

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Anna Povalová

*Syntéza a biochemická charakterizace hybridních analogů lidského
insulinu a IGF-2*

*Synthesis and biochemical characterization of hybrid analogues
of human insulin and IGF-2*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Konzultant: RNDr. Jiří Jiráček, CSc.

Praha 2013

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 23.5.2013

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému odbornému konzultantovi RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc., za odborné vedení, velkou pomoc a trpělivost po celou dobu naší spolupráce a vedoucí práce paní prof. Marii Stiborové, DrSc., za vstřícnost a umožnění tvorby této práce. Velký dík patří též RNDr. Lence Žákové, Ph.D., a RNDr. Ireně Selicharové, Ph.D., a celému kolektivu skupiny Dr. Jiráčka na ÚOCHB AV ČR, v.v.i., za všestrannou pomoc a vytvoření přátelské atmosféry.

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

Abstrakt

Stále rostoucí trend výskytu nemoci diabetes mellitus neboli cukrovky naznačuje potřebu vývoje nových terapeutických přípravků, a tím zajištění adekvátní léčby pro pacienty. Důležitým prvkem v této oblasti výzkumu je detailní objasnění působení hormonu insulinu v organismu, zejména v kontextu s růstovými faktory podobnými insulinu (IGF-1 a IGF-2), které vykazují významnou vzájemnou strukturní homologii. Vysokou podobnost vykazují i jejich příslušné receptory, receptor insulinu (IR) a receptor pro IGF-1 a IGF-2 (IGF-1R), a díky tomu se mohou IGF-1 a IGF-2 do jisté míry vázat na IR a insulin na IGF-1R. Důležitá je zejména schopnost silné vazby IGF-2 na isoformu A IR. Na rozdíl od insulinu, který převážně zprostředkovává vstup glukosy do buněk, hormony IGF vyvolávají růstové (mitogenní) účinky. Zjištění, které strukturní determinanty v molekulách insulinu a IGF jsou zodpovědné za rozdílnou aktivaci receptorů, by mohlo poskytnout vysvětlení rozdílných odpovědí vyvolaných působením těchto hormonů na receptory cílových buněk a napomoci při vývoji funkčně selektivních analogů těchto hormonů.

Cílem této bakalářské práce byla příprava a charakterizace analogů lidského insulinu prodloužených na C konci řetězce B o sekvence aminokyselin odvozených z domény C molekuly IGF-2. Příprava těchto hybridních analogů byla uskutečněna pomocí syntézy na pevné fázi a enzymové semisyntézy za účasti trypsinu. Semisyntetická reakce v případě analogu insulinu prodlouženého o sekvenci S-R-V-S-R-R-S byla neúspěšná kvůli proteolýze trypsinem. Z tohoto důvodu byly navrženy dva analogy, DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulin a DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulin (kde DOI je des(B23-B30)oktapeptid-insulin) s lysiny chráněnými fenylacetylovou skupinou, které se připravit podařilo. Dále byly pomocí imunopřenosů porovnány schopnosti těchto analogů aktivovat signální dráhy po vazbě na IGF-1R a výsledky byly porovnány s efekty lidského insulinu, IGF-1 a IGF-2. Ze získaných výsledků je možné usuzovat, že prodloužení řetězce B insulinu na jeho C-konci o aminokyseliny odvozené z C-domény IGF-2 pozměňuje schopnost insulinu aktivovat IGF-1R.

Klíčová slova

Insulin, růstové faktory podobné insulinu, syntéza na pevné fázi, enzymová semisyntéza, aktivace receptoru, signální kaskády, imunopřenos, Akt, Erk

Abstract

The ever-increasing occurrence of diabetes mellitus brings about the need for development of new therapeutic agents to provide adequate treatment for patients. An important element in this research area is elucidation how insulin works, mainly in connection with insulin-like growth factors (IGF-1 and IGF-2), which show significant structural homology to each other. In addition, their respective receptors - insulin receptor (IR) and receptor for IGF-1 and IGF-2 (IGF-1R) - exhibit very high similarity. As a result, IGF-1 and IGF-2 can bind to IR and insulin can bind to IGF-1R. Of a particular importance is the high affinity binding of IGF-2 to the isoform A of IR. Unlike insulin, which predominantly mediates glucose entry into cells, IGFs induce growth or mitogenic effects. The finding which structural determinants in insulin and IGFs are responsible for the differences in the activation of their cognate receptors could provide an explanation for different functional responses upon binding of these hormones to different target cells. Understanding of this mechanism could also help in the development of functionally selective analogues of these hormones.

The aim of this study was the synthesis and characterization of analogues of human insulin extended at the C terminus of the B chain with the amino acid sequence derived from the C domain of IGF-2. The preparation of these hybrid analogues was carried out using the method of solid phase peptide synthesis and enzymatic semisynthesis catalyzed by trypsin. Semisynthetic reaction of the first analogue failed due to the proteolysis by trypsin. Therefore, next two analogues were designed, DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A-insulin and DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V-insulin (where DOI is des(B23-B30)octapeptide-insulin), using lysines protected by a phenylacetyl group. The respective semisynthetic reactions were successful and the analogues were characterized using immunoblotting techniques for their ability to activate different signaling pathways upon binding to IGF-1R. The results were compared with the effects of human insulin, IGF-1 and IGF-2. It can be assumed that the extension of the C terminus of the B chain of insulin of the amino acids derived from the C domain of IGF-2 may modify the ability of insulin to activate IGF-1R. (In Czech)

Keywords

Insulin, insulin-like growth factors, solid-phase synthesis, enzymatic semisynthesis, receptor activation, signaling cascades, immunoblotting, Akt, Erk

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah	7
Seznam použitých zkratk	9
1 Úvod.....	11
1.1 Insulin a růstové faktory podobné insulinu	11
1.2 Receptory insulinu a růstových faktorů podobných insulinu	11
1.3 Vazby ligandů na receptory.....	12
1.4 Mechanismus působení insulinu, IGF-1 a IGF-2 na buněčné úrovni.....	14
1.5 Analogy insulinu se selektivními účinky	14
2 Cíl práce	18
3 Použitý materiál a přístroje.....	19
4 Metody.....	20
4.1 Purifikace a analýza peptidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC)	20
4.2 Příprava peptidů syntézou na pevné fázi.....	20
4.2.1 Manuální syntéza peptidů na pevné fázi.....	20
4.2.2 Automatická syntéza peptidů na pevné fázi.....	21
4.3 Enzymová semisyntéza analogů insulinu	22
4.3.1 Enzymová semisyntéza analogů insulinu - Metoda A	22
4.3.2 Enzymová semisyntéza analogů insulinu - Metoda B.....	23
4.4 Enzymové odchránění produktu semisyntézy analogů insulinu.....	23
4.5 Hmotnostní spektrometrie peptidů.....	23
4.6 Metodika pro aktivaci receptoru IGF-1R.....	24
4.6.1 Pěstování buněk.....	24

4.6.2	Stimulace buněk	24
4.6.3	Příprava lyzátů buněk a vzorků pro elektroforetickou separaci.....	24
4.6.4	Polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů z buněčných lyzátů v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)	25
4.6.5	Imunopřenos elektroforetický separovaných proteinů.....	25
4.6.6	Inkubace proteinů na membráně s protilátkami.....	26
5	Výsledky	27
5.1	Příprava peptidů syntézou na pevné fázi.....	27
5.2	Enzymová semisyntéza DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S insulínu.....	30
5.3	Enzymová semisyntéza a odchránění DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A insulínu; příprava DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulínu	31
5.4	Enzymová semisyntéza a odchránění DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulínu; příprava DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulínu.....	35
5.5	Buněčná signalizace přes IGF-1R.....	39
5.5.1	Závislost intenzity signálu na čase	39
5.5.2	Závislost intenzity signálu na koncentraci ligandu	40
	Diskuze	43
	Souhrn.....	47
	Seznam použité literatury.....	48

Seznam použitých zkratk

AcOH – kyselina octová

ACN – acetonitril

Akt – proteinkinasa B

AESF – hydrochlorid 4-(2-aminoethyl)benzensulfonylfluoridu

APS – peroxodisulfát amonný

BSA – hovězí sérový albumin (*bovine serum albumine*)

Ca(AcO)₂ – octan vápenatý

CCD kamera – charge coupled device camera

DCM – dichlormethan

DIC – *N,N*-diisopropylkarbodiimid

DIPEA – *N,N*-diisopropylethylamin

DMA – *N,N*-dimethylacetamid

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMF – dimethylformamid

DOI – des(B23-B30)oktapeptid-insulin

DTT – dithiothreitol

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

Erk – kinasa regulovaná extracelulárním signálem (*extracellular signal-regulated kinase*)

ESI-MS – hmotnostní spektrometrie s ionizací „elektrosprejem“

FBS – fetální hovězí sérum (*fetal bovine serum*)

Fmoc – 9-flourenylmethoxykarbonylová skupina

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

HI – lidský insulin (*human insulin*)

HOBt – 1-hydroxybenzotriazol

IGF-1, IGF-2 – růstové faktory 1 a 2 podobné insulinu (*insulin-like growth factors*)

IGF-1R, IGF-2R – receptory růstových faktorů 1 a 2 podobných insulinu

IGF-1Rβ – β-podjednotka receptoru IGF-1R

IR – insulinový receptor

IRS – substrát insulinového receptoru

IUB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

MAPK – proteinkinasy aktivované mitogenem (*mitogen-activated protein kinases*)
MeOH – methanol
Milli Q – deionizovaná voda
 M_r – relativní molekulová hmotnost
NMP – 1-methyl-2-pyrrolidinon
Pac – fenylacetylová skupina
pAkt – fosforylovaná proteinkinasa B
pErk1/2 – fosforylovaná a extracelulárním signálem regulovaná kinasa
PI3K – fosfoinositol-3-kinasa
PVDF – polyvinylidenfluorid
RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (*reverse phase high-performance liquid chromatography*)
RTK – tyrosinová kinasa receptoru (*receptor tyrosine kinase*)
tBu – *t*-butylová skupina
TEMED – *N,N,N',N'*-tetramethyldiamin
TFA – kyselina triflouroctová
TFE - trifluoroethanol
TIS – triisopropylsilan
TPCK – trypsin – trypsin s inhibítorem TPCK (tosylfenylalanylchloromethylketon)
Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan
T-TBS – Tris/HCl pufr obsahující chlorid sodný a detergent Tween (*tris buffered saline*)

Dále jsou užívány jednopísmenné zkratky aminokyselin podle doporučení IUPAC-IUB (1).
Pokud není uvedeno jinak, jedná se o aminokyseliny v L-formě.

1 Úvod

1.1 Insulin a růstové faktory podobné insulinu

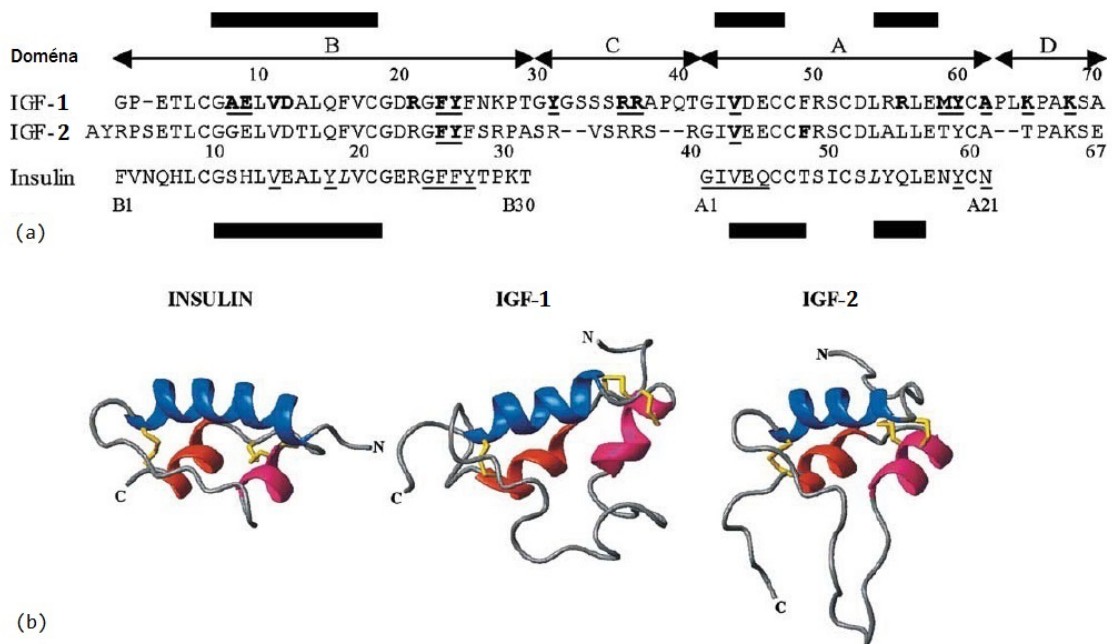
Insulin a růstové faktory podobné insulinu (IGF-1 a IGF-2) jsou fylogeneticky příbuzné hormony (2). Insulin hraje významnou roli hlavně v regulaci vstupu glukosy do buněk, čímž ovlivňuje jak metabolismus sacharidů, tak následně i metabolismus proteinů a lipidů. IGF-1 a IGF-2 se podílejí zejména na regulaci růstu, proliferaci, diferenciaci, migraci a vstupu buněk do apoptózy.

Vzájemným porovnáním primárních sekvencí a 3D struktur těchto třech proteinů (obr. 1, str. 12) je možné vidět značnou strukturní podobnost. Významným společným rysem je přítomnost evolučně konzervovaných strukturních motivů – tří α -šroubovic lokalizovaných jako šroubovice 1 v B-doméně, šroubovice 2 a šroubovice 3 v A-doméně a přítomnost tří disulfidických můstků stabilizujících dané struktury (obr. 1) (3). Hlavním strukturním rozdílem mezi insulinem a růstovými faktory podobnými insulinu je přítomnost dvou řetězců v molekule insulinu (A a B) oproti jednomu řetězci IGF obsahujícího kromě A- a B-domény ještě navíc C- a D-domény. Sekvenčně sdílejí tyto tři hormony v doménách A a B asi 50% identitu (4). Řetězec A insulinu je složen z 21 aminokyselin, řetězec B je tvořen 30 aminokyselinami (5). Řetězec IGF-1 je složen ze 70 a řetězec IGF-2 z 67 aminokyselin.

1.2 Receptory insulinu a růstových faktorů podobných insulinu

Insulinový receptor (IR) a receptor růstového faktoru 1 podobného insulinu (IGF-1R) jsou membránové glykoproteiny ze skupiny tyrosinkinasových receptorů, tvořených dvěma α - a dvěma β -podjednotkami, propojenými disulfidickými můstky (6; 7).

Podobně jako insulin, IGF-1 a IGF-2 i jejich receptory se vyznačují vysokou homologií, pohybující se od 41 do 84 %, v závislosti na porovnávané doméně. Nejvyšší podobnosti IR a IGF-1R je dosaženo v místech tyrosinkinasové domény (82 %) (8). Vzájemná podobnost receptorů dává kromě homodimerních vzniknout také heterodimerním receptorům IGF-1R/IR neboli hybridním receptorům nalezeným ve všech tkáních tvořících IR a IGF-1R. Receptor IGF-2R nepatří do skupiny tyrosinkinasových receptorů, jedná se o manosa-6-fosfátový receptor a jeho hlavní funkcí je pravděpodobně odstraňovat IGF-2 z krevního oběhu (tzv. clearance).



Obrázek 1. (a) Porovnání primárních sekvencí IGF-1, IGF-2 a insulínu. Černé obdélníky vyznačují pozice α -šroubovic. (b) Schematické zobrazení 3D struktur insulínu, IGF-1 a IGF-2. Šroubovice 1 v rámci B-domény je zobrazena modře, šroubovice 2 v A-doméně růžově a šroubovice 3 červeně. Převzato a upraveno podle (3).

