

ABSTRAKT

Insulin a insulinu podobné růstové faktory 1 (IGF-1) a 2 (IGF-2) jsou příbuzné proteinové hormony s rozdílnými, avšak překrývajícími se biologickými funkcemi. Všechny tři hormony interagují, i když s různou afinitou, s receptory, patřícími do systému insulinu-IGF (insulinové receptory A a B (IR-A, B), IGF-1 receptor (IGF-1R)). Právě rozdílná schopnost interakce s jednotlivými receptory je jeden z hlavních nástrojů regulace tohoto systému, který je nezbytný pro správné fungování organismu.

Ačkoli aminokyseliny, které se přímo účastní interakce s receptory, se nacházejí zejména v doménách A a B, domény C a D mají patrně určitou úlohu ve vazebné specificitě. V rámci tohoto projektu jsme se nejprve zaměřili na vliv domén D z molekul IGF-1 a 2 (D_1 a D_2) a domény C z IGF-2 (C_2). Abychom mohli sledovat vliv domén C a D, připravili jsme insulinové analogy s celými nebo částmi jednotlivých domén tak, aby uspořádání odpovídalo přirozené pozici v molekule IGF. U takto připravených analogů byly studovány vazebné afinity a jejich schopnost aktivovat receptor.

Výsledky odhalily, že úvodní část domény D_1 má ničivý účinek na afinitu k IR. Tento účinek je pouze mírně zvýrazněn přítomností zbytku domény (D_1). Doména D_2 nemá téměř žádný účinek na afinitu k IR. Dále bylo zjištěno, že přidání aminokyselin odvozených z domény C_2 na C-konec řetězce B vede ke zvýšení afinity a schopnosti aktivovat IR-B. Toto nečekané zjištění otevírá nové možnosti zvýšení specificity vůči isoformě B IR.

Abychom byli schopni připravovat nové analogy IGF-2, vyvinuli jsme jednoduchou metodu přípravy IGF-2. První soubor analogů IGF-2 obsahoval unikátní mutace v rámci domén B a C, které byly odvozeny z IGF-1 (tj. Asn29, Gly30-Ser31 a Pro35-Gln36). Takto změněné analogy vykazovaly významně sníženou afinitu k IR-A, přičemž nejvýznamnější snížení bylo pozorováno u analogů s vloženou sekvencí Pro-Gln v doméně C. U těchto analogů byl pomocí NMR charakterizace potvrzen posun C-smyčky společně s jejím „otevřenějším“ prostorovým uspořádáním. Kombinace insertu Pro-Gln a mutace Ser29Asn vedla k téměř 2násobnému zvýšení afinity k IGF-1R. U analogu Asn29,Ser29(Pro-Gln)-IGF-2 byla rovněž díky snížené afinitě k IR-A a současně zvýšené afinitě k IGF-1R pozorována téměř 10násobně vyšší IGF-1R/IR-A vazebná specificita v porovnání s přirozeným IGF-2.

Druhý soubor analogů byl inspirován HisA4HisA8 insulinem, který je známý pro svou disporporci ve vazebné afinitě a schopnosti aktivace IR. Systematicky jsme upravovali pozice

44, 45 a 48 v molekule IGF2, které odpovídají pozicím A4 a A8 v molekule insulinu či jsou v jejich blízkém kontaktu. U těchto analogů byla měřena vazebná afinita k IR-A a IGF-1R a schopnost jejich autofosforylace. Z původně zamýšlených analogů se podařilo připravit pouze Gln45-IGF-2, Gln45, His48-IGF-2, a His48-IGF-2. Vytvořené analogy si zachovaly původní schopnost vázat a aktivovat IGF-1R, avšak substituce His48 vedla k významně vysokým afinitám k obou isoformám IR. IGF-2 analogy obsahující His48 váží IR s doposud nejvyšší známou afinitou. U žádného z analogů nebyl pozorován výrazný nesoulad mezi vazebnou afinitou k IR-A a IGF-1R a schopností jejich aktivace. Disproporce mezi schopností vázat a aktivovat receptor je patrně omezená na interakci insulin-IR.

Nedávná CryoEM strukturní analýza vazby insulinu na IR-A odhalila detaily interakce v oblastech vazebných míst 1 a 2. Publikované výsledky ale nejsou zcela v souladu s výsledky substitučních studií, jelikož interakce v oblasti vazebného místa 2 nezahrnuje všechny doposud předpokládané aminokyseliny. Z toho důvodu jsme se v poslední fázi našeho výzkumného projektu zaměřili na „opomenuté“ aminokyseliny spadající do vazebné oblasti 2 (50, 52, 53, 57). Aminokyselina na těchto pozicích jsme zaměňovali za His a za aminokyselinu s podobnými vlastnostmi. Na základě výsledků studie je patrné, že pozice 50, 53 a 57 jsou relativně tolerantní k zavedení změnám. Zjištěné výsledky nepodávají jednoznačnou evidenci o roli pozic 50, 52, 53 a 57 v interakci v oblasti vazebného místa 2. Avšak výsledky studie metadynamiky odpovídajících mutací v molekule insulinu naznačují, že uvedené substituce mohou ovlivňovat vnitřní dynamiku molekuly a inhibovat schopnost zaujmout vazebné uspořádání, což je důležité zejména pro interakce v oblasti vazebného místa 1.