

Abstrakt

Inzulín a homologický inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) jsou peptidové hormony, které jsou významnými regulátory buněčného metabolismu, proliferace a apoptózy. Poruchy v signalizačních drahách těchto hormonů s sebou nesou řadu závažných onemocnění od diabetu mellitu typu 1 a 2 po rakovinné bujení či neurodegenerativní onemocnění.

Buněčnou odpověď na tyto hormony zprostředkovávají inzulínové (IR) a IGF-1 receptory (IGF-1R) s tyrozinkinázovou aktivitou. Receptory tvoří heterotetramery dvou extracelulárních α podjednotek a intracelulárních β podjednotek. Studium struktur receptorů se snaží ozřejmit základní princip interakce receptorů s jejich ligandy, avšak stále zůstává role některých aminokyselinových zbytků ve vazbě hormonů neobjasněna. Předpokládá se, že arginin 704 IGF-1R by se mohl účastnit interakce s glutaminem 58 IGF-1. Na rozdíl od IGF-1R nebyl ekvivalentní arginin 717 IR v předchozích studiích pokládán za důležitý pro vazbu inzulínu.

Tato práce se zabývá objasněním role argininu 704 IGF-1R, a pro porovnání analogicky argininu 717 IR izoformy A (IR-A), ve vazbě ligandů na receptor. Byly vytvořeny mutantní varianty IGF-1R na pozicích His697 a Arg704 a varianty IR-A na pozicích His710 a Arg717. Role histidinů 697 IGF-1R a 710 IR již byla dříve objasněna, proto jejich aminokyselinová záměna sloužila jako kontrola. Vazebné a aktivační vlastnosti všech celkových mutantních receptorů či jejich izolovaných ektodomén byly určeny pomocí saturačních vazebných zkoušek a stimulačních zkoušek. Bylo prokázáno, že mutace His697 i Arg704 IGF-1R způsobují snížení afinity k IGF-1, a potvrzuje tak zapojení obou aminokyselinových zbytků ve vazbě IGF-1. Zároveň byla ukázána přítomnost dvou vazebných míst na IGF-1R, protože mutantní varianta His697A IGF-1R způsobila snížení vazby na polovinu. Zajímavějším výsledkem je, že mutace His710 i Arg717 IR-A vede k inaktivaci receptoru a kompletnímu narušení vazby inzulínu. To dokládá důležitost Arg717 ve vazbě inzulínu.

Klíčová slova: inzulín, IGF-1, inzulínový receptor, IGF-1 receptor, místně specifická mutagenese, saturační vazebná zkouška, komplex ligand-receptor