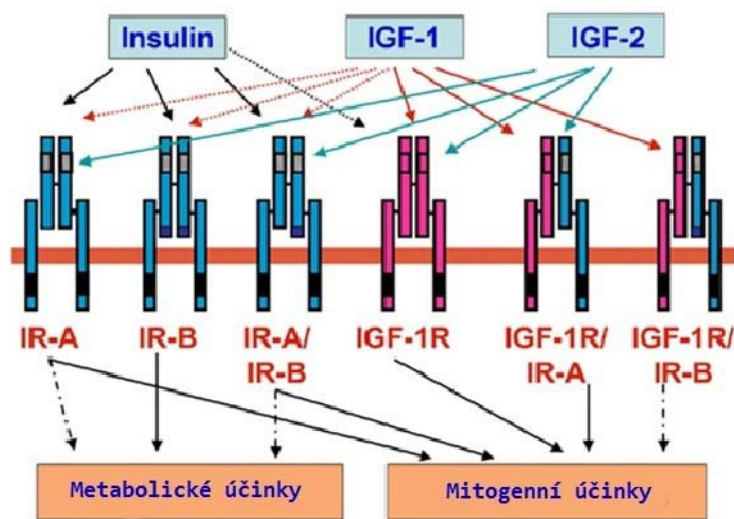
Insulinový receptor podléhající alternativnímu sestřihu se vyskytuje ve dvou isoformách, IR-A (- exon 11) a IR-B (+ exon 11), lišících se přítomností či nepřítomností 12 aminokyselin na C-konci extracelulární α -podjednotky, tzv. CT-peptidu. Tento rozdíl v sekvenci IR spolu s rozdílnou orgánovou expresí a afinitou vůči ligandům je odpovědný za rozdílné funkce obou isoform (9). Isoforma IR-B se exprimuje zejména v játrech, adipocytech a ve svalech, kde primárně zprostředkovává metabolickou funkci insulínu. Isoforma IR-A je exprimována v ostatních tkáních a také ve fetálních a tumorových tkáních, a zprostředkovává tak primárně antiapoptotické a mitogenní účinky. V celé radě tkání jsou ovšem v různých poměrech zastoupeny obě isoformy IR.

1.3 Vazby ligandů na receptory

Účinek hormonů je podmíněn jejich vazbou na specifický membránový receptor (10). Vazba insulínu a IGF na příslušné receptory a aktivace signálních drah, které posléze vyvolají buď metabolické nebo mitogenní účinky hormonů, je ovlivněna hlavně příslušnými vazebnými afinitami (rovnovážnými disociačními konstantami K_d) ligandů vůči receptorům a zároveň rychlostními konstantami disociace a asociace hormonů vůči

receptorům (k_{off} a k_{on}). Předpokládá se, že pro vyvolání metabolické odpovědi je nutné rychlé navázání ligandu na receptor a rovněž jeho rychlá disociace z komplexu. Naopak pomalejší vazba na receptor, pomalejší disociace ligandu z receptoru a také zvýšená míra internalizace receptoru vyvolaná vazbou ligandu vedou spíše k mitogenní odpovědi (11).

Insulinový receptor (IR-A i IR-B) má vysokou afinitu (K_d asi 0,1 nM) pro insulin. Jeho isoforma IR-A navíc představuje významný receptor pro IGF-2 (K_d přibližně 5 nM), přičemž afinita (IC_{50}) IGF-1 vůči IR-A je asi 15 nM (hodnoty určené v laboratoři Dr. Jiráčka) a vůči IR-B ještě nižší (300-500 nM) (3). Na isoformu B receptoru insulinu se tak ve fyziologických koncentracích váže pouze insulin. IGF-1R váže IGF-1 s vysokou (0,5-1 nM) afinitou a IGF-2 o něco slaběji (IC_{50} 1-2nM), insulin se váže na tento receptor již jen slabě (IC_{50} 100-200 nM) (hodnoty určené v laboratoři Dr. Jiráčka). Hybridy IGF-1R/IR vážou pouze IGF-1 a IGF-2, insulin nikoliv. Složitost a vzájemná provázanost tohoto systému receptorů a jejich ligandů je zobrazena na obrázku 2.



Obrázek 2. Vazby ligandů na receptory insulinu a IGF. Silné interakce jsou vyjádřeny plnými šipkami, slabé interakce šipkami čárkovanými. Stejně je tomu u spouštění metabolických či mitogenních účinků. Převzato a upraveno podle (12).

Důležitou roli v aktivaci receptorů příslušnými ligandy jsou jejich koncentrace a dostupnost v krevním oběhu. Zatímco insulin je v krvi přítomný ve velmi nízkých množstvích (asi 0,1nM koncentrace), IGF-1 a IGF-2 jsou přítomny v koncentracích

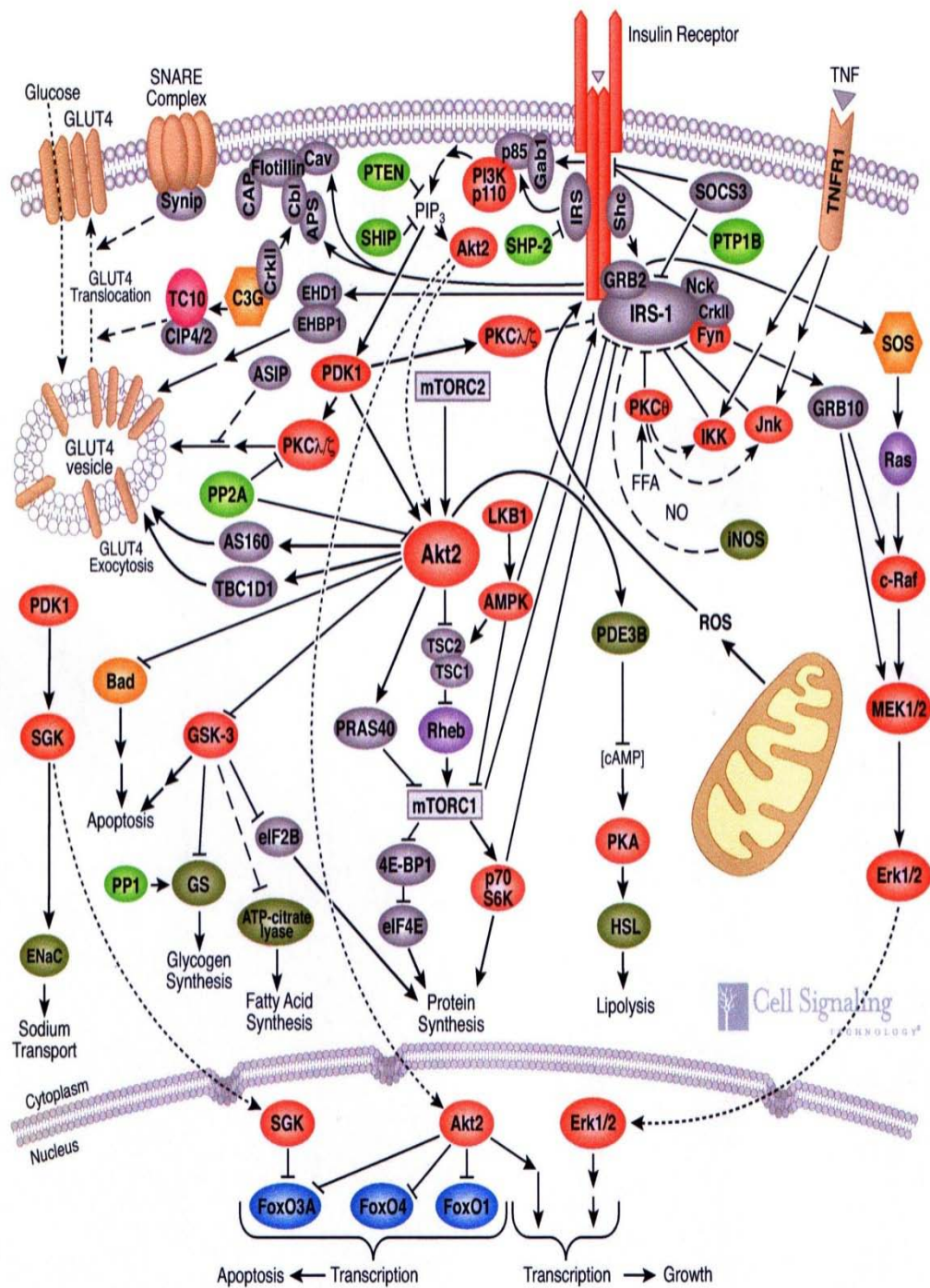
nanomolárních. Jejich dostupnost je ovšem ovlivněna faktem, že až 99 % volného IGF je v plasmě vázáno na tzv. IGF-vázací proteiny (IGF-BP z angl. IGF binding proteins) (13). Ty samy podléhají regulaci jejich exprese a proteolýzy a tím dokládají složitost systému insulínu a IGF.

1.4 Mechanismus působení insulínu, IGF-1 a IGF-2 na buněčné úrovni

Přestože insulín a růstové faktory podobné insulínu vykonávají v organismu odlišné funkce, využívají stejné signalizační dráhy (obr. 3, str. 15). Navázání ligandu na extracelulární část receptoru (IR, IGF-1R nebo IR/IGF-1R) způsobí konformační změnu vedoucí k autofosforylaci tyrosinů intracelulárních β -podjednotek. To má za následek spuštění signalizačních drah fosforylací tyrosinů dalších proteinů – zejména substrátů insulinového receptoru (tzv. IRS proteiny) (14). Tyto proteiny se po fosforylaci stávají základem pro další komplexní systém proteinů přenášejících signál, přičemž tato kaskáda ústí ve dvě hlavní větve – signál vede dále do buňky přes fosfoinositol-3-kinasu (PI3K) nebo přes proteinkinasy aktivované mitogenem (MAPK). Zatímco PI3K aktivuje protein Akt, MAPK vede signální dráhu přes protein Erk. Pro insulinový receptor je možné vazbu insulínu na isoformu B tohoto receptoru definovat jako dráhu odpovědnou za spíše metabolickou funkci, vedoucí přes fosforylaci PI3K a následně proteinu Akt k aktivaci GLUT4 transportéru, s výsledným vstupem molekul glukosy z krve do nitra buněk. Signál zprostředkovaný receptorem IGF-1R není možné definovat jako dráhu vedoucí buď k metabolickým nebo mitogenním účinkům, neboť přestože jsou aktivovány oba proteiny Akt i Erk, aktivace vede k mitogenním účinkům (15).

1.5 Analogy insulínu se selektivními účinky

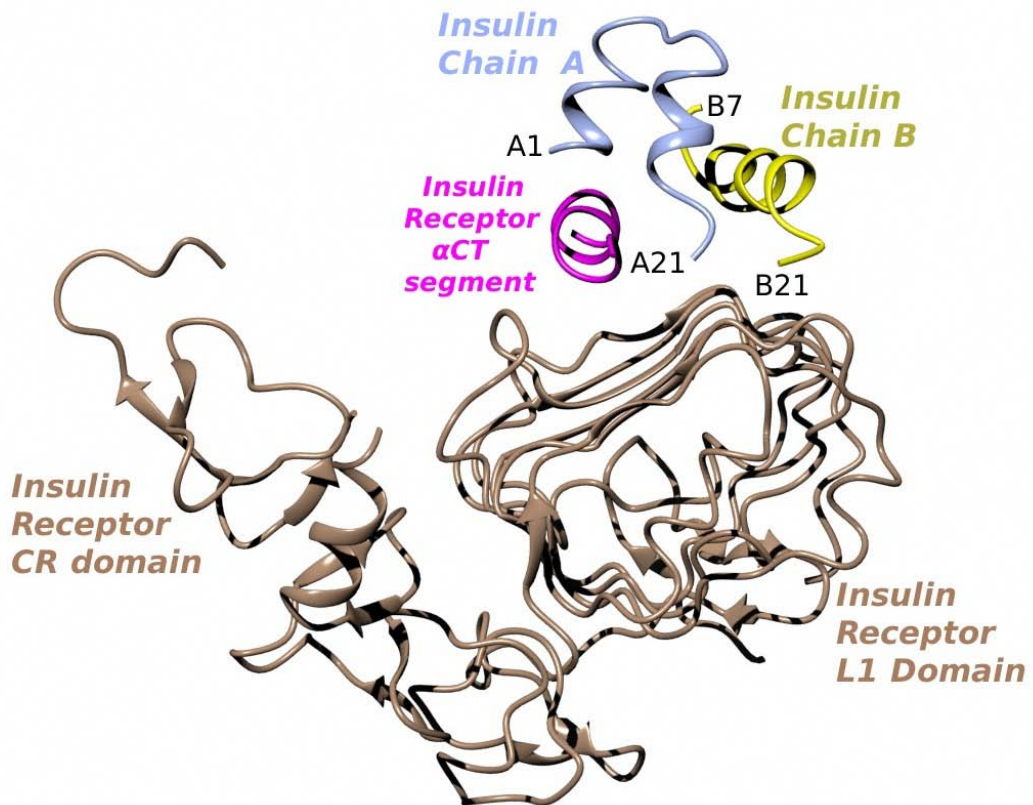
Modifikace ve struktuře molekuly insulínu mohou vést ke změnám jeho vazebných vlastností vůči IR-A, IR-B a IGF-1R. Tyto pozměněné struktury, insulinové analogy, tak mohou mít v porovnání s lidským insulínem zvýšené či snížené metabolické nebo mitogenní účinky. V klinické praxi je používáno 5 analogů insulínu (16), které vyvolávají metabolické účinky insulínu rychleji, nebo naopak působí déle oproti přirozenému insulínu. U některých dlouhodobě působících analogů byly vzneseny otázky ohledně jejich potenciálně zvýšených mitogenních, tzn. rakovinotvorných účinků (17; 18; 19).



Obrázek 3. Signalizační dráhy vyvolané aktivací insulinového receptoru či receptoru IGF-1R. Převzato z (20). Zkratky jsou rovněž uvedené v tomto zdroji (20).

Porozumění molekulárnímu mechanismu rozdílného působení insulínu na IR-A a IR-B (na obě isoformy se váže insulín s vysokou afinitou, ale vyvolává rozdílné účinky) a IGF-2 na IR-A a IR-B (IGF-2 se váže silně jen na IR-A a vyvolává mitogenní účinky) by mohlo vyústit v přípravu analogů insulínu se selektivními metabolickými účinky či k antagonistům IGF-2, které by mohly být užitečné při léčbě rakoviny, protože v některých nádorech je IGF-2 exprimován spolu s IR-A ve zvýšené míře.

Klíč k selektivitě hormonů je nejspíše v jejich primární a terciární struktuře. Nedávno publikovaná studie (21) poprvé naznačila způsob vazby insulínu na jeho receptor. Mimo jiné se ukázalo, že insulín se přímo účastní vazby na CT-peptid receptoru obsahující (v IR-B) či neobsahující (v IR-A) na svém C-konci 12 aminokyselin (exon 11) (obr. 4).



Obrázek 4. Způsob vazby insulínu na L1 doménu IR (světle hnědá) a CT-peptid IR (fialový). Řetězec A insulínu je žlutý, řetězec B je modrý. Aminokyseliny insulínu B22-B30 nejsou v komplexu viditelné, ale dá se předpokládat, že budou směřovat po povrchu L1 domény v blízkosti CT-peptidu či s ním přímo interagovat. CT-peptid v tomto případě je kratší formou přítomnou v IR-A. V IR-B by byl prodloužen “směrem ke čtenáři”. Převzato a upraveno podle (21).

Je možné, že se IGF-2 díky své 3D struktuře podobné insulinu váže na IR-A podobným způsobem jako insulin a že právě delší CT-peptid isoformy IR-B brání IGF-2 v silné vazbě. Je také možné, že C-doména IGF-2 (aminokyseliny 33-40; SRVSRRSR na obr. 1, str. 12) se interakce s CT-peptidem isoformy IR-B účastní (s negativním důsledkem na afinitu) a že naopak nevádí při interakci s IR-A, která má CT-peptid kratší.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce byla příprava a biologická charakterizace analogů insulínu prodloužených na C-konci B-řetězce insulínu o následující aminokyseliny odvozené ze sekvence C-domény lidského IGF-2:

a) S-R-V-S-R-R-S b) S-A-V-S-A-A c) S-K-V

To znamená připravit analogy DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-R-V-S-R-R-S insulín (a), DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulín (b) a DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulín (c) kde DOI značí des(B23-B30)oktapeptid-insulín. Primárním úkolem bylo připravit analog insulínu s C-koncem B-řetězce prodlouženým o heptapeptid S-R-V-S-R-R-S. Cíle připravit insulíny prodloužené o další dva peptidy, S-A-V-S-A-A a S-K-V, vyplynuly z výsledků a kontextu práce při jejím řešení.

Výsledné analogy insulínu by mohly poskytnout informace o úloze C-domény IGF-2 při vazbě IGF-2 na obě isoformy IR. Tyto analogy by rovněž mohly pomoci odpovědět na otázku, zda je možné změnit vazebnou a funkční selektivitu insulínu prodloužením jeho sekvence na C-konci B-řetězce o aminokyseliny odvozené od IGF-2 či naopak aminokyselinami se sekvencí IGF-2 nesouvisejícími.

