprve štěpící směsí odštěpeny z pryskyřice a následně převedeny na S-sulfonáty působením sulfitolyzačního pufru.

5.1.1. Purifikace a identifikace řetězců

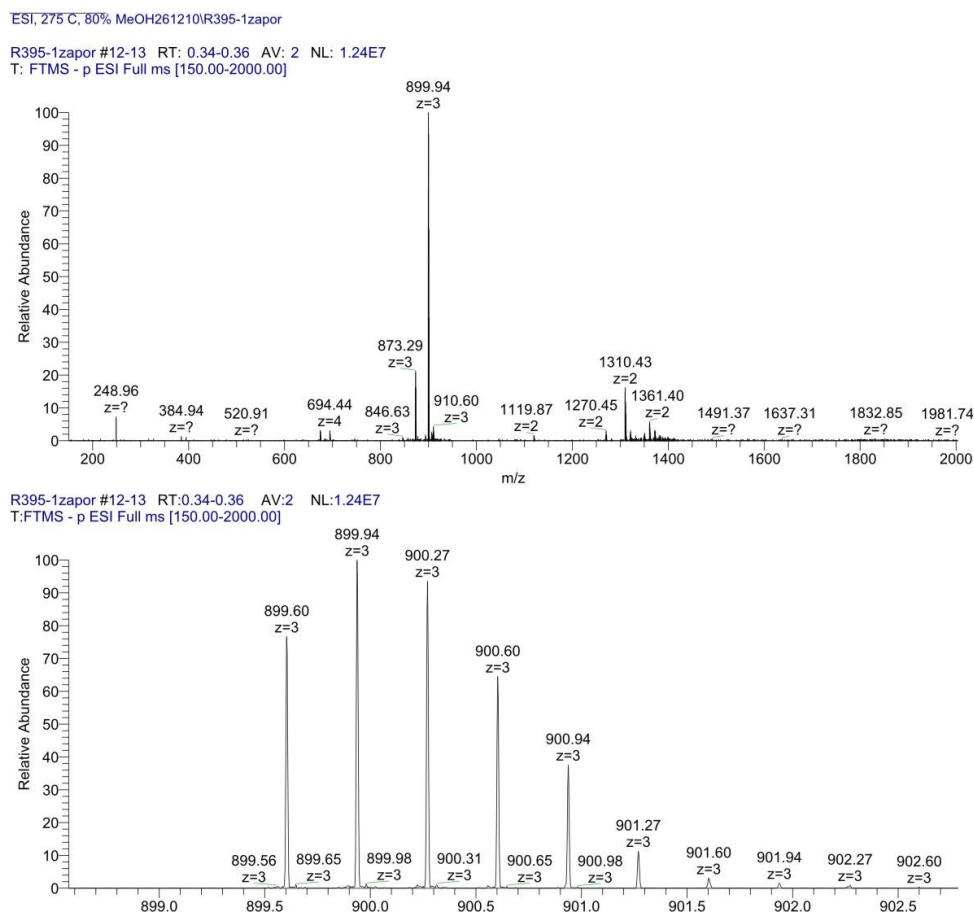
Směs po štěpení byla rozdělena pomocí gelové chromatografie na koloně Sephadex G10 o celkovém objemu 1000 ml za podmínek popsanych v kapitole 4.1.2. Eluční profil směsi obsahující S-sulfonát A řetězce je znázorněn na obrázku č. 7, eluční profil směsi obsahující S-sulfonát AibB8LysB28ProB29-B řetězce na obrázku č. 8 (str. 27). Frakce obsahující příslušný insulinový řetězec byly spojeny, lyofilizovány a purifikovány pomocí RP-HPLC. Výtěžek po syntéze a chromatografii byl v případě A řetězce 43%, v případě B řetězce 42%. Čistota obou řetězců byla ověřena analytickou RP-HPLC a identifikace byla provedena hmotnostní spektrometrií (Obr. 9 a 10, str. 27-28; Tab. 3, str. 30).



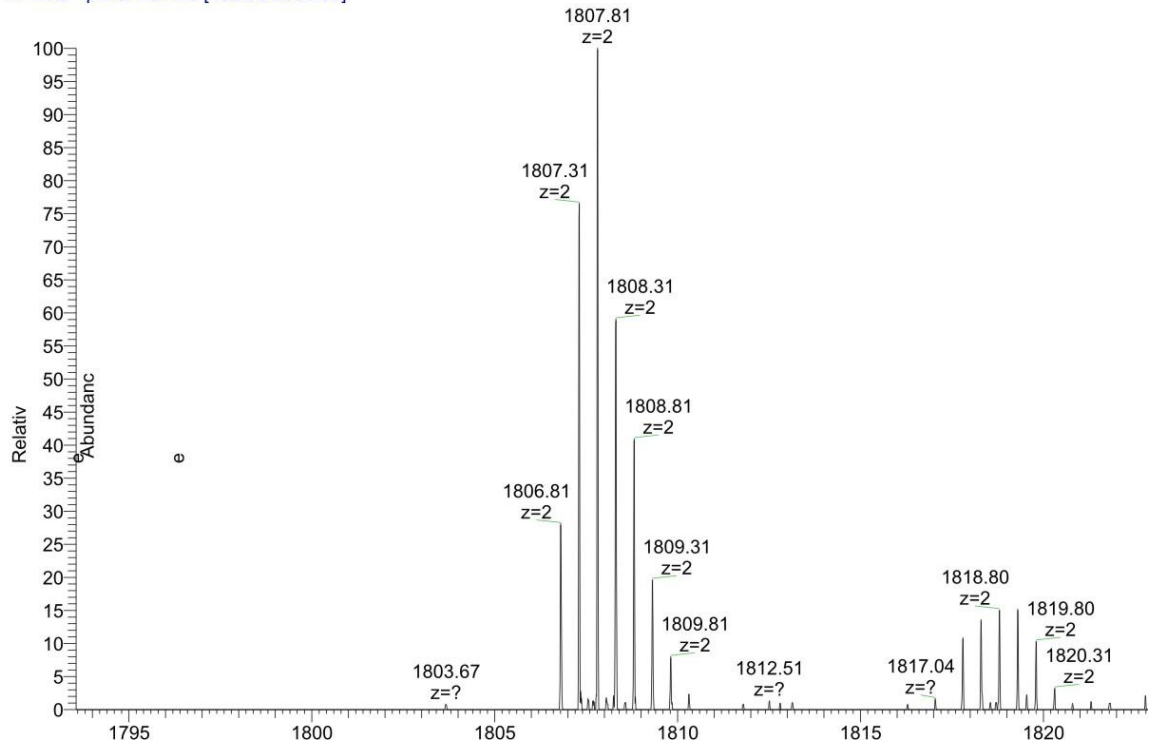
Obr. 7: Odsolení S-sulfonátu A řetězce na koloně Sephadex G10. Eluce byla provedena 50 mM NH_4HCO_3 . Frakce 24-31 obsahovaly čistý A řetězec.