3 Použitý materiál a přístroje

2-Cl-tritylová pryskyřice – *Novabiochem-Merck*

HI – *Sigma*

IGF-1 – *Tercica*

IGF-2 – *Sigma*

buňky R⁺³⁹ – myší fibroblasty s blokovanou expresí genů pro myší IR-A, IR-B a IGF-1R, a naopak transfektované lidským IGF-1R, darovány Prof. A. Belfiorem, Univerzita Catanzaro, Itálie

médium DMEM – médium obsahující fetální hovězí sérum, L-glutamin, penicilin, streptomycin, puromycin – *PAA*

protilátky proti pAkt a pErk 1/2 – *Cell Signaling Technology*

protilátka proti IGF-1R β – *Santa Cruz Biotechnology*

proti-králičí protilátka A9169 – *Sigma*

proti-myší protilátka A9044 – *Sigma*

PVDF membrána – *Millipore*

vepřový insulin – *Spofa*

Wangova pryskyřice (*Fmoc-serine/valine(tBu)-Wang resin*) – *Novabiochem*

Centrifugy - Jouan CR 3i a Hettich Universal 320 - *Schoeller*

Incubátor – CO₂ Incubator MCO 20AIC - *Sanyo*

Lyofilizační přístroj Heto FD3

Mikroskop Axiovert 40 CFL - *Zeiss*

Spektrofotometr Lambda 25 - *PerkinElmer*

Ultrazvukový homogenizátor Elmasonic S 30 - *Elma*

Vakuová odparka Heidolph WB 2000

Přístroje pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii – *Waters*

Zařízení pro imunopřenos – Trans Blot SD Cell - *Bio-Rad*

Zdroj používaný při elektroforéze a při imunopřenosu – POWER Pac 1000 - *Bio-Rad*

4 Metody

4.1 Purifikace a analýza peptidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) byla prováděna na přístrojích firmy Waters (čerpadlo Waters 600, duální UV/VIS detektor Waters 2487). Pro purifikaci peptidů připravených pomocí syntézy na pevné fázi byla používána preparativní kolona (Luna C-18, 250 x 21,2 mm, 10 μ m, firma Phenomenex) s průtokovou rychlostí 9 ml/min. Průběh reakcí a čistota látek byly kontrolovány pomocí analytické kolony (Nucleosil 120-5 C-18, 250 x 4 mm, firma Watrex Praha, ČR) s průtokovou rychlostí 1 ml/min a pro purifikaci výsledných analogů insulínu semipreparativní kolona (Nucleosil 120-5 C-18, 250 x 8 mm, Watrex Praha, ČR) s průtokovou rychlostí 3 ml/min.

Eluce látek z kolony byla zajištěna roztokem o zvyšující se objemové koncentraci ACN v deionizované vodě za přítomnosti 0,1% TFA při pokojové teplotě. V dalším textu jsou mobilní fáze označovány jako roztok A (0,1% TFA ve vodě) a roztok B (0,1% TFA s 80% ACN ve vodě). Pro preparaci peptidů připravených pomocí syntézy na pevné fázi byl použit následující gradient: 0 minut/10% B, 30. minuta/100% B a 31. minuta /10% B. K analytickým stanovením, respektive preparaci produktů enzymových semisyntéz, byl použit tento gradient: 0 minut/10% B, 1. minuta/35% B, 21. minuta/45%B, 34 minuta/55% B, 36. minuta/90% B, 37. minuta/90% B a 37,1. minuta/10% B. Detekce látek byla prováděna měřením absorpance při vlnových délkách 258 a 218 nm. Získaná data byla vyhodnocována v chromatografickém programu Clarity Lite od firmy Data Apex, ČR.

4.2 Příprava peptidů syntézou na pevné fázi

4.2.1 Manuální syntéza peptidů na pevné fázi

Peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A, byl připraven metodou manuální syntézy na pevné fázi pomocí acidolabilní 2-chlorotrytylové pryskyřice v množství 400 μ mol. Syntéza byla provedena v plastové stříkačce s fritou. Byly použity aminokyseliny s chráněnými α -aminoskupinami prostřednictvím 9-fluorenylmethoxykarbonylové skupiny (Fmoc). Postranní řetězce threoninu, tyrosinu a serinu byly chráněny t-butylovou skupinou (tBu). N^ε-aminoskupina lysinu byla chráněna fenylacetylovou skupinou (Pac) (22). Ve snaze

předejít racemizaci aminokyselin, je syntéza na pevné fázi započata na C-terminálním konci. První aminokyselina, Fmoc-alanin, (400 μmol , tj. 1 ekvivalent) se třemi ekvivalenty DIPEA byla přidána k pryskyřici (1 ekvivalent) v 1,6 ml suchého DCM. Reakce probíhala 1,5 hodiny za občasného promíchání. Následně byla pryskyřice s první navázanou aminokyselinou ponechána na dobu 3 x 3 minuty v 5 ml směsi DCM : MeOH : DIPEA (17 : 2 : 1, v/v), čímž byly zablokovány zbylé nezreagované chloridové skupiny pryskyřice. Pryskyřice byla následně 5x promyta 2 ml DMF. Chránicí skupina Fmoc byla odštěpena pomocí 1 ml 30% (v/v) roztoku piperidinu v DMF (5 a následně 20 minut). Úspěšnost syntetické a následné „deproteční“ reakce byla kontrolována spektrofotometricky měřením absorbance piperidin-dibenzofulvenového komplexu vzniklého odstraněním Fmoc-skupiny. Absorbance komplexu byla měřena při vlnové délce 301 nm a za použití extinkčního koeficientu $7040 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bylo možné určit množství odštěpené skupiny Fmoc, které rovněž odpovídá množství navázané aminokyseliny. Navázání dalších aminokyselin (2,5 ekvivalentu) bylo provedeno s kondenzačními činidly HBTU (2,5 ekvivalentu) a DIPEA (7 ekvivalent) v prostředí NMP (3 ml) vždy po dobu 1-2 h. Při reakci přes noc kondenzace aminokyseliny (2,5 ekvivalentu) probíhala s činidlem DIC (2,5 ekvivalentu) v prostředí rozpouštědel NMP : DCM (1 : 1, v/v). Úplnost kondenzačních reakcí byla kontrolována Kaiserovým testem (23) a v případě neúplné kondenzace byla reakce opakována za stejných podmínek. Pryskyřice s výsledným peptidem byla důkladně promyta DMF a následně suchým DCM. Poté byl peptid z pryskyřice štěpen směsí AcOH : TFE : DCM (2 : 2 : 6, v/v) po dobu 2 hodin. Získaný produkt štěpení byl odpařen do sucha na vakuové rotační odparce. Následně, působením směsi TFA : TIS : H₂O : DCM (50 : 3 : 3 : 44, v/v) po dobu 1 h, byly odstraněny tBu-chránicí skupiny. Získaný produkt byl znovu odpařen, 3x extrahován diethyletherem a ponechán v exsikátoru k dosušení. Peptid byl rozpuštěn v roztoku vody a 40% ACN a purifikován pomocí RP-HPLC.

4.2.2 Automatická syntéza peptidů na pevné fázi

Peptidy G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S a G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V byly syntetizovány v servisním pracovišti Syntéza peptidů ÚOCHB AV ČR na automatizovaném syntetizátoru ABI 433A od firmy Applied Biosystems. Příprava peptidů byla provedena metodou syntézy na pevné fázi podle Merrifielda za použití Fmoc skupiny jakožto N^α-

terminální chránící skupiny (24). Syntéza probíhala na Wangově pryskyřici komerčně substituované první aminokyselinou v pořadí od C-konce peptidu (serin či valin). Chránění postranních skupin aminokyselin a kondenzační činidla použity v této přípravě peptidů se shodují s činidly v manuální přípravě. Syntéza byla uskutečněna v měřítku 100 μ mol pro peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S a v měřítku 260 μ mol pro peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V. Každý kondenzační cyklus byl proveden 1-2x, přičemž bylo vždy přidáno 10-násobné molární množství Fmoc-aminokyseliny a stejné množství HBTU za přebytku DIPEA v prostředí NMP. Výsledná pryskyřice s peptidem byla promyta s DCM, peptid odštěpen z pryskyřice za současného odštěpení chránících skupin směsí TFA : TIS : H₂O (95 : 2,5 : 2,5, v/v, 5 ml) po dobu 2 hodin. Po odpaření do sucha byla směs extrahována diethyletherem a peptid purifikován pomocí RP-HPLC.

4.3 Enzymová semisyntéza analogů insulinu

4.3.1 Enzymová semisyntéza analogů insulinu - Metoda A

Metoda A enzymové semisyntézy analogů insulinu byla provedena podle Svobody a kol. (25; 26) a Žákové a kol. (22). Des(B23-B30)oktapeptid-insulin (DOI) byl připraven dle Žákové a kol. (22). Připravený peptid (150 mM) byl spolu s DOI (30 mM) rozpuštěn v roztoku o celkovém objemu 200 μ l obsahujícím 55% (v/v) DMF ve vodě, 20 mM octan vápenatý a 4,7 mg TPCK-trypsinu (odpovídá molárnímu poměru enzym : DOI přibližně 1 : 30). Reakce byla startována přidáním TPCK-trypsinu v 50 μ l roztoku octanu vápenatého. Ihned po promíchání bylo pH reakční směsi bylo upraveno na hodnotu přibližně 6,9-7,1 přidáním *N*-methylmorfolinu (1-10 μ l) a zkontrolováno pomocí pH papírku. Reakce probíhala za současného míchání při laboratorní teplotě (20-25°C). Průběh semisyntetické reakce byl průběžně sledován pomocí RP-HPLC na analytické koloně. Reakce byla zastavena přidáním vychlazeného acetonu. Vysrážené peptidy byly centrifugovány, sediment vysušen, rozpuštěn v 10% kyselině octové a produkty purifikovány pomocí RP-HPLC. Acetonová fáze, která obsahovala hlavně výchozí syntetický peptid, byla odpařena do sucha, odparek rozpuštěn v 10% kyselině octové a peptid purifikován pomocí RP-HPLC.

4.3.2 Enzymová semisyntéza analogů insulinu - Metoda B

Alternativně byla použita Metoda B enzymové semisyntézy podle Nakagawy a Tagera (27), která poskytuje lepší rozpustnost pro více hydrofobní syntetické peptidy. Peptid (výsledná koncentrace 33 mM) byl spolu s DOI (výsledná koncentrace 7,7 mM) a 1,5 mg TPCK-trypsinu rozpuštěn v roztoku o celkovém objemu 400 μ l obsahujícím 140 μ l DMA, 140 μ l 1,4-butandiolu a 120 μ l vodného roztoku obsahujícího 0,2 M Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM Ca(AcO)₂ a 1mM EDTA. Ihned po přidání TPCK-trypsinu bylo pH reakce upraveno přidáním *N*-methylnmorpholinu (5 μ l) na hodnotu 7,0 a ověřeno pH papírkem. Reakce byla míchána za laboratorní teploty a její průběh byl kontrolován pomocí analytického RP-HPLC. Reakce byla zastavena a reakční směs zpracována stejným způsobem jako v případě Metody A.

4.4 Enzymové odchránění produktu semisyntézy analogů insulinu

Analogy insulinu obsahující chránící skupinu Pac na N^ε-skupině lysinu(ů) byly zbaveny chránících fenylacetylových skupin na příslušných lysinech působením enzymu penicilinamidohydrolasy (EC 3.5.1.11) metodou podle Žákové a kol. (22). Analog insulinu byl rozpuštěn v 1 ml 50 mM K-fosfátového pufru o pH 7,5 v množství přibližně 1 mg na 250 μ l pufru. Poté byla přidána penicilinamidohydrolasa (10 IU v 10 μ l pufru). Reakce probíhala za stálého míchání při laboratorní teplotě či při 37°C. Průběh reakce byl monitorován pomocí analytického RP-HPLC. Po dokončení „deprotektce“ byl insulinový analog purifikován a charakterizován pomocí analytického RP-HPLC a hmotnostní spektrometrie.

Ve specifickém případě byl do reakční směsi přidán roztok inhibitorů proteas v množství 2 μ l na 1 ml reakční směsi. Tento roztok inhibitorů (Protease Inhibitor Cocktail, P8340 Sigma) obsahoval inhibitory AEBSF (104 mM), aprotinin (80 μ M), bestatin (4 μ M), E-64 (1,4 mM), leupeptin (2 mM) a pepstatin A (1,5 mM).

4.5 Hmotnostní spektrometrie peptidů

Identifikace připravených peptidů a insulinových analogů byla prováděna hmotnostní spektrometrií v Laboratoři hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR na přístroji LTQ Orbitrap XL od firmy Thermo Fisher Scientific metodou ESI (Electrospray Ionization) v pozitivním iontovém módu.

4.6 Metodika pro aktivaci receptoru IGF-1R

4.6.1 Pěstování buněk

Myší fibroblasty R⁺³⁹ obsahující lidský receptor IGF-1R byly kultivovány v médiu DMEM s 10% FBS v inkubátoru s 5% CO₂ atmosférou, při teplotě 37 °C. Buňky R⁺³⁹ byly nasazeny v počtu 15 000 buněk na jamku na pět destiček s 24 jamkami. Po 48 hodinách kultivace bylo sérové médium odebráno a nahrazeno médiem bez séra, ve kterém byly buňky ponechány v inkubátoru po dobu 20 hodin.

4.6.2 Stimulace buněk

Roztoky lidského insulínu, IGF-1, IGF-2 a analogů insulínu byly ředěny v médiu bez séra. Přesné koncentrace zásobních roztoků byly stanoveny spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm za použití extinkčního koeficientu 4560 M⁻¹cm⁻¹ pro IGF-1 a IGF-2 a 5840 M⁻¹cm⁻¹ pro dané analogy.

Pro každý ligand byla připravena koncentrační řada 0,1 nM, 1 nM, 10 nM a 100 nM. Jednotlivé roztoky byly přidány k buňkám R⁺³⁹ v jamkách destiček. Stimulace receptorů na buňkách probíhala po dobu 5, 10, 20, 30 a 60 minut. Stimulace byla zastavena odsátím média za pomoci vakua, následným opláchnutím fyziologickým roztokem a nakonec zalitím kapalným dusíkem. Buňky v destičkách byly po zastavení stimulace uchovány v suchém ledu. Obsah jedné jamky z každé destičky byl použit ke stanovení počtu rozmnožených buněk.

4.6.3 Příprava lyzátů buněk a vzorků pro elektroforetickou separaci

Pro lýzi buněk byl použit vzorkový pufr pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) s přidanými inhibitory proteas a fosfatů. Složení pufru bylo 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% SDS (w/v), 10% glycerol (v/v), 0,01% bromfenolová modř (w/v), 0,1 M DTT (w/v), 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ a 100 μl inhibitorů proteas (Sigma, P8340). Buňky byly lyzovány v jamkách v 100 μl lyzačního pufru pomocí ultrazvuku po dobu 1 minuty. Lyzáty buněk byly poté přeneseny do mikrozkušavek a uchovávány při -20 °C. Jednotlivé vzorky pro elektroforetickou separaci byly připraveny

smícháním 5 µl příslušného lyzátu s 5 µl lyzačního pufru a zahřáty po dobu 1 minuty na 100 °C.

4.6.4 Polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů z buněčných lyzátů v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Elektroforetická separace proteinů z buněčných lyzátů byla uskutečněna standardním způsobem v polyakrylamidovém gelu s dodecylsírany sodným (SDS). Složení dělicích a řadících gelů je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1. Složení gelů pro provedení elektroforézy. Uvedené objemy odpovídají přípravě dvou gelů.

	10% dělicí gel	4% řadící gel
Milli Q	6 ml	2,7 ml
30% akrylamidový mix (29,2% akrylamid; 0,8% bisakrylamid)	5 ml	670 µl
Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8 pro dělicí gel, 0,5 M, pH 6,6 pro řadící gel)	3,8 ml	500 µl
10% SDS	150 µl	40 µl
10% APS	150 µl	40 µl
TEMED	6 µl	4 µl

Elektroforetické dělení bylo provedeno v prostředí 0,025 M Tris/0,192 M glycinového elektrodového pufru s 0,1% (w/v) SDS. Hodnota elektrického proudu byla limitována hodnotou 24 mA/gel. Elektroforéza probíhala 10 minut při počátečním napětí 100 V, poté byla hodnota napětí zvýšena na 200 V, přičemž celková doba elektroforetické separace byla asi 1 hodina.

4.6.5 Imunopřenos elektroforeticky separovaných proteinů

Proteiny v gelech byly detekovány pomocí techniky tzv. imunopřenosu. Protilátky použité k detekci se vážou vždy jen na fosforylovanou formu prvků signální kaskády. Tímto

způsobem je možné po navázání chemiluminiscenčního substrátu sledovat intenzitu vyvolaného signálu.

Gely s proteiny byly po dobu 40 minut ponechány v pufru pro přenos (20 mM Tris, 189 mM glycin, 10% methanol (v/v), 0,1% SDS (w/v)). PVDF membrány byly před vlastním použitím k imunopřenosu aktivovány methanolem, následně opláchnuty deionizovanou vodou a po dobu 10 minut ponechány v prostředí pufru pro přenos. Filtrační papíry byly nasáknuty pufrem. Byl sestaven „imunopřenosový sendvič“ a přenos probíhal 70 minut v přístroji pro polosuchý přenos při konstantním napětí 12 V, přičemž limitní proud byl nastaven na 1.5 mA/cm². Po dokončení přenosu proteinů byly membrány inkubovány přes noc při teplotě 4 °C v 3% BSA v T-TBS (20 mM Tris/Cl pH 7,5, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20 (v/v)).

4.6.6 Inkubace proteinů na membráně s protilátkami

Membrány byly před, po a mezi inkubacemi s protilátkami oplachované v T-TBS, vždy po dobu 3 x 5 minut. Protilátky byly ředěny v 3% BSA v T-TBS.

Primární králičí protilátka proti IGF-1R β a primární králičí protilátka proti pAkt byly ředěny v poměru 1 : 1 000. Primární myší protilátka proti pErk1/2 byla ředěna 1 : 2 000. Sekundární proti-králičí protilátka byla ředěna 1 : 80 000. Sekundární proti-myší protilátka byla ředěna 1 : 24 000.

PVDF membrány s přenesenými proteiny byly rozstříženy v oblasti 75 kDa a použity pro dvojí detekci tj. spodní část (15-75 kDa) pro pAkt a následně pro pErk1/2 a horní část (75-250 kDa) pro celkový IGF-1R. Dvojí detekce byla umožněna po odstranění protilátek navázaných na proteiny pomocí vymývacího pufru „Restore Western Blot stripping buffer.“ Membrány byly inkubovány ve vymývacím pufru po dobu 30 minut. Odhalená místa na membráně po vymytí protilátek byla znovu zablokována roztokem 3% BSA v T-TBS.

Pro detekci signálu proteinových komplexů byl využit chemiluminiscenční substrát „SuperSignal® West FEMTO Max. Sensitivity Substrate“ od firmy Pierce, USA. Chemiluminiscence byla detekována pomocí CCD kamery ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, USA) a intenzita proužků byla kvantifikována v programu, který je součástí ovládacího systému kamery. Data byla zpracována v programu Excel.

5 Výsledky

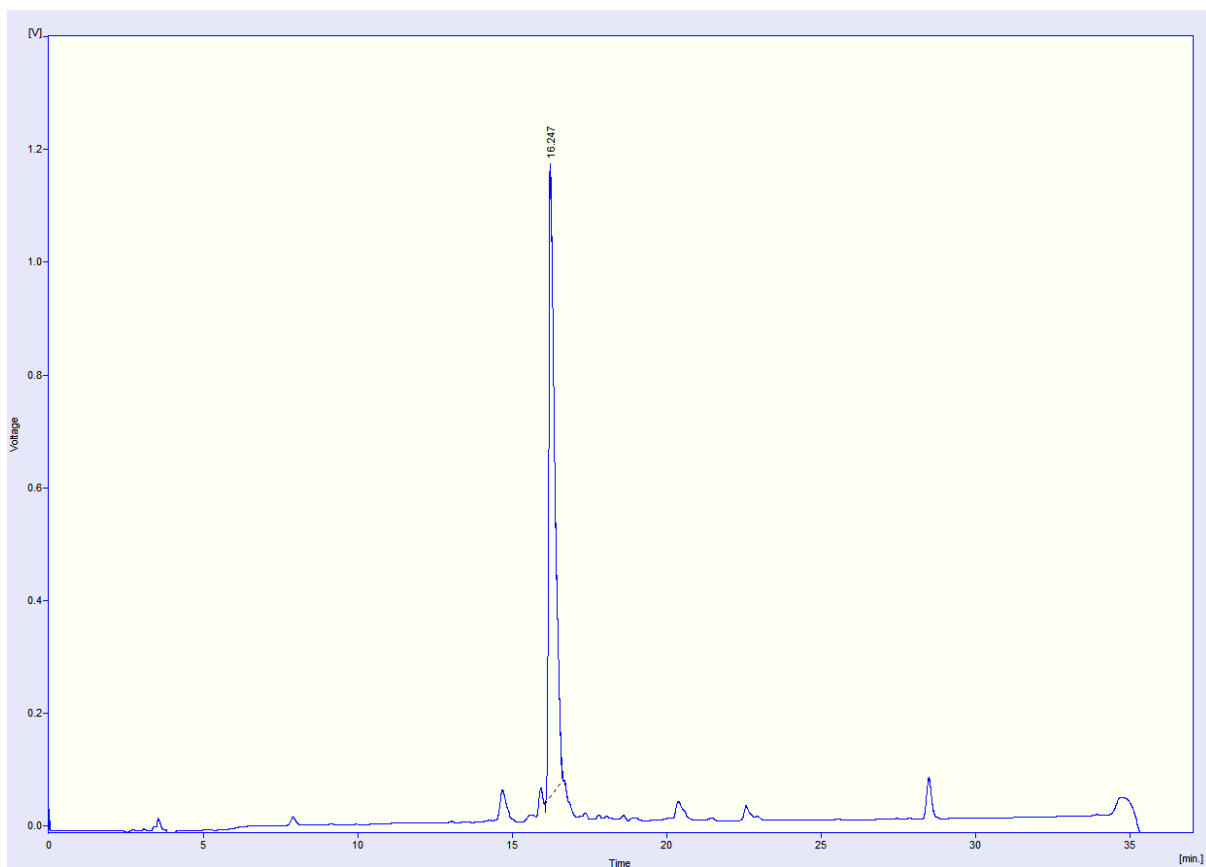
5.1 Příprava peptidů syntézou na pevné fázi

Syntézou na pevné fázi byly připraveny tři peptidy pro přípravu analogů insulínu. Sekvence těchto peptidů jsou spolu s jejich příslušnou relativní molekulovou hmotností a výtěžkem syntézy uvedeny v tabulce 2.

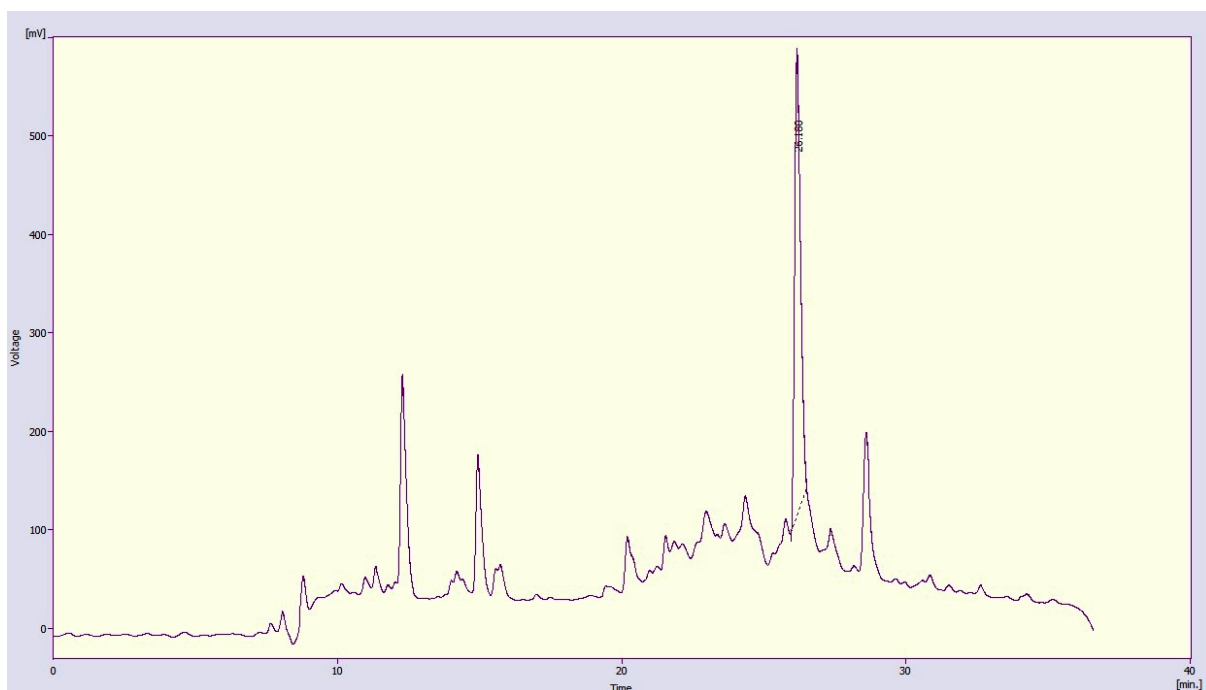
Tabulka 2. Produkty syntézy na pevné fázi. Výtěžek syntézy byl kalkulován po purifikaci na RP-HPLC a následné lyofilizaci. Aminokyseliny jsou uvedeny v jednopísmenném kódu. V tabulce jsou uvedeny i teoretické relativní molekulové hmotnosti (M_r) peptidů spolu s experimentálně zjištěnými hodnotami.

Sekvence peptidu	M_r teoretická	M_r experimentálně zjištěná	Výtěžek syntézy
G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S	1907,1354	1906,9885	59 %
G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A	1564,7348	1564,7686	20 %
G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V	1509,7544	1509,7755	20 %

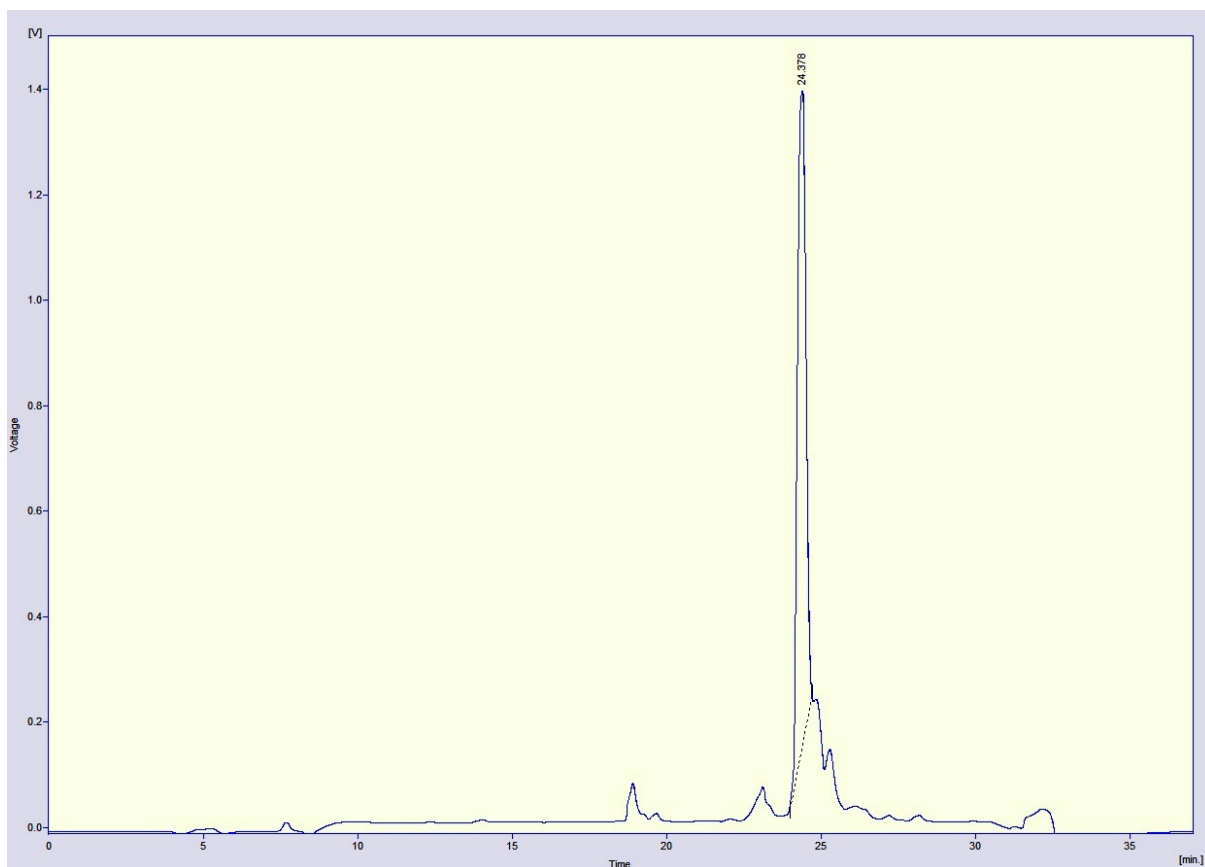
Purifikace výše uvedených peptidů byla provedena na preparativní koloně RP-HPLC za podmínek popsanych v kapitole 4.1. Chromatogramy purifikací jednotlivých peptidů jsou zobrazeny na obr. 5 – 7 (str. 28 – 29). Identifikace produktů syntéz na pevné fázi byla provedena hmotnostní spektrometrií. Získaná hmotnostní spektra jsou uvedena na obr. 8, 9 a 10 (str. 29 – 30). Čistota peptidů byla ověřena pomocí analytické RP-HPLC a v případě všech tří peptidů byla vyšší než 95%.



Obrázek 5. HPLC připraveného peptidu G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S. Vrchol s retenčním časem 16,247 minut byl „kolektován“.

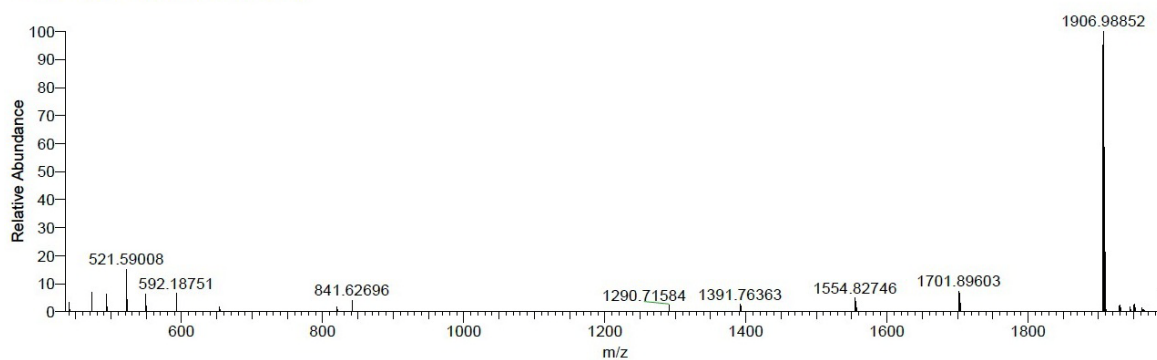


Obrázek 6. HPLC připraveného peptidu G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A. Vrchol s retenčním časem 26,180 minut byl „kolektován“.



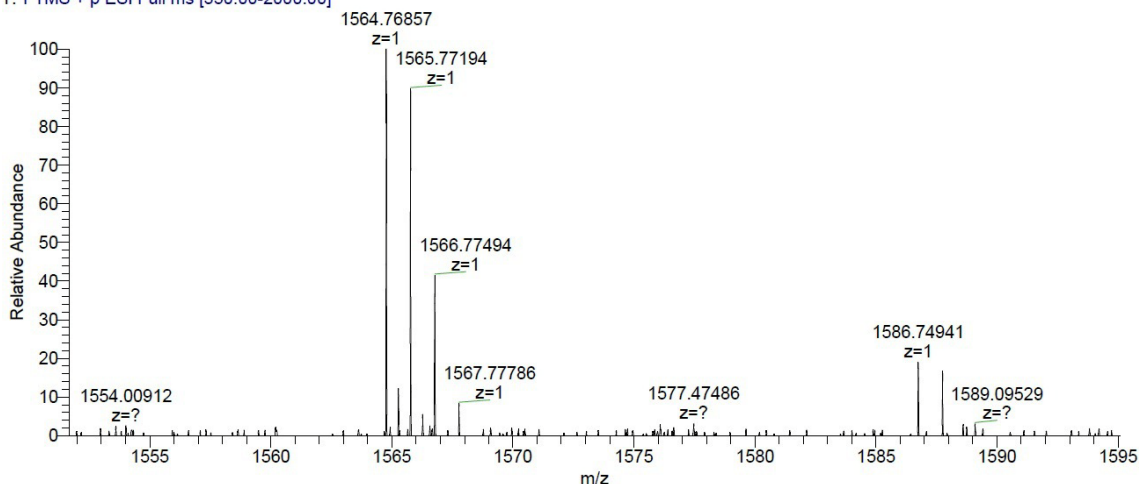
Obrázek 7. HPLC připraveného peptidu G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V. Vrchol s retenčním časem 24,378 minut byl „kolektován“.