Obr. 8: Odsolení S-sulfonátu AibB8LysB28ProB29-B řetězce na koloně Sephadex G10. Eluce byla provedena 50 mM NH_4HCO_3 . Frakce 41-51 obsahovaly čistý AibB8LysB28ProB29-B řetězec.



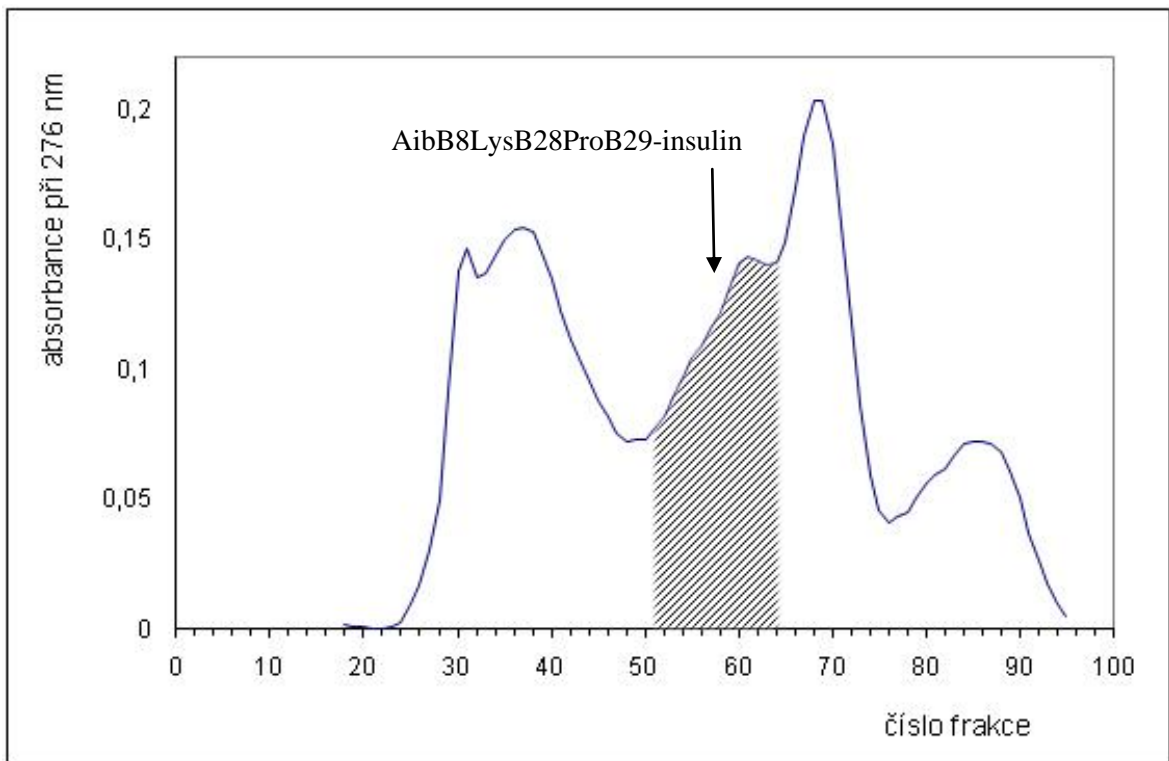
Obr. 9.: Hmotnostní spektrum S-sulfonátu A řetězce v negativním režimu měření.