Jiracek, IN-125-1_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 7.20E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



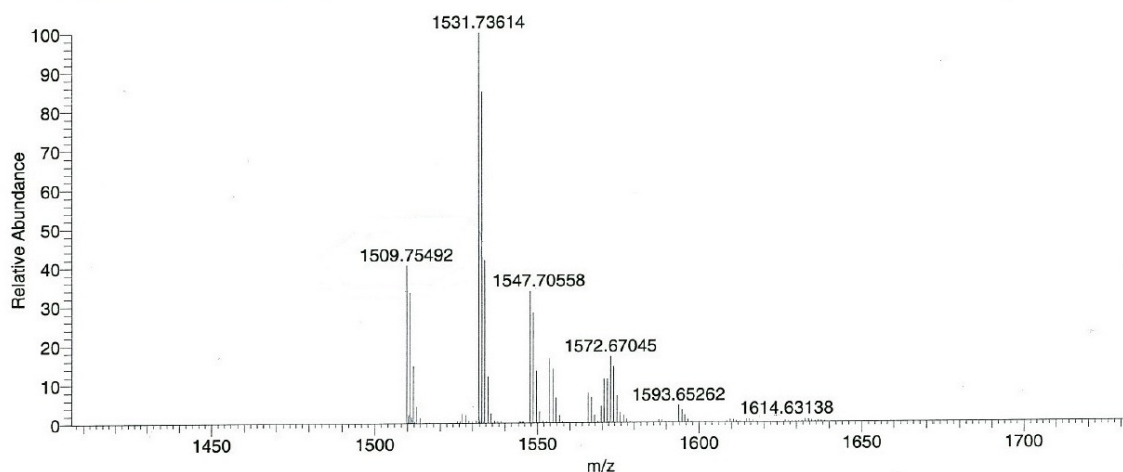
Obrázek 8. Hmotnostní ESI spektrum peptidu G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S v pozitivním režimu měření.

Jiracek, IN-121-3_120927095425 #122-129 RT: 3.43-3.62 AV: 8 NL: 1.47E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Obrázek 9. Hmotnostní ESI spektrum peptidu G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A v pozitivním režimu měření.

Kletvikova, IN-129_XT_00001_M_130328134840 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 4.83E6
T: FTMS + p ESI Full ms [230.00-2000.00]

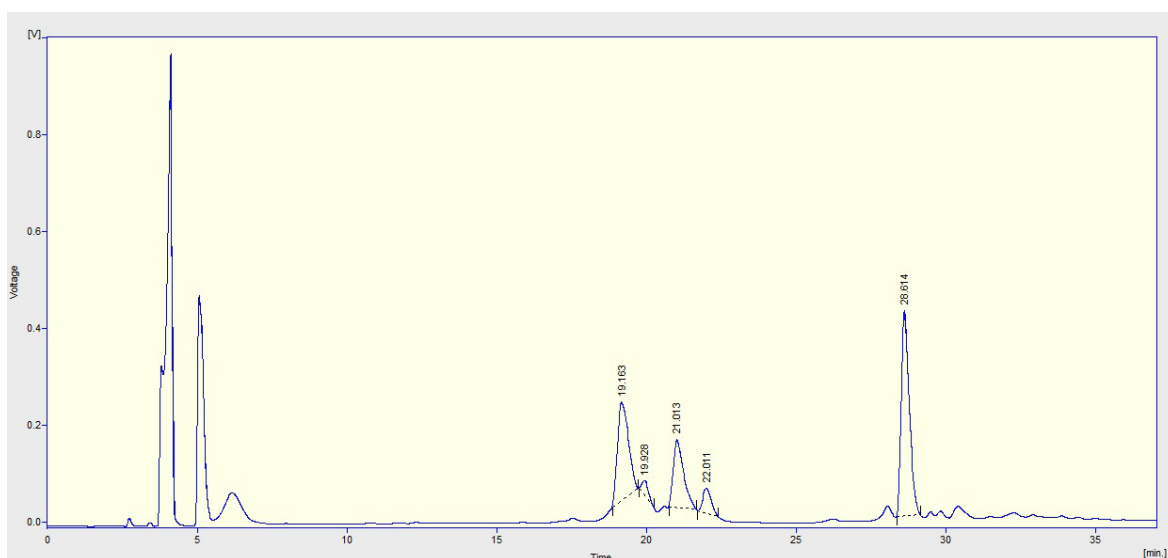


Obrázek 10. Hmotnostní ESI spektrum peptidu G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V v pozitivním režimu měření.

5.2 Enzymová semisyntéza DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S insulínu

Za katalytické účasti trypsinu byly provedeny kondenzační reakce popsané v kapitole 4.3. Semisyntéza DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S insulínu byla provedena dle Metody A (4.3.1) za použití peptidu G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S. Na obrázku 11 (str. 31) je zobrazen chromatografický záznam preparace reakční směsi po ukončení semisyntézy (5h). Hmotnostní analýza jednotlivých preparovaných vrcholů vyjevila, že

došlo ke štěpení výchozího 15aminokyselinového peptidu (G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S) za argininy. Tyto argininy jsou v sekvenci v závorce uvedeny červeně. Látka ve vrcholu v 19,16 min byla identifikována jako výchozí peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S, látka ve vrcholu z 19,93 min jako peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R (tzn. – S), látka ve vrcholu z 21,01 min jako peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R (tzn. – R-S), látka ve vrcholu z 22,01 min jako peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R a látka ve vrcholu v čase 28,61 min jako DOI. V reakční směsi se nepodařilo identifikovat očekávaný produkt. Je evidentní, že si TPCK-trypsin v reakční směsi zachoval hydrolytickou aktivitu napříč pH 7 reakční směsi a přítomnosti organického rozpouštědla (DMF).

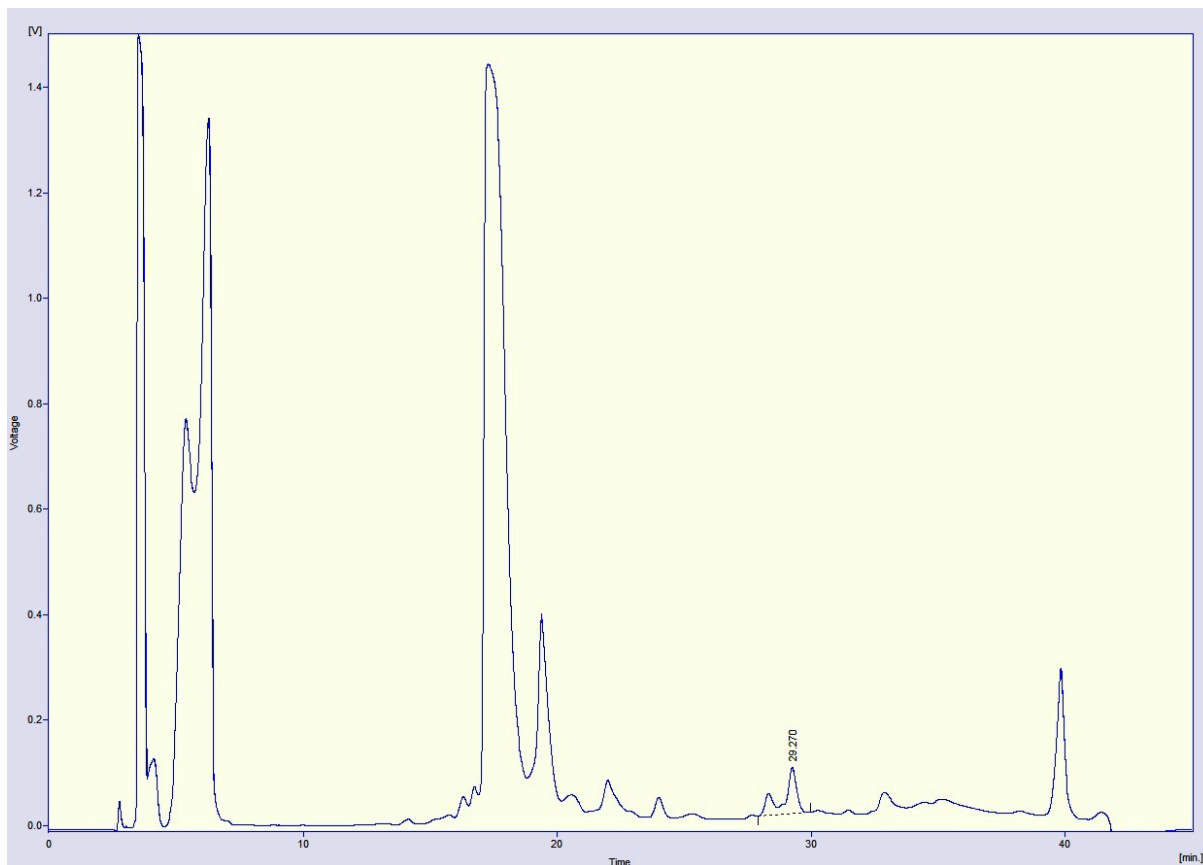


Obrázek 11. HPLC semisyntézy DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S insulinu. Jednotlivé vrcholy byly preparovány a identifikovány pomocí MS. Popis je v textu.

5.3 Enzymová semisyntéza a ochráníení DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A insulinu; příprava DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulinu

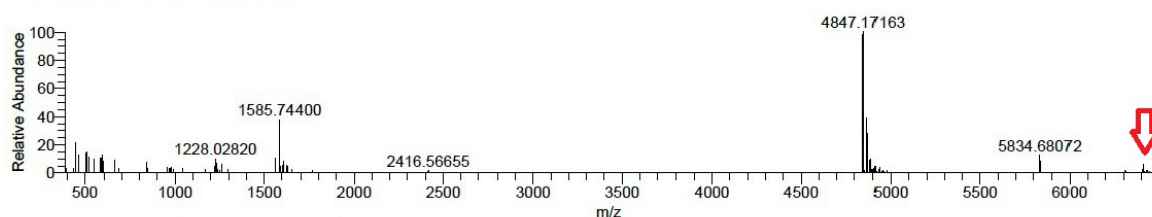
Semisyntéza dalšího analogu, DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A insulinu byla kvůli obtížné rozpustnosti peptidu G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A obsahujícího hydrofobní alaniny provedena podle Metody B (kapitola 4.3.2). Ta poskytuje lepší rozpustnost hydrofobnímu peptidu než Metoda A. Záznam purifikace reakční směsi je uveden na obrázku 12 (str. 33). Produkt reakce, DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A insulin, se

podářilo identifikovat jako minoritní signál (červená šipka na obrázku 13, str. 33) v hmotnostním spektru produktů ve dvojitěm vrcholu s retenčním časem 29,3 minut na obrázku 12. Pokusy o preparaci čistého produktu ze směsi látek selhaly, proto se přistoupilo k „deprotekcí“ (dle metody popsané v kapitole 4.4) skupiny Pac na lysinu na všechny proteiny a peptidy obsažené v této frakci. Tato metoda se ukázala být úspěšná, neboť z reakční směsi byl ve vrcholu z 23,7 minuty preparací na analytické RP-HPLC koloně izolován žádaný produkt, DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulin, jak je vidět na chromatogramu zobrazeném na obrázku 14 (str. 34). RP-HPLC analýza produktu je zobrazena na obrázku 15 (str. 34). Produkt je ve vrcholu z 20,85 minuty. Hmotnostní spektrum tohoto produktu je zobrazeno na obrázku 16 (str. 35). Teoretická monoisotopická relativní molekulová hmotnost DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulinu je 6289,8817, analyzována byla 6289,884. Iontový signál 6330,841 v hmotnostním spektru je produkt s jedním iontem K^+ a signál 6368,789 pak se dvěma ionty K^+ . Finální výtěžek semisyntézy a „deprotekcí“ DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulinu byl pouze asi 8 μg (měřeno spektrofotometricky v roztoku), což odpovídá výtěžku asi 0,1 % vztaženo na limitující složku semisyntetické reakce (DOI). Toto množství však bylo dostatečné pro následující biologické pokusy.

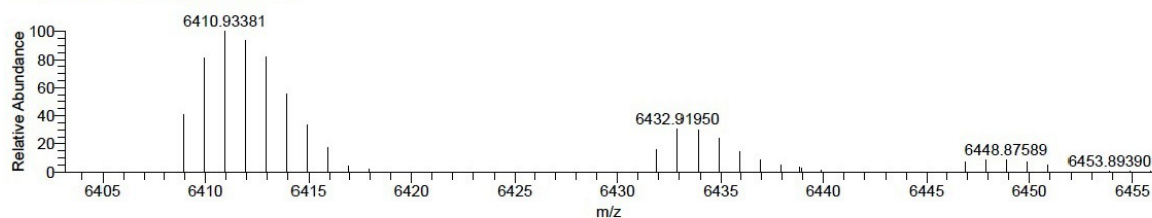


Obrázek 12. HPLC připraveného DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A insulínu. Produkt byl identifikován ve frakci z 29,27 minuty.

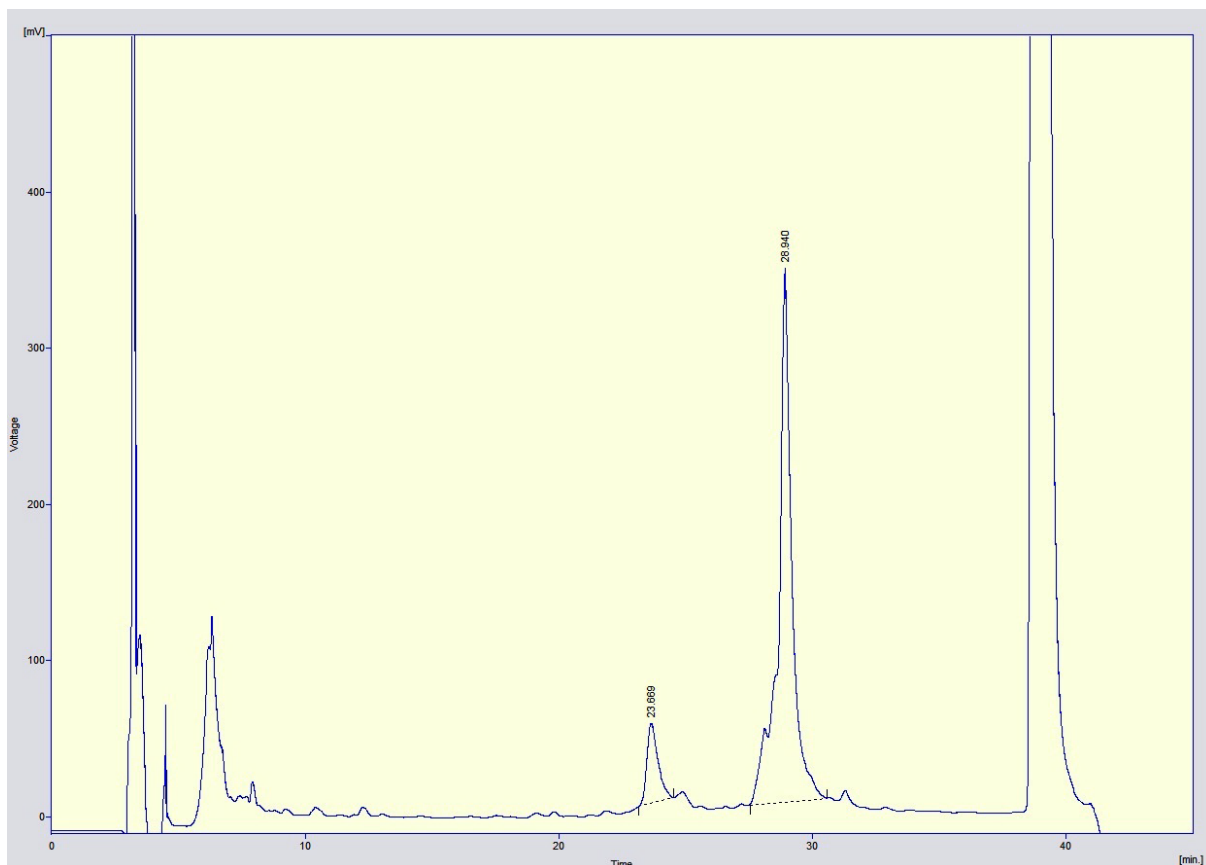
Zakova, 24-01-13-5_XT_00001_M_130201141716 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 3.15E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



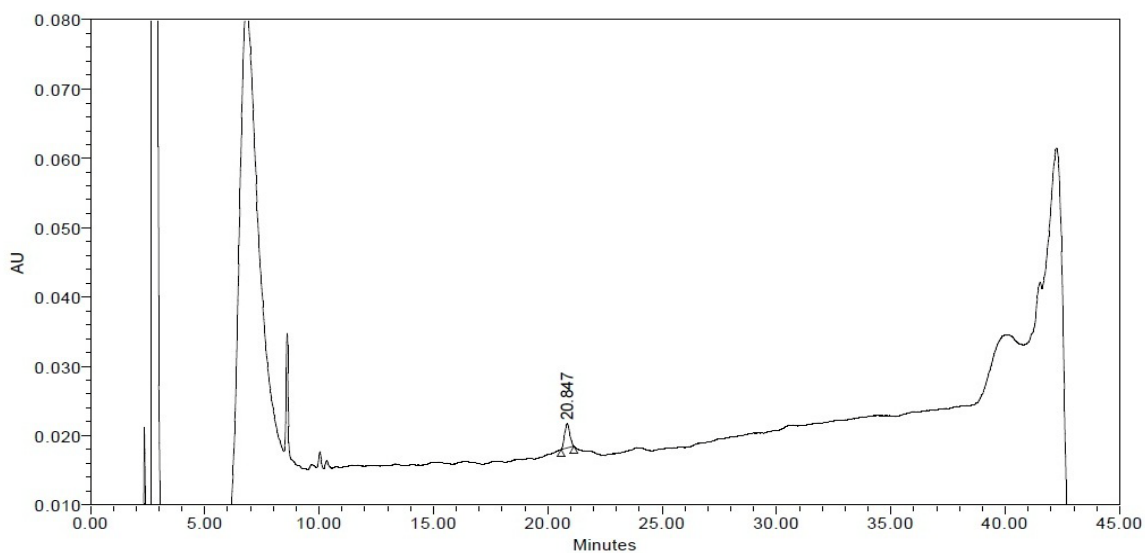
Zakova, 24-01-13-5_XT_00001_M_130201141716 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 1.91E4
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Obrázek 13. Hmotnostní spektrum produktů semisyntézy DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A insulínu v pozitivním režimu měření. Signál m/z DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A insulínu je označen červenou šipkou.

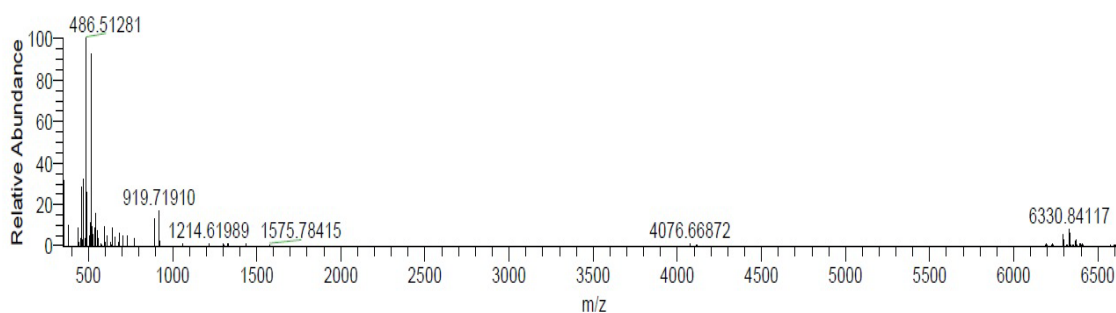


Obrázek 14. HPLC připraveného DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulinu. Výsledný produkt byl identifikován ve vrcholu z 23,7 minuty. Vrchol z 28,9 minuty představuje látky, kterými byl DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A insulin před „deprotekcí“ „maskován“.

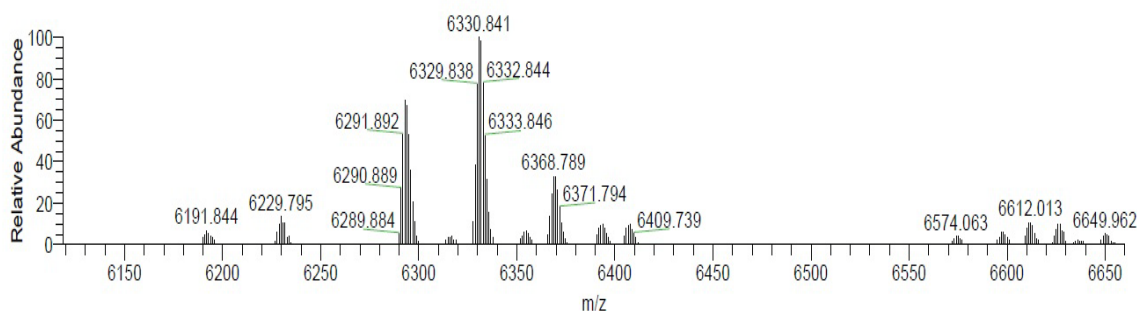


Obrázek 15. HPLC připraveného DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulinu. Produkt je ve vrcholu z 20,85 minuty.

Jiracek, 13-03-13-1S_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 1.10E6
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



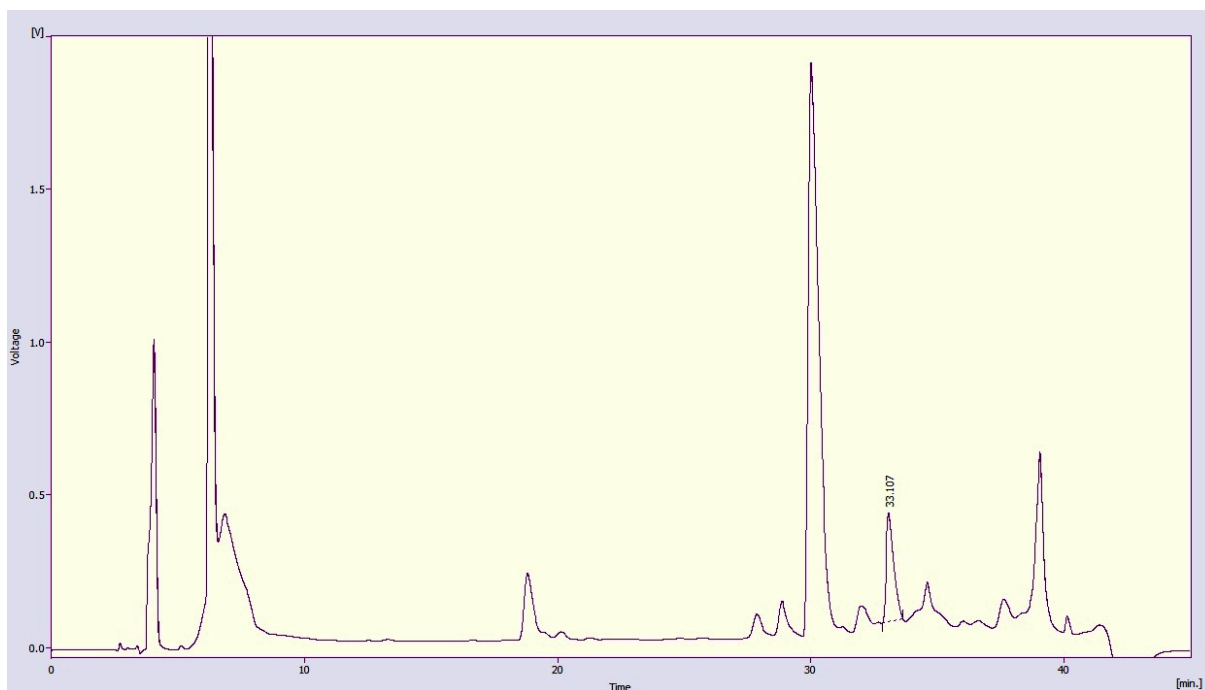
Jiracek, 13-03-13-1S_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 8.43E4
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Obrázek 16. Hmotnostní spektrum DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulinu v pozitivním režimu měření.

5.4 Enzymová semisyntéza a ochráníení DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulinu; příprava DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulinu

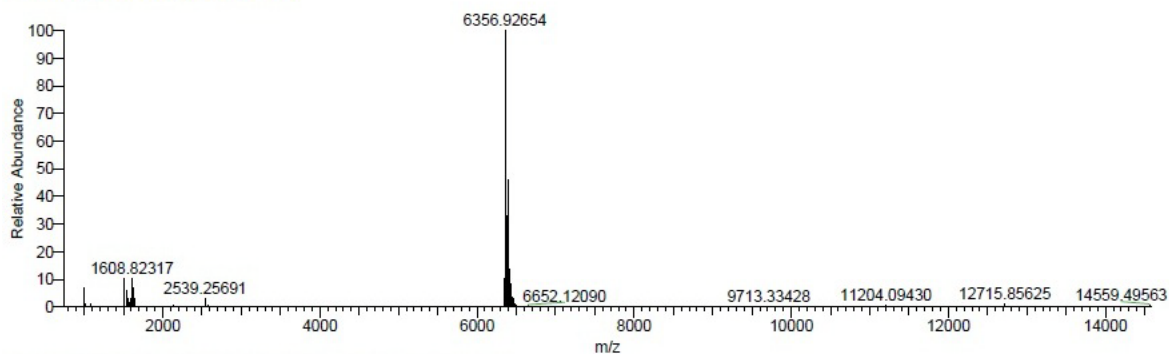
Enzymová semisyntéza DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulinu byla provedena podle Metody B. Chromatografický záznam purifikace reakce je na obrázku 17 (str. 36). Produkt semisyntézy byl identifikován ve vrcholu z 33,1 minuty. Reakce a následná HPLC purifikace poskytla 3,4 mg produktu s výtěžkem semisyntézy 17,3 % (vztaženo k DOI). Hmotnostní spektrum produktu je zobrazeno na obrázku 18 (str. 37). Monoisotopická M_r produktu je 6353,917 a experimentálně zjištěna byla 6353,921.



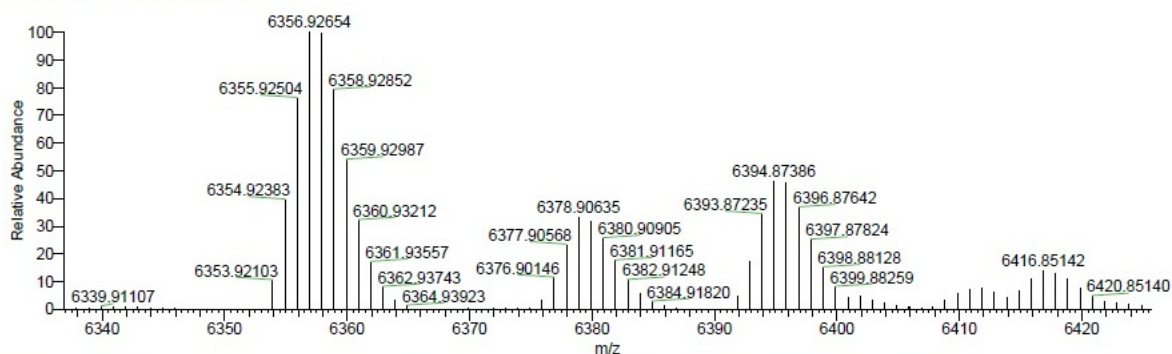
Obrázek 17. HPLC připraveného DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulinu.

Dalším krokem bylo odštěpení chránících Pac skupin DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulinu pomocí enzymu penicilinamidohydrolasy. První „deprotekční“ reakce provedená na 1,3 mg DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulinu dle standardního postupu uvedeného v metodické části práce vedla pouze k izolaci DOI a DOI-G-F-F-Y-T-P-K insulinu (data nejsou ukázána).

Jiráček, 26-06-13B-3+_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 2.21E6
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Jiráček, 26-06-13B-3+_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 2.21E6
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]

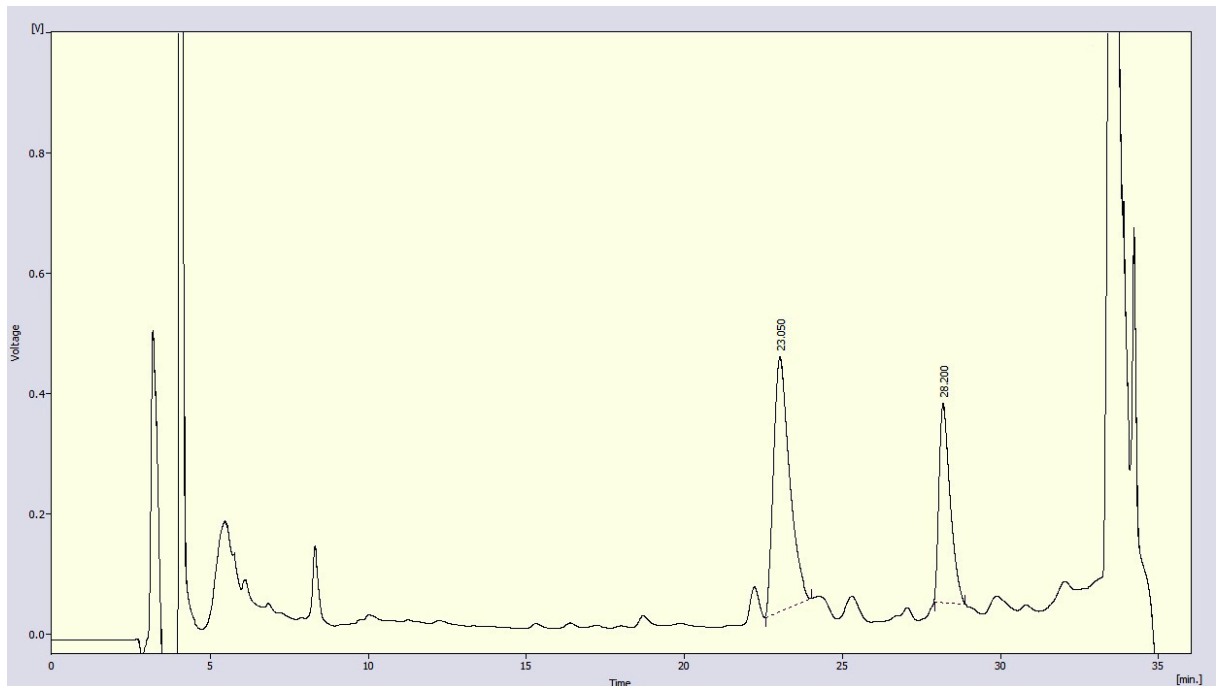


Obrázek 18. Hmotnostní spektrum DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulinu v pozitivním režimu měření.

To znamená, že k odštěpení fenylacetylových skupin došlo, nicméně produkt byl proteolyticky degradován štěpením za lysiny. Z toho důvodu byla k enzymu přidána směs inhibitorů proteas (kapitola 4.4) a následně byla provedena „deprotektace“ s 2,1 mg DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulinu, přičemž reakce probíhala po 24 hodin za laboratorní teploty. Poté byly produkty preparovány pomocí RP-HPLC (obr. 19, str. 38). Vrchol z 23,05 minuty na obrázku 19 byl identifikován jako žádaný produkt DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulin v množství 0,15 mg (měřeno spektrofotometricky), což představuje výtěžek asi 6,5% vztaženo na výchozí množství 2,1 mg DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulinu. Hmotnostní spektrum produktu, DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulinu, je zobrazeno na obrázku 20 (str. 38). Teoretická monoisotopická M_r je 6117,8333 a experimentálně zjištěná byla 6117,841. Chromatografická analýza výsledného produktu pomocí RP-HPLC je zobrazena na obrázku 21 (str. 39).