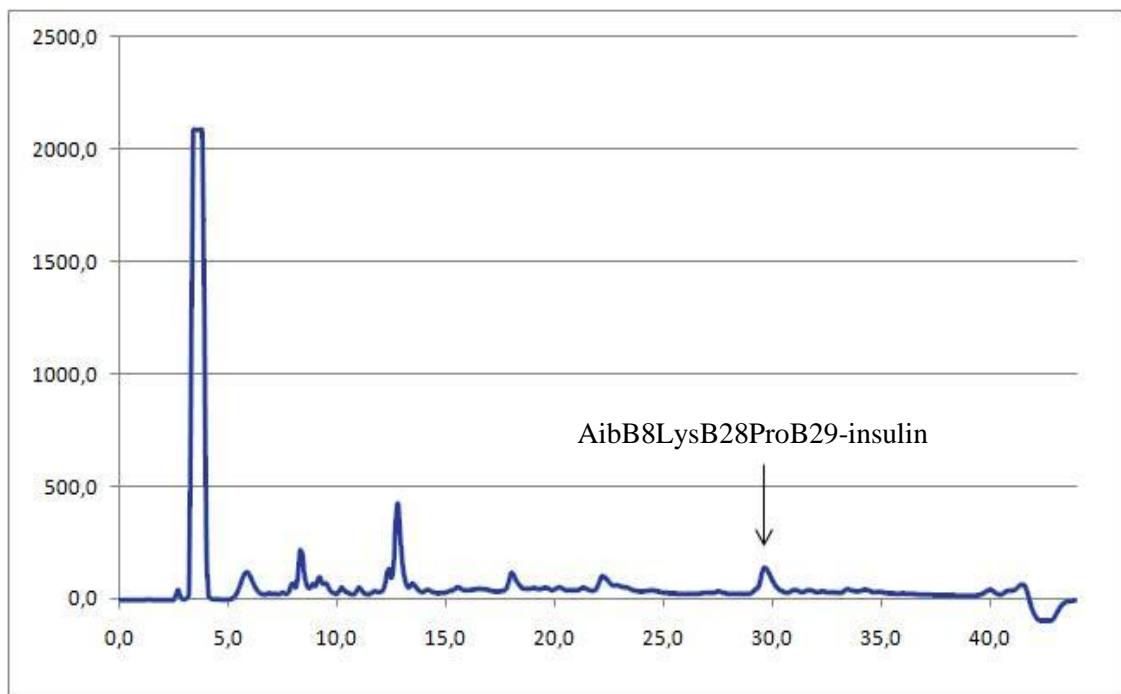
Obr. 10.: Hmotnostní spektrum S-sulfonátu AibB8LysB28ProB29-B řetězce v negativním režimu měření.

5.2.Rekombinace řetězců

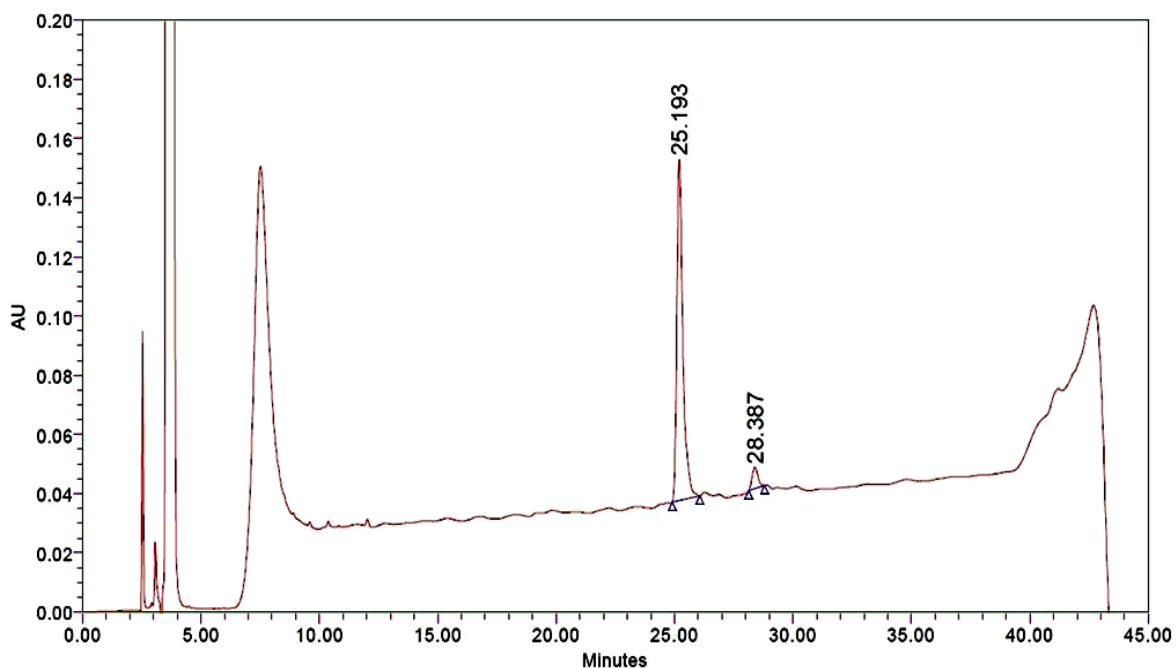
Čisté S-sulfonáty A řetězce a AibB8LysB28ProB29-B řetězce byly zredukovány v přítomnosti DTT a poté podrobeny pomalé oxidaci za přítomnosti vzduchu. Po ukončení rekombinačních reakcí byla reakční směs nanášena na kolonu Sephadex G50 medium o celkovém objemu 500 ml za podmínek popsanych v kapitole 4.2. Eluční profil směsi je zobrazen na obrázku č. 11 (str. 29). Frakce obsahující analog AibB8LysB28ProB29-insulin byly spojeny a lyofilizovány. Lyofilizát byl následně rozpuštěn a analog byl purifikován a izolován pomocí preparativního provedení RP-HPLC (Obr. 12, str. 29). Po první rekombinaci bylo získáno 0,3 mg analogu, což odpovídá výtěžku 1,25%. Kvalita a čistota analogu byly nakonec ověřeny analytickým provedením RP-HPLC (Obr. 13, str. 30) a hmotnostní spektrometrií (Obr. 14, str. 31).



Obr. 11: Eluční profil AibB8LysB28ProB29-insulinu na koloně Sephadex G50. Eluce byla provedena 1 M CH_3COOH . Frakce 51-64 obsahovaly analog AibB8LysB28ProB29-insulin.



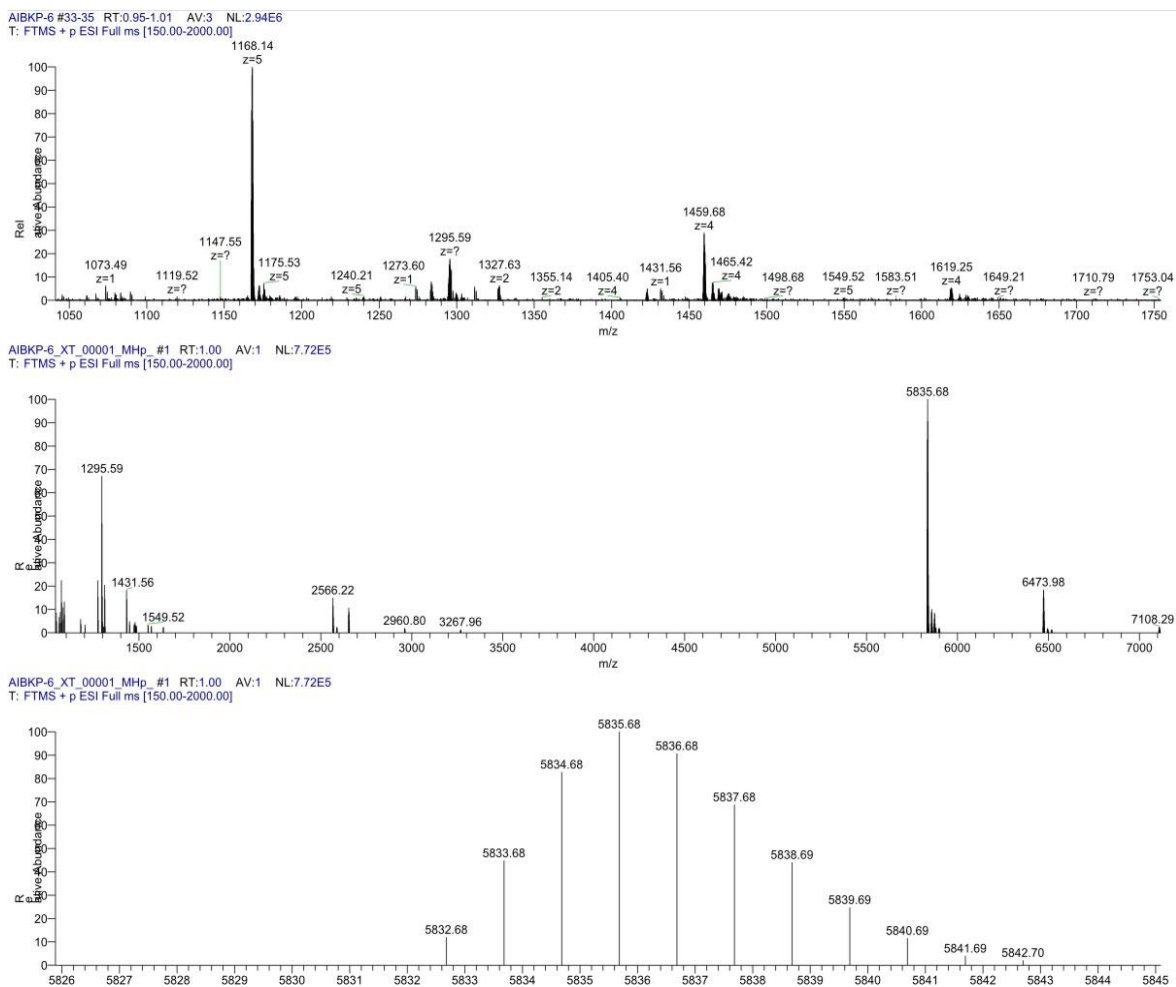
Obr. 12: Chromatografické dělení směsi po rekombinaci analogu a odsolení gelovou chromatografií.



Obr. 13: Analýza čistoty AibB8LysB28ProB29-insulinu. Vrchol v čase 25,193 min odpovídá analogu; jeho čistota je 95%.

Tabulka 3: Relativní molekulové hmotnosti peptidů - vypočtené hodnoty monoizotopických forem a hodnoty zjištěné pomocí hmotnostní spektrometrie.

peptid	Mr (monoizotopická)	Mr (naměřená)
A-řetězec	2701,82	2701,80
AibB8LysB28ProB29-B řetězec	3615,63	3615,62
AibB8LysB28ProB29-insulin	5831,67	5831,68



Obr 14: Hmotnostní spektrum analogu AibB8LysB28ProB29-insulinu.

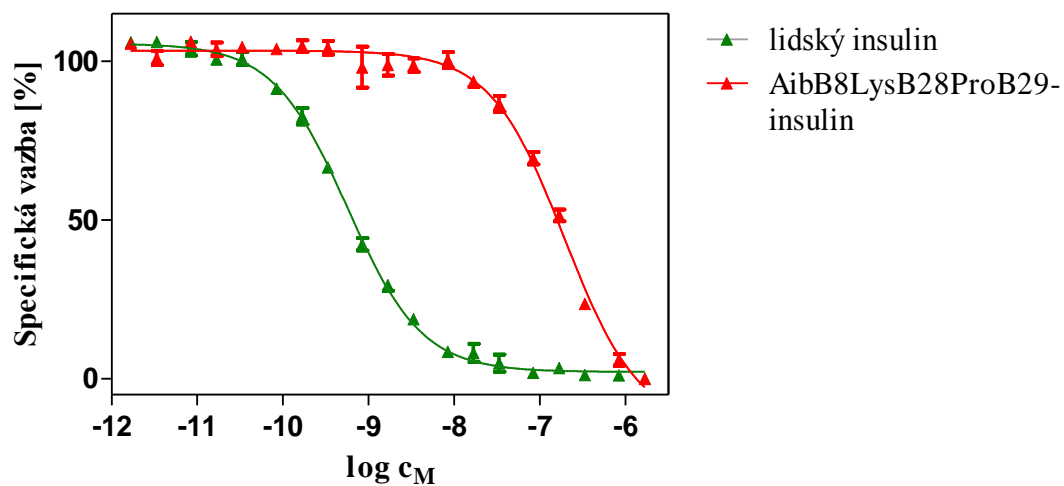
5.3. Testování vazebné afinity AibB8LysB28ProB29-insulinu *in vitro*

Vazebné testy AibB8LysB28ProB29-insulinu byly provedeny v duplikátech celkem 4x (Tab. 4). Výsledky byly zprůměrovány a byla vytvořena výsledná vazebná křivka a určena hodnota disociační konstanty K_d (Obr. 15, str. 32). Ve srovnání s lidským insulinem vykazuje AibB8LysB28ProB29-insulin vazebnou afinitu 0,26%.

Tabulka 4: Výsledky vazebných testů AibB8LysB28ProB29-insulinu.

peptid	$K_d \pm \text{SEM}$	vazebná afinita (%)	počet měření
lidský insulin	$0,38 \pm 0,0239$	100	3
AibB8LysB28ProB29-insulin	$146,50 \pm 30,45$	0,26	4

K_d – rovnovážná disociační konstanta, SEM – standardní chyba



Obr. 15: Vazebná křivka lidského insulinu a AibB8LysB28ProB29-insulinu. c_M je molární koncentrace lidského insulinu resp. analogu. Vytvořeno v programu GraphPad Prizm 5.0.

6. Diskuse

Význam dvou základních konformací T a R insulínu při interakci s insulínovým receptorem nebyl doposud objasněn. Není známo, zdali je součástí hypotetické „aktivní konformace“ insulínu jeden z těchto dvou stavů, anebo je to dokonce ještě nějaká jiná konformace N-konce B řetězce, jako například nově popsaný „mezistav“ mezi konformací T a R (35). Při objasňování procesu přechodu mezi stavem T a R a úlohy obou stavů mohou být užitečné nové analogy insulínu, které mají stabilizovanou některou z těchto konformací. Použitím aminokyseliny Aib, která v peptidovém řetězci indukuje vznik šroubovicové struktury (55), bychom mohli vytvořit analog insulínu se stabilním R stavem.

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala přípravou a charakterizací nového analogu AibB8LysB28ProB29-insulínu. Pozice B8 je právě tím místem, kde dochází k přechodu mezi stavem T a R. Glycin v této poloze se svojí obrovskou flexibilitou umožňuje N-konci B řetězce stáčet se do velkého množství úhlů. Použití specifické aminokyseliny, jež je schopna zaujímat jenom úhly pro pravo- nebo levotočivou šroubovici - jako je použitá Aib - by mohlo zaručit vytvoření stabilního R stavu i bez použití malých cyklických alkoholů (fenol, cyklohexanol, atd.), popřípadě jiných aditiv, která se pro dosažení tohoto stavu obvykle k insulínu přidávají (54). Záměna prolinu v pozici B28 s lysinem v pozici B29 byla použita z důvodu minimalizování dimerizace insulínu (47), která by vadila případným dalším fyzikálně-chemickým analýzám jako například NMR, kterou by se dala určit terciární struktura analogu v roztoku (52).

Rekombinační reakce lidského insulínu, kdy se spojují S-sulfonát A řetězce s S-sulfonátem B řetězce, má obvykle výtěžek mezi 8 a 12% vzhledem k limitující složce, jíž je množství B řetězce. U analogů závisí výtěžek reakce na vlivu substituce jednotlivých aminokyselin, průměrně se však pohybuje mezi 3 a 6% (49). U analogu AibB8LysB28ProB29-insulínu byl výtěžek z první rekombinace pouhých 1,25%, z druhé 0% a ze třetí méně než 1%. To je zajímavý výsledek v porovnání s analogem AibB8-insulínem připraveným v laboratoři Dr. Jiráčka, jehož výtěžek z několika rekombinačních reakcí byl průměrně 4,5% (57). Zároveň z analýz pomocí RP-HPLC jsme u analogu AibB8LysB28ProB29-insulínu pozorovali výrazně zvýšenou hydrofobicitu oproti lidskému insulínu i jiným analogům insulínu. Tento fakt se mohl odrazit na nízkých výtěžcích rekombinačních reakcí, nicméně předpokládáme, že hlavní podíl na těchto výsledcích nese záměna prolinu s lysinem, která může konformačně ovlivnit poskládání

molekuly a zapříčinit tak méně výhodnou pozici pro správné spojení disulfidických můstků během rekombinace.

Vazebná afinita analogu AibB8LysB28ProB29-insulinu k insulinovému receptoru je velice nízká – 0,26%. Podobnou afinitu má i analog AibB8-insulin (57), což potvrzuje fakt, že záměna prolinu s lysinem v pozicích B28 a B29 neovlivňuje vazebnou afinitu analogu vůči insulinovému receptoru (52). Glycin v pozici B8 je absolutně evolučně konzervovaná aminokyselina a zásah do této pozice má vždy negativní vliv na vazebnou afinitu. V minulosti byly připraveny analogy se záměnou glycinu v pozici B8 za různé L- a D-aminokyseliny (51, 49). Obecně lze říci, že L-aminokyseliny v této pozici jsou lépe tolerované než D-aminokyseliny. Přesto však všechny analogy s L-aminokyselinou v pozici B8 (vyjma SerB8-insulinu, 23%) vykazují afinitu kolem 1% v porovnání s přirozeným insulinem. D-aminokyselina v této pozici bez ohledu na postranní řetězec vždy zapříčiňuje prudký pokles vazebné afinity, který nedosahuje (opět kromě D-serinu) 0,5% afinity lidského insulinu (Tab. 1, str. 17). Je velice zajímavé porovnávat vazebné afinity B8-analogů, včetně v této práci připraveného AibB8LysB28ProB29-insulinu, s konformačními možnostmi jednotlivých aminokyselin. Glycin jako jediná aminokyselina bez postranního řetězce může zaujímat širokou škálu úhlů a může být součástí v podstatě jakékoliv sekundární struktury. D- a L-aminokyseliny mají kvůli svým postranním řetězcům určitá omezení v pohyblivosti a některé úhly a konformace jsou pro ně nepřijatelné. Aib je v podstatě strukturně složený D- a L-alanin a tím se stává nesmírně rigidní aminokyselinou umožňující zaujímat, jak už bylo řečeno, pouze oblast úhlů typickou pro levo- a pravotočivou šroubovici. Při porovnávání úhlů, které zaujímá glycin v pozici B8 v různých konformacích, můžeme říci, že v T stavu se hodnoty těchto úhlů pohybují v oblastech pro D-aminokyseliny a naopak v R stavu v oblastech pro L-aminokyseliny (49). Ze všech z literatury známých výsledků afinit analogů modifikovaných v pozici B8 a z našeho výsledku pro AibB8ProB28LysB29-insulin vyplývá, že flexibilita N-konce B řetězce v místě glycinu B8 je absolutně nezbytná pro plnou vazebnou afinitu. Vzhledem k velice malému výtěžku a nesnadnosti syntézy našeho analogu AibB8ProB28LysB29-insulinu nejsme prozatím schopni tento analog podrobit dalším fyzikálními metodám, jako je např. cirkulární dichroismus, který by určil procentuální zastoupení α -šroubovice, NMR studie, jež by určily strukturu analogu v roztoku, nebo rentgenostrukturní analýza, která by zcela osvětlila jeho terciární strukturu v krystalu. Přesto je výsledek velice zajímavý, a to jak z hlediska narušené schopnosti

správně spojit řetězce analogu při rekombinační reakci použitými změnami v peptidovém řetězci, tak i vazebnou afinitou, která i přesto, že je velmi nízká, je užitečným ukazatelem pro tvorbu dalších analogů a studium významu T a R konformací insulínu.

Souhrn

Ve své bakalářské práci jsem celkovou chemickou syntézou připravila nový analog insulínu - AibB8LysB28ProB29-insulín. Tento analog byl připraven za účelem objasnění významu T a R konformací insulínu a jejich úlohy při interakci insulínu s receptorem. Aminokyselina Aib byla v pozici B8 použita z důvodu její schopnosti silně indukovat šroubovicové struktury v peptidových řetězcích. Prolin a lysin v pozicích B28 a B29 byly zaměněny z důvodu snížení schopnosti analogu vytvářet dimery a hexamery. Metodou syntézy na pevné fázi byl připraven insulinový řetězec A a modifikovaný insulinový řetězec AibB8LysB28ProB29-B. Surové A a B řetězce byly po štěpení nejprve převedeny na S-sulfonáty, poté odsoleny gelovou chromatografií a následně purifikovány a izolovány pomocí preparativního provedení RP-HPLC. Řetězce byly spojeny rekombinační reakcí za vzniku nového insulinového analogu AibB8LysB28ProB29-insulínu. Tento nový analog byl opět přečištěn nejprve gelovou chromatografií a poté pomocí RP-HPLC. Oba řetězce i výsledný analog byly charakterizovány pomocí analytického provedení RP-HPLC a hmotnostní spektrometrií. Nakonec byla stanovena vazebná afinita AibB8LysB28ProB29-insulínu k insulinovému receptoru. Hodnota jeho disociační konstanty ve srovnání s hodnotou disociační konstanty lidského insulínu vypovídá o ztrátě vazebné afinity a tedy i biologické aktivity tohoto analogu.

Abstract

According to the International Diabetes Federation, there were 285 million people in the age from 20 to 79 years suffering from diabetes on the planet in 2010. This means diabetes has become a global epidemic so the importance of insulin research is still growing.

Insulin is a protein hormone that plays a key role in regulating blood glucose level which has a widespread impact on the whole metabolism. Insulin acts through binding of its monomeric form to the insulin receptor. At present, however, the active monomeric structure of insulin is still unknown. It is clear that insulin monomer must undergo structural changes upon binding to the insulin receptor as the residues crucial for the interaction are buried within the native form. According to studies of highly active hormone analogs there is an ample evidence that the C-terminal part of the B-chain is a dynamic element in insulin activation and receptor binding. Probably, there is also great importance of the B-chain N-terminus and the transition between T and R conformation. However, the exact significance of the T and R states of insulin remains unclear.

In this work, a new insulin analog AibB8LysB28ProB29-insulin was prepared for the purpose of studying significance of the T and R conformations of insulin and their relationship to the active form of the hormone. On the position B8, this analog contains α -aminoisobutyric acid, a non-proteinogenic amino acid which is a strong inducer of helical structure. We expected that this will result in a long helical region on the residues 1-19 in the B-chain so we should get the R conformation of insulin, practically. To avoid multimerization we swapped the residues of proline B28 and lysine B29. Finally, the binding affinity of the new insulin analog was determined.

Based on this experiment, it was found out that the insulin analog AibB8LysB28ProB29-insulin is very difficult to prepare. We got only 0,3 mg of the analog from three independent recombination reactions. The binding affinity of the analog was only 0,26% in comparison with human insulin (In Czech).

Reference

1. Abbreviations and Symbols, 1977, *Eur. J. Biochem.* 74, 1-6
2. Ganong, W. F.: Přehled lékařské fyziologie, 1999, *Nakladatelství H&H*, Praha - Jinočany
3. IDF Diabetes Atlas, 2011, <http://www.diabetesatlas.org/content/diabetes-and-impaired-glucose-tolerance>
4. von Mering, J., Minkowski, O.: Diabetes Mellitus nach Pankreas-extirpation, 1889, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 26, str. 371-381
5. Opie, E. L.: Pathological changes affecting the islands of Langerhans of the pankreas, 1900, *J. Boston Soc. Med. Sci.* 4 (10); str. 251–260
6. Tattersall, R.: Pancreatic Organotherapy for Diabetes 1889-1921, 1995, *Med. History* 39, str. 288-316
7. Rosenfeld, L.: Insulin: Discovery and Controversy, 2002, *Clin. Chem.* 48, str. 2270-2288
8. Abel, J. J.: Crystalline Insulin, 1926, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 12(2), 132-135
9. Crowfoot, D. M.: X-ray single-crystal photographs on insulin, 1935. *Nature* 135, 591-592
10. Sanger, F.: The Free Amino Groups of Insulin, 1945, *Biochem. J.* 39, 507-515
11. Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F., Kitai, R.: The Disulfide Bonds of Insulin, 1955, *Biochem. J.* 60, 541-556
12. Adams, M. J., Blundell, T. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Vijayan, M., Baker E. N., Harding, M. M., Hodgkin Crowfoot, D. M., Rimmer, B., Sheat, S.: Structure of Rhombohedral 2Zn Insulin Crystals, 1969, *Nature* 224, 491-495
13. Hodgkin Crowfoot, D. M.: X Rays and the Structure of Insulin, 1971, *Brit. Med. J.* 4, 447-451
14. Katsoyannis, P. G.: The chemical synthesis of human and sheep insulin, 1966, *Amer. J. Med.* 40, 652-661
15. Zahn, H.: Bericht über die Aachener Insulinsynthese, 1965, *Naturwissenschaften* 52, Aachen, 99-103
16. Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A. D.: Expression in Escherichia Coli of Chemically Synthesized Genes for Human Insulin, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 106-110
17. Hua, Q. X., Nakagawa, S. H., Jia, W., Hu, S. Q., Chu, Y. C., Katsoyannis, P. G., Weiss, M. A.: Hierarchical Protein Folding: Asymmetric Unfolding of an Insulin Analogue Lacking the A7-B7 Interchain Disulfide Bridge, 2001, *Biochemistry* 40, 12299-12311
18. Huml, K., Barth, T.: Struktura insulínu, 1998, *Chem. Listy* 92, 294 – 301
19. Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Dodson, G. G., Dodson, E., Hodgkin, D. C., Mercola, D.: Structure and Biology of Insulin, 1971, *Biochem. J.* 125, 50-51

20. Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. C., Mercola, D. A., Vijayan, M.: Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals, 1971, *Nature* 231, 506-511
21. Hua, Q. X., Hu, S. Q., Frank, B. H., Jia, W. H., Chu, Y. C., Wang, S. H., Burke, G. T., Katsoyannis, P. G., Weiss, M. A.: Mapping the functional surface of insulin by design: Structure and function of a novel A-chain analogue, 1996, *J. Mol. Biol.* 264, 390-403
22. Baker, E. N. a kol.: The Structure of 2Zn Pig Insulin Crystals at 1,5 Å Resolution, 1988, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 319, 369-456
23. Pocker, Y., Biswas, S. B.: Self-Association of Insulin and the Role of Hydrophobic Bonding, 1981, *Biochemistry* 20, 4354-4361
24. Goldman, J., Carpenter, F. H.: Zinc Binding, Circular Dichroism, and Equilibrium Sedimentation Studies on Insulin (Bovine) and Several of Its Derivatives, 1974, *Biochemistry* 13, 4566-4574
25. Luo, R. Z.-T., Beniac, D. R., Fernandes, A., Yip, C. C., Ottensmeyer, F. P.: Quaternary structure of the insulin-insulin receptor komplex, 1999, *Science* 285, 1077 – 1080
26. Žáková, L.: Nové insulinové analogy modifikované v C-koncové části B-řetězce, 2004, *Disertační práce*, str. 7
27. Huml, K., Klasová, L., Barthová, J.: Interakce inzulínu s inzulínovým receptorem, 2002, *Chem. Listy* 96, 698 – 70
28. De Meyts, P., Whittaker, J.: Structural biology of insulin and IGF1 receptors: Implications for drug design, 2002, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 769-783
29. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., Kochoyan, M., Weiss, M. A.: Receptor binding redefined by a structural switch in a mutant human insulin, 1991, *Nature* 354, 238-241
30. White, M. F.: The insulin signalling system and the IRS proteins, 1997, *Diabetologia* 40, S2-S17
31. Elmendorf, J. S.: Signals that regulate GLUT4 translocation, 2002, *J. Membrane Biol.* 190, 167-174
32. Nagakawa, S. H., Zhao, M., Hua, Q. X., Hu, S. Q., Wan, Z. L., Jia, W., Weiss, M. A.: Chiral mutagenesis of insulin. Foldability and fiction are inversly regulated by a stereospecific switch in the B chain, 2005, *Biochemistry* 44, 4984-4999
33. Pittman I., Tager, H. S.: A Spectroscopic Investigation of the Conformational Dynamics of Insulin in Solution, 1995, *Biochemistry* 34, 10578-10590
34. Stoy, J., Edghill, E. L., Flanagan, S. E., Ye, H. G., Paz, V. P., Pluzhnikov, A., Below, J. E., Hayes, M. G., Cox, N. J., Lipkind, G. M., Lipton, R. B., Greeley, S. A. W., Patch, A. M., Ellard, S., Steiner, D. F., Hattersley, A. T., Philipson, L. H., Bell, G. I.: Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes, 2007, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15040-15044
35. Jiráček, J., Žáková, L., Antolikova, E., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M.: Implications for the active form of human insulin based on the structural

- convergence of highly active hormone analogues, 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1966-1970
36. Merrifield R. B.: Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin, 1964, *Biochemistry* 3, 1385-1390
 37. Fields, G. B., Noble, R. L.: Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, 1990, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 35, 191-214
 38. Chance, R. E., Hoffmann, J. A., Kroeff, E. P., Johnson, M. G., Schirmer, E. W., Bromer, W. W.: The Production of Human Insulin Using Recombinant DNA Technology and a New Chain Combination Procedure, 1981, *The Lilly Research laboratories*, Indianapolis, USA
 39. Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., Riggs, A. D.: Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 106-110
 40. Talmadge, K., Kaufman, J., Gilbert, W.: Bacteria mature preproinsulin to proinsulin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 3988-3992
 41. Chan, S. J., Weiss, J., Konrad, M., White, T., Bahl, C., Yu, S. D., Marks, D., Steiner, D. F.: Biosynthesis and periplasmic segregation of human proinsulin in *Escherichia coli*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 5401-5405
 42. Morihara, K.: Enzymatic semisynthesis of human insulin: an update, 1990, *J. Mol. Recognit.* 3, 181-186
 43. Morihara, K., Oka, T., Tsuzuki, H.: Semi-synthesis of human insulin by trypsin-catalysed replacement of Ala- B30 by Thr in porcine insulin, 1979, *Nature* 280, 412-413
 44. Shoelson, S., Fickova, M., Haneda, M., Nahum, A., Musso, G., Kaiser, E. T., Rubenstein, A. H., Tager, H.: Identification of a mutant human insulin predicted to contain a serine- for-phenylalanine substitution, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 7390-7394
 45. Nanjo, K., Miyano, M., Kondo, M., Sanke, T., Nishimura, S., Miyamura, K., Inouye, K., Given, B. D., Chan, S. J., Polonsky, K. S., Tager, H. S., Steiner, D. F., Rubenstein, A. H.: Insulin Wakayama – Familial mutant insulin syndrome in Japan, 1987, *Diabetologia* 30, 87-92
 46. Mayer J. P., Zhang F., DiMarchi R. D.: Insulin Structure and Function, 2007, *Biopolymers* 88, 687-713
 47. Ciszak, E., Beals, J. M., Frank, B. H., Baker, J. C., Carter, N. D., Smith, G. D.: Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric LysB28ProB29-human insulin, 1995, *Structure* 3, 615-622
 48. Brange, J., Ribel, U., Hansen, J. F., Dodson, G., Hansen, M. T., Havelund, S., Melberg, S. G., Norris, F., Norris, K., Snel, L.: Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications, 1988, *Nature* 333, 679-682
 49. Nakagawa, S. H., Zhao, M., Hua, Q. X., Hu, S. Q., Wan, Z. L., Jia, W., Weiss, M. A.: Chiral mutagenesis of insulin. Foldability and function are inversely regulated by a stereospecific switch in the B chain, 2005, *Biochemistry* 44, 4984-4999

50. Hua, Q. X., Nakagawa, S., Hu, S. Q., Jia, W. H., Wang, S. H., Weiss, M. A.: Toward the active conformation of insulin - Stereospecific modulation of a structural switch in the B chain, 2006, *J. Biol. Chem.* 281, 24900-24909
51. Guo, Z. Y., Zhang, Z., Jia, X. Y., Tang, Y. H., Feng, Y. M.: Mutational analysis of the absolutely conserved B8Gly: Consequence on foldability and activity of insulin, 2005, *Acta Bioch. Bioph. Sin.* 37, 673-679
52. Zhao, M., Nakagawa, S. H., Hua, Q. X., Weiss, M. A.: Exploring the foldability and function of insulin by combinatorial peptide chemistry, 1991, in *15th American Peptide Symposium, Nashville*, 1997, 369-371
53. Shoelson, S. E., Lu, Z. X., Parlautan, L., Lynch, C. S., Weiss, M. A.: Mutations at the dimer, hexamer, and receptor-binding surfaces of insulin independently affect insulin-insulin and insulin-receptor interactions, 1992, *Biochemistry* 31, 1757-1767
54. Whittingham, J. L., Chaudhuri, S., Dodson, E. J., Moody, P. C. E., Dodson, G. G.: X-ray Crystallographic Studies on Hexameric Insulins in the Presence of Helix-Stabilizing Agents, Thiocyanate, Methylparaben and Phenol, 1995, *Biochemistry* 34, 15553-15563
55. Karle, I. L., Balaram P.: Structural Characteristics of α -Helical Peptide Molecules Containing Aib Residues, 1990, *Biochemistry* 29, 6747-6756
56. De Meyts, P.: Insulin and growth hormone receptors in human cultured lymphocytes and peripheral blood monocytes, 1976, v knize *Methods in receptor research*, (Dekker, M. ed.) New York, 301-383
57. Jiráček J.: osobní sdělení
58. Hu, S. Q., Burke, G. T., Schwartz, G. P., Ferderigoz, N., Ross, J. B., Katsoyannis, P. G.: Steric requirements at position B12 for high biological activity in insulin, 1993, *Biochemistry* 32, 2631-2635
59. Wang, S. H., Hu, S. Q., Burke, G. T., Katsoyannis, P. G.: Insulin analogues with modifications in the beta-turn of the B-chain, 1991, *J. Protein Chem.* 10, 313-324

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