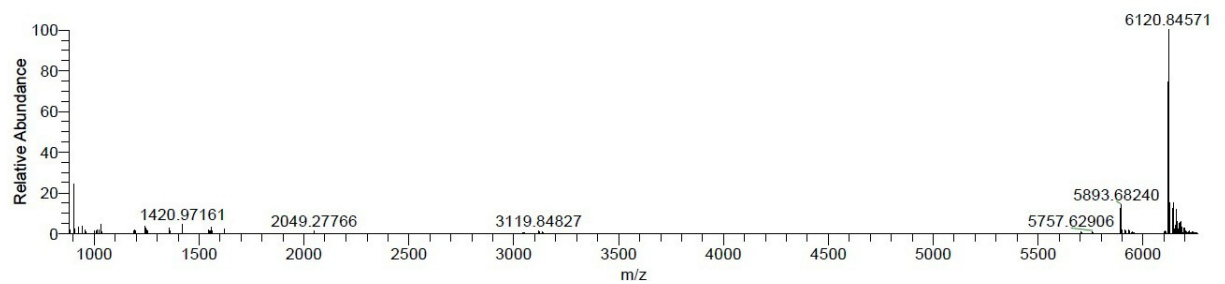
Mimo konečný produkt ve vrcholu v čase 23,05 byl ve vrcholu z 28,2 minuty identifikován DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulin stále obsahující jednu fenylacetylovou skupinu na jednom z lysinů. To znamená, že penicilinamidohydrolasa ani po 24 hodinách štěpí

reakci nedokončila. Hydrolýze produktu se ovšem přidáním kokteilu inhibitorů podařilo zabránit.

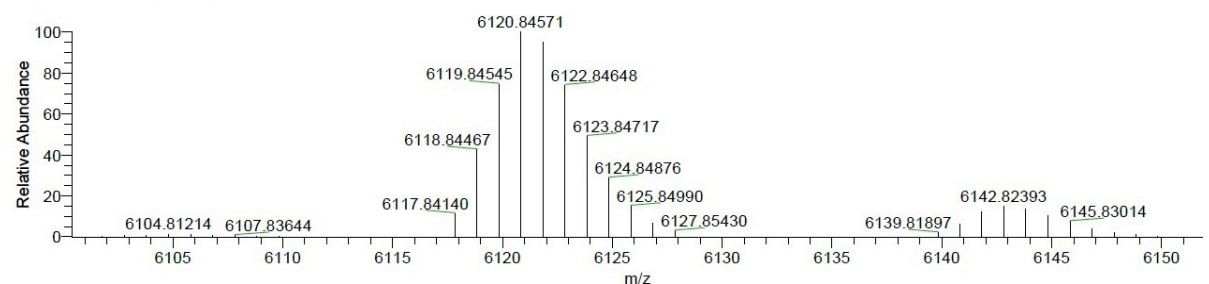


Obrázek 19. HPLC produktu po „deprotečním“ působení penicilinamidohydrolasy s přidavkem inhibitorů proteas na DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulin. Vrchol z 23,05 minuty obsahoval DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulin a vrchol z 28,2 minuty obsahoval tuto látku se stále navázaným jedním fenylacetylem na jednom z lysinů.

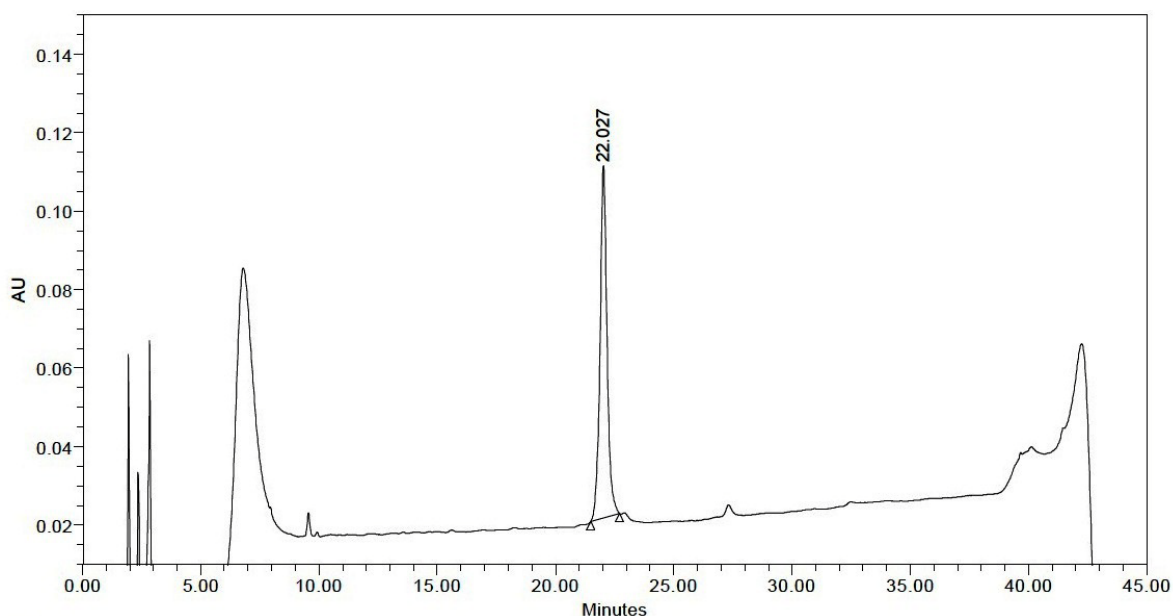
Jiracek,OD15-04-13-1_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 6.04E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Jiracek,OD15-04-13-1_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 6.04E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Obrázek 20. Hmotnostní spektrum DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulinu v pozitivním režimu měření.



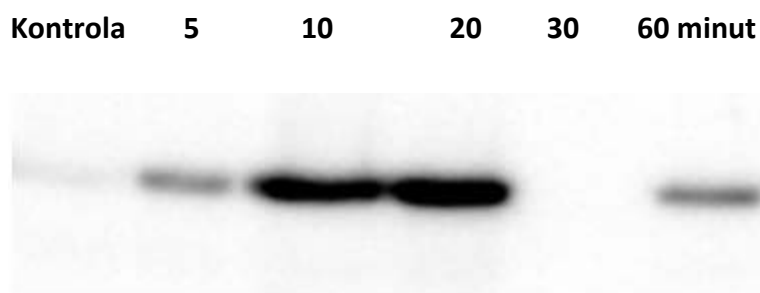
Obrázek 21. HPLC připraveného DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulinu.

5.5 Buněčná signalizace přes IGF-1R

V průběhu 3 dnů se buňky R⁺³⁹ rozmnožily z původního počtu 15 000 buněk na 380 000 ± 62 000 buněk na jamku. Toto množství buněk bylo postačující k detekci vybraných proteinů v buněčných lyzátech pomocí metody imunopřenosu. Aktivace fosfoinositol-3-kinasové dráhy byla úměrná fosforylaci proteinu Akt na Thr308 (tzn. detekce pAkt). Aktivace MAP kinasové dráhy byla úměrná fosforylaci proteinů Erk 1/2 na Thr202/Tyr204 u Erk1 a na Thr185/Tyr187 u Erk2 (tzn. detekce pErk1/2). Byly použity specifické protilátky detekující tyto proteiny jen v případě, že jsou fosforylovány. Dále byla použita protilátka detekující IGF-1R β podjednotku jako kontrola množství receptoru v jednotlivých buněčných lyzátech.

5.5.1 Závislost intenzity signálu na čase

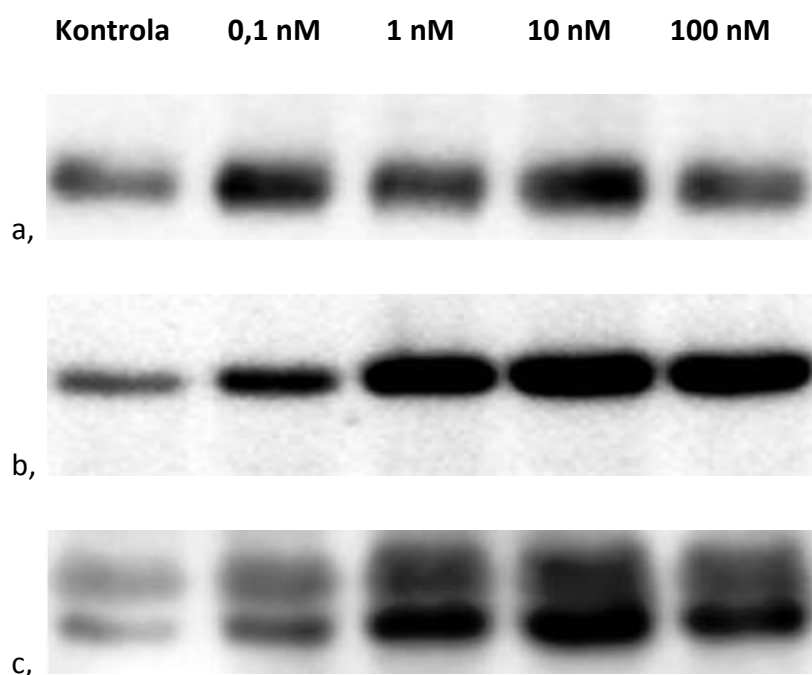
V prvním pokuse bylo zjišťováno, v kterém čase dochází k největší stimulaci (fosforylaci na Thr308) proteinu Akt. Byla použita 10 nM koncentrace ligandů. U všech ligandů signál dosahoval maxima po 20 minutách inkubace. Jako příklad uvádíme závislost intenzity signálu na čase při stimulaci pomocí IGF-2 (obr. 22, str. 40). U vzorků inkubovaných 30 minut byla z neznámých příčin lýze buněk neúspěšná.



Obrázek 22. Závislost intenzity signálu pAkt (Thr308) na čase po stimulaci 10 nM IGF-2.

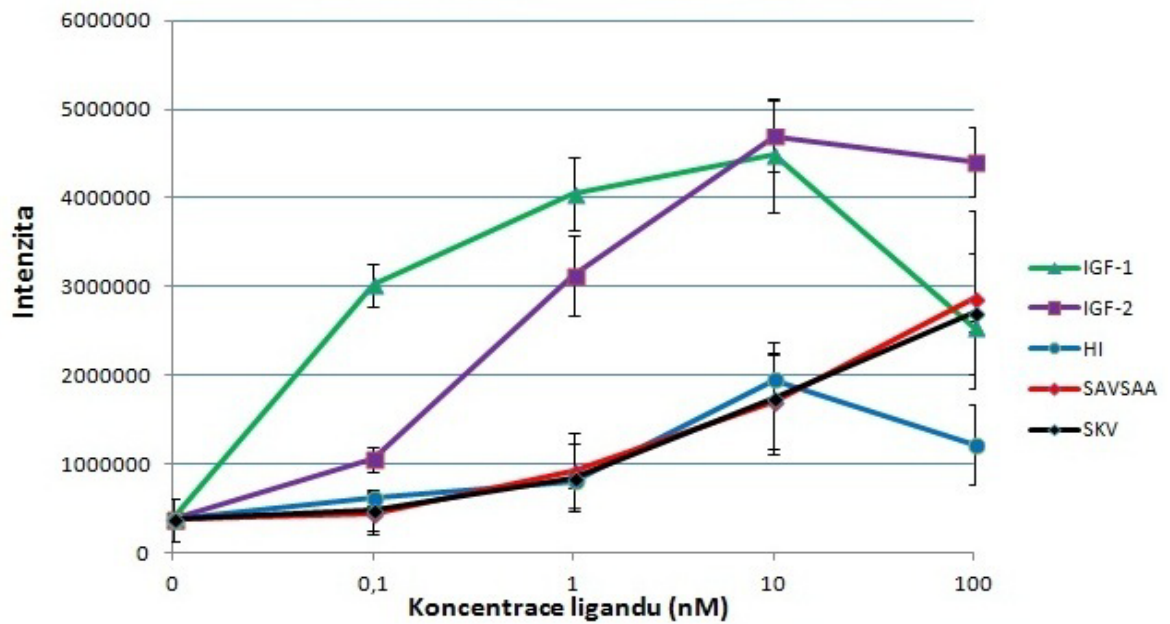
5.5.2 Závislost intenzity signálu na koncentraci ligandu

Koncentrační závislosti intenzity signálu pro jednotlivé ligandy byly měřeny v duplikátech v čase 20 minut. Jako příklad je uvedena stimulace pomocí IGF-2. Na obrázku 23 je zobrazena detekce celkového IGF-1R v jednotlivých lyzátech, pod ní jsou zobrazeny koncentrační závislosti intenzity po aktivaci proteinů Akt a Erk v identických buněčných lyzátech.

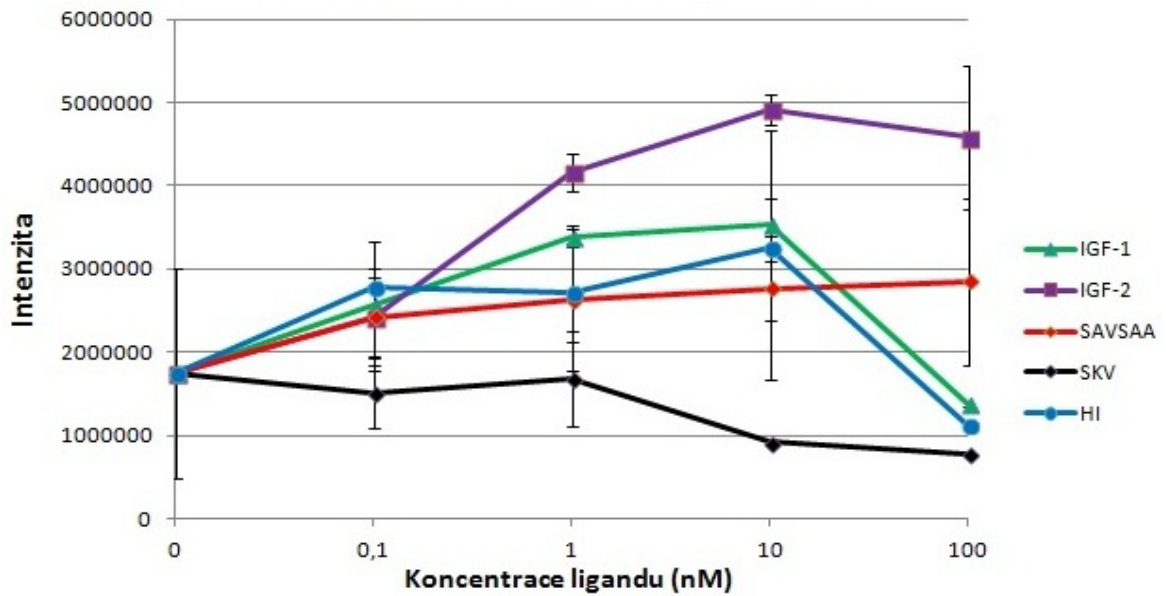


Obrázek 23. Intenzita signálu detekovaná CCD kamerou.
a, Obsah IGF-1R β v jednotlivých lyzátech,
b, Závislost intenzity signálu pAkt (Thr308) na koncentraci ligandu v čase inkubace 20 minut
c, Závislost intenzity signálu pErk1/2 na koncentraci ligandu v čase inkubace 20 minut.

Na následujících grafech jsou zobrazeny intenzity signálů fosforylace proteinu Akt (obr. 24) a proteinů Erk1/2 (obr. 25, str. 42) v závislosti na koncentraci lidského insulinu, IGF-1, IGF-2, analogů DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulinu a DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulinu.



Obrázek 24. Závislost intenzity signálu fosforylace proteinu Akt (pAkt) na koncentracích ligandů se znázorněnou směrodatnou odchylkou. HI značí lidský insulin, SAVSAA je DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulin a SKV je DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulin.



Obrázek 25. Závislost intenzity signálu fosforylace proteinů Erk1/2 (pErk1/2) na koncentracích ligandů se znázorněnou směrodatnou odchylkou. HI značí lidský insulin, SAVSAA je DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulin a SKV je DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulin.

IGF-1, na rozdíl od IGF-2, významně stimuloval fosforylaci proteinu Akt již v 0,1 nM koncentraci. Při 100 nM koncentraci signál z IGF-1 poklesl, pravděpodobně z důvodu nasycení signalizační kaskády. IGF-2 v koncentraci 10 nM stimuloval fosforylaci proteinu Akt srovnatelně s IGF-1. Signalizace obou analogů a insulinu byla výrazně nižší než u růstových faktorů, přičemž se signalizace obou analogů v podstatě nelišila od insulinu. Pouze v 100 nM koncentraci byla pozorována silnější odezva u analogů než u insulinu. Nebyla pozorována jednoznačná závislost fosforylace proteinů Erk1/2 na koncentraci přidaných ligandů s výjimkou IGF-2, který tyto proteiny aktivoval nejsilněji. Pozoruhodná byla výrazně snížená stimulace Erk DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulinem. Tyto výsledky budou ověřovány v dalších experimentech.

Diskuze

Cílem této bakalářské práce byla příprava a následná charakterizace biologických vlastností třech insulinových analogů prodloužených na C-konci B-řetězce insulinu o několik aminokyselin odvozených ze sekvence příbuzného lidského hormonu IGF-2. Porovnání vazebných vlastností těchto analogů, lidského insulinu, IGF-1 a IGF-2 vůči IGF-1R a zejména porovnání schopností těchto látek tento receptor aktivovat co se týče vyvolání buněčné odpovědi zprostředkované proteiny Akt či Erk, by mohlo pomoci částečně vysvětlit strukturní příčiny rozdílného působení těchto hormonů.

Syntéza DOI- G-F-F-Y-T-P-K-T-S-R-V-S-R-R-S insulinu

Prvním pokusem v rámci této práce byla příprava analogu insulinu prodlouženého o sekvenci S-R-V-S-R-R-S, jakožto přirozenou sekvenci z C-domény hormonu IGF-2 (aminokyseliny 33-40). Nejjednodušším způsobem jak tento analog připravit je enzymová semisyntéza, kdy se k DOI (připravenému z insulinu štěpením trypsinem při zásaditém pH) připojí peptid opět za působení trypsinem, ale při neutrálním pH a za přítomnosti organického rozpouštědla. Za těchto podmínek by měl katalyzovat tvorbu peptidové vazby mezi argininem na pozici B22 insulinu a aminokyselinou N-konce připraveného peptidu, v tomto případě G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S, kde aminokyseliny G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T odpovídají sekvenci B23-B30 insulinu. Lysin v pozici B29 je chráněný fenylacetylovou skupinou, která trypsinu zabraňuje v připojení peptidu k argininu na pozici B22 DOI přes N^ε-aminoskupinu lysinu. Peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S jako produkt automatické syntézy na pevné fázi a purifikace pomocí RP-HPLC byl získán s dobrým výtěžkem asi 59%. Peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S byl dále podroben semisyntetické reakci s DOI za katalýzy pomocí TPCK-trypsinu. Semisyntéza ovšem nebyla úspěšná, neboť TPCK-trypsin velmi rychle a efektivně hydrolyzoval peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S v pozicích za všemi třemi argininy v sekvenci a to i přes pH 7 reakční směsi a přítomnosti 55% DMF. Žádný semisyntetický produkt nebyl identifikován (obr. 11, str. 31) a katalytická rovnováha se evidentně posunula ve prospěch hydrolyzy. Tento negativní výsledek je pro nás cenným poučením, neboť je jasné, že trypsinem katalyzovaná semisyntéza není vhodná pro sekvence obsahující nechráněné argininy či

lysiny. Podobné analogy insulínu budou muset být v budoucnu připravovány metodou totální chemické syntézy a rekombinace řetězců insulínu (28), která je v laboratoři Dr. Jiráčka již několik let používána.

Syntéza DOI- G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulínu

Z důvodu neúspěchu semisyntézy s peptidem G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-V-S-R-R-S byl manuální syntézou na pevné fázi připraven peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A, kde původní argininy v sekvenci byly zaměněny za alaniny. Záměna argininů za alaniny by jednak měla zamezit hydrolyze při semisyntéze a zároveň by mohla poskytnout informaci o funkční roli argininů 34, 37 a 38 v C doméně IGF-2. K tomuto postupu nás mimo jiné vedla úvaha, že mutace těchto argininů by mohla ovlivnit negativně afinitu výsledného analogu insulínu vůči IGF-1R, přičemž afinita tohoto analogu k insulínovému receptoru by zůstala stejná jako u lidského insulínu. Tyto hypotézy byly formulovány na základě poznatků o významnosti ekvivalentních argininů 36 a 37 C-domény IGF-1 pro vazbu na jeho vlastní receptor IGF-1R (3) a využitím faktu o velké vzájemné strukturní podobnosti IGF-1 a IGF-2. Studie o úloze argininů 34, 37 a 38 v IGF-2 ještě publikovány nebyly. Interakce IGF-1 s receptorem IGF-1R jsou obecně mnohem více studovány než interakce receptoru s IGF-2.

Záměna argininů za alaniny s hydrofobními postranními řetězci však způsobila nízkou rozpustnost peptidu G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A, což způsobilo problémy při purifikaci pomocí RP-HPLC a peptid byl získán jen s malým výtěžkem asi 20%. Semisyntéza dle klasické Metody A byla neúspěšná z důvodu nerozpustnosti peptidu v semisyntetické směsi. V reakční směsi dle Metody B již byl peptid lépe rozpustný, nicméně i tak reakce poskytla velmi nízký výtěžek a produkt DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-A-V-S-A-A insulín byl navíc ve směsi s jinými peptidy (obr. 12, str. 33). Pokusy o izolaci produktu pomocí analytické RP-HPLC byly neúspěšné. Úspěšnou strategií se ukázala být aplikace penicilinamidohydrolasy na tuto komplexní frakci, kdy došlo i odštěpení fenylacetylové skupiny pouze z produktu a ostatní příměsi zůstaly nedotčeny neboť fenylacetyl s největší pravděpodobností neobsahovaly (obr. 14, str. 34). Výtěžek čistého analogu byl pouze 8 µg (0,1%), jak bylo zjištěno určením koncentrace v roztoku spektrofotometricky při 280 nm.

Toto množství ovšem stačilo k přípravě 100 μ l roztoku o koncentraci $1,32 \cdot 10^{-5}$ M, postačující jak pro stimulaci buněk, tak pro RP-HPLC analýzu a MS analýzu.

Syntéza DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulinu

Nakonec byl připraven analog s připojenou sekvencí aminokyselin S-K-V, kde arginin byl nahrazen ne alaninem, nýbrž lysinem, a to na základě předpokladu, že sekvence S-K-V bude „mimikovat“ sekvenci S-R-V odvozenou z C-domény (33-36) lidského IGF-2. Nevhodnost argininů pro semisyntézu byla prokázána v případě prvního z peptidů v této studii. Dostupné chránící skupiny postranního řetězce argininu neumožňují jejich odštěpení za mírných podmínek, které by nepoškodilo molekulu insulinu. Na druhou stranu, fenylacetylová chránící skupina N^ε-aminoskupiny lysinu chrání peptid před enzymovým hydrolytickým účinkem trypsinu v průběhu semisyntézy a zároveň je jí možné odštěpit za mírných podmínek opět enzymově penicilinamidohydrolasou. Minimalistická sekvence tří C-koncových aminokyselin S-K-V byla u tohoto analogu zvolena z důvodu zamezení zvyšování hydrofobicity díky přítomnosti dalších fenylacetylů na následujících lysinech v sekvenci.

Automatická syntéza a purifikace peptidu G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V pomocí RP-HPLC poskytla nižší výtěžek ve výši asi 20%, který byl opět způsobený značnou hydrofobností sekvence. Semisyntéza dle Metody B s výtěžkem asi 17% (3,4 mg) byla ovšem úspěšnější než v případě předchozího peptidu.

Odchránění fenylacetylů DOI-G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V insulinu ovšem opět přineslo značná úskalí. První pokusy o „deprotekcii“ evidentně vedly k odstranění fenylacetylů, ale rovněž i k štěpení výsledného analogu za oběma lysiny a i za argininem v pozici B22 (kapitola 5.4). Domníváme se, že za tuto degradaci nebyla zodpovědná penicilinamidohydrolasa samotná, ale proteolytické enzymy přítomné v komerčním preparátu purifikovaném z bakteriální kultury. Podobná kontaminace enzymu byla pozorována již dříve (29). Přidání směsi inhibitorů do „deprotekční“ reakce efektivně zabránilo degradaci DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulinu, který byl získán v množství 0,15 mg což je výtěžek asi 6,5%. Nízký výtěžek byl ovlivněn i nedokončenou „deprotekcí“, kdy i po 24 h reakce byl stále přítomen analog s jedním fenylacetylem na jednom z lysinů (obr. 20, str. 38).

Aktivace receptoru IGF-1R

Pro biochemickou a biologickou charakterizaci připravených analogů DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulínu a DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulínu bude nutné definovat jejich vazebné afinity vůči oběma isoformám receptoru insulínu (IR-A a IR-B) i vůči IGF-1R a rovněž i schopnost analogů aktivovat specifické signální dráhy (zejména Akt/PI3K a Erk/MAPK) po vazbě na tyto receptory. Z důvodu limitovaného času věnovaného této bakalářské práci byly svoleny jen některé z těchto experimentů. Bylo rozhodnuto studovat schopnosti analogů indukovat aktivaci (fosforylaci) vnitrobuněčných proteinů Akt a Erk, které jsou charakteristické pro tyto dvě signální dráhy. V případě receptoru IGF-1R nemůžeme mluvit o oddělené metabolické funkci aktivace Akt či mitogenní funkci Erk jako je tomu v případě isoform IR. Zde platí, že oba proteiny, Akt a Erk, jsou zapojeny do mitogenních (antiapoptotických, proliferačních a diferenciacních) efektů IGF-1R.

Z výsledků uvedených v obrázku 24 (str. 41) vyplývá, že schopnost obou analogů aktivovat protein Akt se neliší od schopnosti insulínu s výjimkou nejvyšší koncentrace (100 nM), přičemž tato schopnost je výrazně menší než u IGF-1 a -2. Interpretace výsledků aktivace proteinu Erk (obrázek 25, str. 42) je složitější. Zde s výjimkou IGF-2 nebyla pozorována jednoznačná závislost intenzity signálu na koncentraci hormonů, přičemž efekty IGF-1, insulínu a DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulínu se prakticky nelišily, zatímco DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulín protein Erk prakticky neaktivoval. Tyto výsledky, i když byly dosaženy pouze v rámci jednoho pokusu (v duplikátech), naznačují, že cesta pro změnění schopnosti insulínu aktivovat IGF-1R by skutečně mohla vést přes prodloužení C-konce řetězce B insulínu o aminokyseliny odvozené od C domény IGF-2. V další fázi výzkumu, který již překračuje rámec této bakalářské práce, budou definovány vazebné afinity analogů vůči všem příslušným receptorům a zároveň i schopnosti aktivovat proteiny Akt a Erk v příslušných buněčných liniích se selektivním zastoupením pouze jednoho z receptorů (IR-A, IR-B či IGF-1R).

Souhrn

V předkládané bakalářské práci byly připraveny analogy insulínu s účelem zjistit, jak prodloužení sekvence insulínu na C-konci jeho B-řetězce ovlivní funkční vlastnosti této molekuly. Semisyntéza analogů se ukázala jako mnohem komplikovanější než se původně předpokládalo. Důvodem byla jednak přítomnost nechráněných argininů v sekvenci, které způsobily štěpení trypsinem i za podmínek semisyntetické reakce (nízké pH a přítomnost organického rozpouštědla). Další komplikací byla velmi nízká rozpustnost některých peptidů v prostředí semisyntetické reakce což negativně ovlivnilo výtěžky. V poslední řadě byly zaznamenány problémy při štěpení chránících fenylacetylových skupin posledního z analogů, DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulínu, proteolytickými enzymy přítomnými jako nečistoty v komerčním preparátu penicilinamidohydrolasy. Přesto, že dva analogy byly nakonec úspěšně připraveny, budeme v budoucnu spíše uvažovat o přípravě podobných analogů metodou totální chemické syntézy samostatných řetězců a jejich chemické rekombinace. V další části práce byly porovnány schopnosti analogů DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulínu a DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulínu aktivovat signální dráhy nastupující po vazbě ligandu na receptor, v našem případě receptoru IGF-1R. Signál zprostředkovaný touto vazbou vedoucí dále do nitra buňky byl zaznamenáván jako fosforylace proteinů Akt a Erk. Vazbou ligandů na IGF-1R se aktivují dva proteiny, Akt i Erk, které se účastní vyvolání mitogenních efektů. Podle výsledků experimentů provedených v rámci této práce usuzujeme, že schopnost námi připravených analogů aktivovat dráhu vedenou přes protein Akt je velmi podobná insulínu, protože v porovnání s IGF-1 a IGF-2 byla tato schopnost analogů zřetelně nižší. Schopnost ligandů aktivovat protein Erk se u insulínu, IGF-1 a analogu DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-A-V-S-A-A insulínu projevila jako velmi podobná, analog DOI-G-F-F-Y-T-P-K-T-S-K-V insulínu tento protein signální dráhy významně neaktivoval. Tato práce přinesla první cenné poznatky o úloze C-domény IGF-2 v aktivaci IGF-1R. V budoucnu bude nicméně potřebné realizovat vazebné a funkční experimenty zkoumající vlastnosti popsaných a i dalších analogů při vazbě na ostatní typy příbuzných receptorů, IR-A a IR-B.

Seznam použité literatury

1. Jones, J. H.: *J. Peptide Sci.* 5, 465-471 (1999)
2. Chan, S. J., Steiner, D. F.: *Am. Zool.* 40, 213-222 (2000)
3. Denley, A., Cosgrove, L. J., Booker, G. W., Wallace, J. C., Forbes, B. E.: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, 421-439 (2005)
4. Rinderknecht, E., Humbel, R. E.: *J. Biol. Chem.* 8 (1978)
5. Žáková, L., Jiráček, J.: *Chem. Listy* 99, 772-781 (2005)
6. White, M. F., Kahn, C. R.: *J. Biol. Chem.* 269, 1-4 (1994)
7. 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, 2503-2512 (1986)
8. Adams, T. E., Epa, V. C., Garret, T. P., Ward, C. W.: *Cell Mol. Life Sci.* 57(7), 1050-1093 (2000)
9. Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., Vigneri, R.: *Endocr. Rev.* 30(6), 586-623 (2009)
10. Ward, C. W. and Lawrence, M.C.: *Front. Endocrin.* 2, 76 (2011)
11. De Meyts, P.: *Endocrinology* 153, 2054-2056 (2012)
12. Sciacca, L., Le Moli, R., Vigneri, R.: *Front. Endocrin.* 3(21), 1-9 (2012)
13. Frystyk, J.: *Growth Horm. IGF Res.* 14, 337-375 (2004)
14. White, M. F.: *Diabetologia* 40, 2-17 (1997)
15. Siddle, K.: *Front. Endocrin.* 3, 34 (2012)
16. Sciacca, L., Cassarino, M. F., Genua, M., Pandini, G., Le Moli, R., Squatrito, S., Vigneri, R.: *Diabetologia* 53, 1743-1753 (2010)

17. **Staiger, K., Hennige, A. M., Staiger, H., Haring, H. U., Kellerer, M.:** *Horm. Metab. Res.* 39, 65-67 (2007)
18. **Hemkens, L. G., Grouven, U., Bender, R., Günster, C., Gutschmidt, S., Selke, G. W., Sawicki, P. T.:** *Diabetologia* 52, 1732-1744 (2009)
19. **Kurtzhals, P., Schäffer, L., Sørensen, A., Kristensen, C., Jonassen, I., Schmid, C., Trüb, T.:** *Diabetes* 49(6), 999-1005 (2000)
20. **www.cellsignal.com.** [Online] [Citace: 27. 4. 2013.]
<http://www.cellsignal.com/pathways/glucose-metabolism.jsp>.
21. **Menting, J.G., Whittaker, J., Margetts, M.B., Whittaker, L.J., Kong, G.K.-W., Smith, B.J., Watson, C.J., Žáková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S.J., Steiner, D.F., Dodson, G.G., Brzozowski, A.M., Weiss, M.A., Ward, C.W. & Lawrence, M.C.:** *Nature* 493, 241-245 (2013)
22. **Žáková, L., Zyka, D., Ježek, J., Hančlová, I., Šanda, M., Brzozowski, A. M., Jiráček, J.:** *J.Peptide Sci.* 13, 334-341 (2007)
23. **Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P.I.:** *Anal. Biochem.* 34, 595-598 (1970)
24. **Fields, G. B., Noble, R. L.:** *Int. J. Peptide Protein Res.* 35, 161-214 (1990)
25. **Svoboda, I.:** *Chem. Listy* 85, 1105-1118 (1991)
26. **Svoboda, I., Brandenburg, D., Barth, T., Gattner, H. G., Jiracek, J., Velek, J., Blaha, I., Ubik, K., Kasicka, V., Pospisek, J.:** *Biol.Chem. Hoppe –Seyler* 373-378 (1994)
27. **Nakagawa, S. H., Tager, H. S.:** *Biochemistry* 31, 3204-3214 (1992)
28. **Chance, R. E., Hoffman, J. A., Kroeff, E. P., Johnson, M. G., Schirmer, E. W., Bromer, W. W.:** *Proceedings of the 7th American Peptide Symposium* 721-728 (1981)
29. **Jiráček, J., Barth, T., Velek, J., Bláha, I., Pospíšil, J., Svoboda, I.:** *Collect. Czech. Chem. Commun.* 57, 2187-2191 (1992)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka