

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie
Studijní obor: Molekulární biologie a genetika eukaryot



Bc. Anna Kertisová

Role Argininu 717 v inzulínovém receptoru, respektive Argininu 704
v IGF-1 receptoru při vazbě ligandů

Role of Arginine 717 in insulin receptor respective Arginine 704 in
IGF-1 receptor for the interaction with ligands

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Irena Selicharová, Dr.

Praha, 2023

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

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své vedoucí diplomové práce paní doktorce Ireně Selicharové za poskytnuté cenné rady a přátelské jednání. Děkuji celé laboratoři Chemie a biologie inzulínu a inzulínu podobných růstových faktorů pana doktora Jiřího Jiráčka za profesionální a přátelské prostředí. Dále děkuji rodině za podporu a trpělivost během celého studia, příteli za podporu a pomoc s formálními náležitostmi diplomové práce.

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

Abstract

Insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) are peptide hormones that are important regulators of cellular metabolism, proliferation and apoptosis. Disruptions in signalling pathways may cause a whole range of diseases from diabetes mellitus type 1 and type 2 to cancer or neurodegenerative diseases.

The cellular response to these hormones is mediated by insulin (IR) and IGF-1 receptors (IGF-1R) with a tyrosin-kinase activity. Receptors are created as hetero-tetramers of two extracellular α -subunits and two intracellular β -subunits. Studies of receptor structures try to elucidate the basic principles of the interaction of receptors with their ligands. However, the role of some amino-acid residues in binding remains unclear. It was suggested that the arginine 704 of IGF-1R may interact with Glu58 IGF-1. In comparison with IGF-1R, the equivalent arginine 717 IR was not associated with an important role in insulin binding in previous studies.

This thesis is focused on clarifying the role of Arg704 IGF-1R and for comparison analogically on Arg717 IR isoform A (IR-A) in ligand binding to the receptors. Therefore, mutant variants of IGF-1R in positions His697 and Arg704 and variants IR-A in positions His710 and Arg717 were created. The role of histidines 697 IGF-1R and 710 IR was already elucidated so the mutants served as a control. The binding and activating properties of all full-length mutant receptors or their purified ectodomains were determined by saturation binding assays and stimulation assays. It was shown that mutations of His697 and Arg704 cause a decrease in a binding affinity to IGF-1. Thus, it documents the importance of these residues in the IGF-1 binding. Furthermore, we have shown the presence of two binding sites in IGF-1R. The mutation of His697 caused a reduction of the maximal binding to one half. The more surprising result was that both mutations of His710 and Arg717 lead to inactivation and complete disruption of the binding of insulin. It demonstrates the critical role of Arg717 IR-A in insulin binding.

Keywords: insulin, IGF-1, insulin receptor, IGF-1 receptor, site-directed mutagenesis, saturation binding assay, complex ligand-receptor

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	3
3	Přehled literatury.....	5
3.1	Rodina inzulínu podobných peptidů	5
3.2	Inzulín.....	5
3.2.1	Struktura inzulínu	6
3.2.2	Biosyntéza inzulínu	7
3.2.3	Fyziologická funkce inzulínu a patologie.....	8
3.3	Inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1).....	10
3.3.1	Struktura IGF-1	11
3.3.2	Biosyntéza IGF-1.....	12
3.3.3	Fyziologická funkce IGF-1 a patologie.....	13
3.4	Inzulinový receptor	14
3.4.1	Biosyntéza a struktura IR.....	15
3.4.2	Vazba inzulínu na IR a jeho aktivace.....	18
3.4.3	Signalizace IR	21
3.5	IGF-1 receptor	23
3.5.1	Biosyntéza a struktura IGF-1R.....	23
3.5.2	Vazba IGF-1 na IGF-1R a jeho aktivace	24
3.5.3	Signalizace IGF-1R.....	26
3.6	Hybridní molekuly IR/IGF-1R.....	27
4	Materiál	29
4.1	Chemický materiál	29
4.2	Ligandy.....	30
4.3	Roztoky a pufry.....	31
4.3.1	Připravované roztoky a pufry	31
4.3.2	Komerční roztoky a pufry	32

4.4	Enzymy	32
4.5	Antibiotika	33
4.6	Protilátky	33
4.7	Komerční kity	34
4.8	Plazmidy	35
4.9	Primery	35
4.9.1	Mutageneze	35
4.9.2	Klonování	36
4.9.3	Sekvenování	36
4.10	Hmotnostní markery	37
4.11	Živná a kultivační média	37
4.12	Bakteriální kmeny	37
4.13	Buněčné kultury	38
5	Metody	39
5.1	Práce s DNA	39
5.1.1	Místně specifická mutageneze pomocí PCR reakce	39
5.1.2	Příprava plazmidových konstruktů receptorových ektodomén	40
5.1.3	Agarózová DNA elektroforéza	43
5.1.4	Transformace bakterií pomocí teplotního šoku	43
5.1.5	Izolace plazmidové DNA z bakterií a stanovení koncentrace DNA	44
5.1.6	Sekvenace	45
5.2	Práce s buněčnými kulturami	45
5.2.1	R- buňky – kultivace a pasážování	45
5.2.2	Tranzientní transfekce R- buněk	46
5.2.3	Hek293-6E buňky – kultivace a pasážování	47
5.2.4	Tranzientní transfekce Hek293-6E buněk	47
5.3	Práce s proteiny	48
5.3.1	Denaturační proteinová elektroforéza – SDS-PAGE	48
5.3.2	Imunochemická detekce proteinů pomocí metody Western Blot	49
5.3.3	Purifikace proteinů pomocí afinitní chromatografie	50

5.3.4	Dialýza	51
5.3.5	Stanovení koncentrace fúzních proteinů pomocí fluorescence	52
5.4	Saturační vazebné zkoušky	52
5.4.1	Saturační vazebná zkouška s celkovými receptory v R ⁻ buňkách	52
5.4.2	Saturační vazebná zkouška s receptorovými ektodomény	55
5.5	Stimulační zkoušky	56
6	Výsledky	59
6.1	Příprava mutantních variant expresních vektorů kódujících celkové IGF-1R a IR-A	60
6.2	Příprava expresních vektorů kódujících ektodomény IGF-1R a IR-A	62
6.3	Produkce celkových receptorů v buněčné linii R ⁻	69
6.4	Produkce receptorových ektodomén v buněčné linii Hek293-6E	72
6.5	Vazebné a aktivační vlastnosti IGF-1R a IR-A a jejich ektodomén	77
6.5.1	Varianty IGF-1R	78
6.5.2	Varianty IR-A	84
7	Diskuse	93
7.1	Vlastnosti mutantních variant IGF-1R	93
7.2	Vlastnosti mutantních variant IR-A	96
8	Závěr	101
9	Seznam literatury	103
10	Přílohy	125

Seznam zkratek

AV ČR	Akademie věd České republiky
BAD	Bcl-2 associated agonist of cell death (Bcl-2 asociovaný agonista buněčné smrti)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein (B-buněčný lymfom protein 2)
Bcl-X _L	B-cell lymphoma-extra large (B-buněčný lymfom protein X _L)
BMI	body mass index (index tělesné hmotnosti)
bp	base pair (páry bází)
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA)
C-konec	karboxylový konec proteinu
<i>cpm</i>	counts per minute (impulzy za minutu)
CR	Cystein-rich domain (doména bohatá na cysteiny)
Cryo-EM	cryogenic electron microscopy (kryoelektronová mikroskopie)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dNTPs	deoxyribonucleosid triphosphates (nukleosidtrifosfáty)
ERO1-β	endoplasmatic reticulum oxidoreductin 1-β (oxidoreduktin 1-β endoplasmatického retikula)
FnIII1-3	Fibronectin type III domain 1-3
GLUT4	glucose transporter type 4 (glukózový transportér typu 4)
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	glycogen synthase kinase-3 (glykogen syntáza kináza-3)
His-tag	polyhistidine tag (polyhistidinová značka)
IGF-1	insulin-like grow factor 1 (inzulinu podobný růstový faktor 1)
IGF-1R	receptor pro IGF-1
IGF-2	insulin-like grow factor 2 (inzulinu podobný růstový faktor 2)
IGFBP	IGF binding protein (IGF vazebný protein)
IR	inzulinový receptor
IR-A	inzulinový receptor izoforma A
IR-B	inzulinový receptor izoforma B
IRS	insulin receptor substrate (substrát inzulinového receptoru)
JM	juxtamembrane domain (juxtamembránová doména)
L1	Leucin-rich domain 1 (doména bohatá na leuciny 1)

L2	Leucin-rich domain 2 (doména bohatá na leuciny 2)
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogenem aktivovaná proteinkináza)
mRNA	messenger RNA (mediátorová RNA)
mTOR	mammalian target of rapamycin
N-konec	aminový konec proteinu
NSB	non-specific binding (nespecifická vazba)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (3-fosfoinositid-dependentní protein kináza 1)
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase (fosfatidylinositol-3-kináza)
PIP ₃	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát)
rcf	relative centrifugal force (relativní centrifugační síla)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
SH2	Src-homology 2 domain (doména Src-homology 2)
Shc	Src-homology-2-containing protein (protein obsahující doménu Src-homology 2)
TK	tyrosin-kinase domain (tyrozinkinázová doména)
TM	transmembrane domain (transmembránová doména)
ÚOCHB AV ČR	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky
WT	wildtype (divoký typ)
αCT	C-terminal domain of α subunit (C-terminální doména α podjednotky)
βCT	C-terminal domain of β subunit (C-terminální doména β podjednotky)

1 Úvod

Inzulín a inzulínu podobný faktor 1 (IGF-1) jsou důležitými peptidovými hormony, které jsou strukturně homologické. Inzulín, produkovaný v β -buňkách Langerhansových ostrůvků, je významným regulátorem glukózového metabolismu. Poruchy v drahách vedoucích k jeho produkci či signalizaci mohou vést k závažným onemocněním jako jsou diabetes mellitus typu 1 či typu 2, rakovina a neurodegenerativní choroby. Diabetes mellitus typu 2 je onemocněním, kterým trpí přibližně 10 % světové populace a právem se tak řadí mezi civilizační choroby. IGF-1 je regulátorem růstu, buněčné proliferace a apoptózy. Poruchy v IGF-1 systému s sebou nesou fatální patologie od růstové a mentální retardace po rakovinná a neurodegenerativní onemocnění.

Oba tyto hormony interagují s buňkou svými receptory. Inzulínový receptor (IR) a IGF-1 receptor (IGF-1R) jsou strukturně i funkčně homologické stejně jako jejich ligandy. Jedná se o tyrozin-kinázové receptory, které jsou tvořeny heterotetramery dvou α a dvou β podjednotek. Již od objevu těchto receptorů je snaha popsat jejich interakci s přirozenými ligandy, což je velice žádoucí pro vývoj léčiv na principu analogů inzulínu či IGF-1. V posledních letech byl učiněn velký posun v oblasti zkoumání trojrozměrných struktur IR a IGF-1R především díky metodám jako je kryoelektronová mikroskopie. Přesto však některé aspekty vazby inzulínu a IGF-1 na jejich receptory a mechanismu aktivace receptorů zůstávají nejasné.

Předchozí práce v laboratoři Chemie a biologie inzulínu a inzulínu podobných růstových faktorů (ÚOCHB AV ČR) se zabývala studiem analogů inzulínu a IGF-1. Bylo navrženo, že glutamin 58 IGF-1 by mohl interagovat s argininem 704 IGF-1R, který zatím nebyl ve vazbě k IGF-1 zkoumán. Tato práce se tedy zaměřuje na určení role argininu 704 IGF-1R a ekvivalentního argininu 717 IR izoformy A (IR-A) ve vazbě ligandů IGF-1 a inzulínu. Pro tento účel byly zhotoveny mutantní varianty IGF-1 i IR-A a byly zkoumány jejich vazebné vlastnosti v porovnání s přirozenými receptory. Rozluštění úlohy argininů 704 IGF-1R a 717 IR-A by mohlo vést k rozšíření poznatků o interakci inzulínu a IGF-1 s jejich receptory.

2 Cíle práce

Hlavním cílem této práce je objasnění úlohy argininu 717 inzulinového receptoru izoformy A (IR-A) respektive argininu 704 IGF-1 receptoru (IGF-1R).

Cíl 1: Vytvoření mutantních variant IR-A a IGF-1R

Pro ověření vlastností Arg717 IR-A respektive Arg704 IGF-1R budou v prvním kroku vytvořeny jejich mutantní varianty pomocí místně specifické mutagenese genů pro IR-A a IGF-1R v expresních vektorech pCMV3. Budou rovněž zavedeny mutace se známou funkcí v pozicích His710 IR-A respektive His697 IGF-1R, které budou sloužit jako srovnávací model. Tyto expresní vektory budou vpraveny do buněk tranzientní transfekcí a exprimovány v buněčné linii myších embryonálních fibroblastů s disrupcí genu pro IGF-1R (tzv. R- buňky).

Cíl 2: Vytvoření a izolace receptorových ektodomén mutantních variant IR-A a IGF-1R

Jako druhý model pro určení vlastností argininů poslouží receptorové ektodomény. Geny mutantních variant IR-A a IGF-1R vytvořené v cíli 1 budou využity pro konstrukci expresních vektorů pTT5SH8Q2 zkrácením na geny kódující pouze ektodoménové části receptorů. Tyto expresní vektory budou dále tranzientně transfekovány do buněčné linie Hek293-6E. Exprimované receptorové ektodomény budou purifikovány pomocí afinitní chromatografie.

Cíl 3: Měření vazebných a signalizačních vlastností mutantních variant celkových IR-A a IGF-1R a jejich ektodomén

Budou provedeny saturační vazebné zkoušky za použití radioligandů ^{125}I -inzulínu a ^{125}I -IGF-1 na mutantních variantách celkových IR-A a IGF-1R z 1. cíle exprimovaných v R- buňkách. Biologická aktivita mutantních variant celkových receptorů bude ověřena stimulačními zkouškami s přirozenými ligandy.

Vazebné vlastnosti mutantních variant budou ověřeny také na modelu receptorových ektodomén vytvořených v 2. cíli po jejich ukotvení na destičky a provedení saturačních vazebných zkoušek za použití radioligandů ^{125}I -inzulínu a ^{125}I -IGF-1.

3 Přehled literatury

3.1 Rodina inzulínu podobných peptidů

Rodina inzulínu podobných peptidů je zastoupena významnými hormony živočišného metabolismu. Do rodiny inzulínu podobných peptidů se řadí inzulín; inzulínu podobné růstové faktory 1 (IGF-1) a 2 (IGF-2); relaxiny H1, H2 a H3 a inzulínu podobné peptidy 3-6. Tyto hormony se vyznačují značnou evoluční příbuzností, kdy pravděpodobně vznikly ze společného ancestrálního inzulínového genu. Sdílí charakteristický inzulínový strukturní motiv a zachovávají si podobnou terciální strukturu. Avšak biologické účinky těchto hormonů mohou být různé, účastní se regulace různých drah metabolismu či proliferace a apoptózy shrnuto v (Chan *et al.*, 1992; Shabanpoor *et al.*, 2009).

3.2 Inzulín

Inzulín je peptidový hormon, který je jedním z ústředních hormonů zajišťující regulaci lidského metabolismu. Syntéza inzulínu probíhá především v β -buňkách Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, a to již od osmého týdne embryonálního vývoje (Polak *et al.*, 2000). Lidský gen kódující inzulín byl lokalizován na krátkém rameni chromozómu 11 a konkrétně odpovídá pruhu 11p15 (Harper *et al.*, 1981). Různé typy mutací v inzulínovém genu mohou vést k autozomálně dominantnímu onemocnění diabetem mellitem, takový stav se souhrnně označuje jako „mutant *Ins*-gene-induced diabetes in youth“ zkráceně také jako syndrom *MIDY* a vyznačuje se inzulínovou deficiencí, která není způsobena autoimunitní reakcí vůči β -buňkám shrnuto v (Liu *et al.*, 2010).

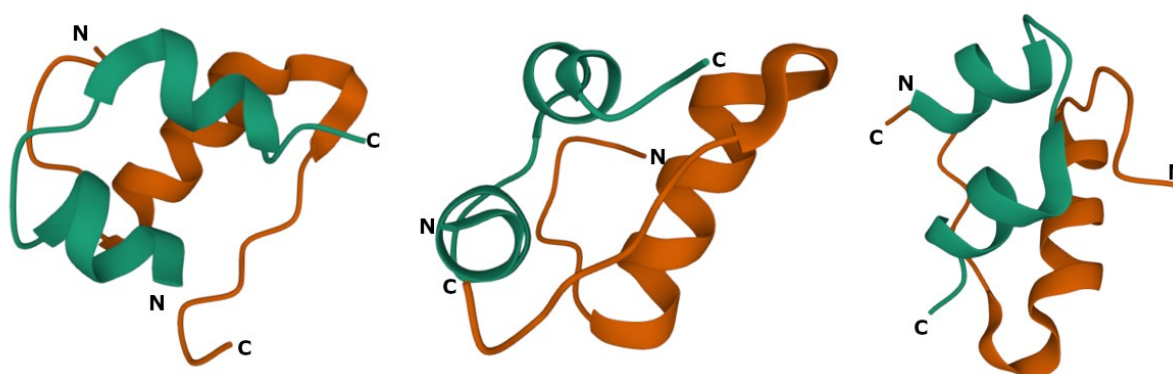
Poprvé byl inzulín popsán již roku 1921 Bantingem a Bestem (Banting *et al.*, 1922), kteří experimentovali s izoláty slinivky břišní. Po úspěšných pokusech na psech, poprvé aplikovali extrahovaný inzulín čtrnáctiletému pacientovi s diabetem mellitem 1. typu a pozorovali zlepšení jeho fyzického stavu. Za svůj zásadní objev v léčbě diabetu byli odměněni Nobelovou cenou již v roce 1923. V 50. letech 20. století se stal hovězí inzulín prvním peptidem, u kterého byla určena primární struktura (Sanger and Tuppy, 1951a, 1951b; Sanger and Thompson, 1953a, 1953b). Sanger byl za tuto práci odměněn

Nobelovou cenou v roce 1958. O necelých deset let později byla upřesněna také aminokyselinová sekvence lidského inzulínu (Nicol & Smith, 1960).

3.2.1 Struktura inzulínu

Lidský inzulín se skládá z 51 aminokyselin, které jsou rozděleny do dvou řetězců A a B. Molekulová hmotnost lidského inzulínu dosahuje hodnoty 5808 Da. Řetězec A obsahuje 21 aminokyselin a jeden disulfidický můstek mezi cysteiny CysA6-CysA11. Druhý řetězec B je složen ze 30 aminokyselin a s řetězcem A je kovalentně spojen dvěma disulfidickými můstky, a to na pozicích CysA7-CysB7 a CysA20-CysB19 (Ryle *et al.*, 1955).

Díky práci laboratoře Dorothy Hodgkinové byla objasněna sekundární i terciární struktura inzulínu. Spojení A a B řetězce ohraničuje takzvanou centrální α -šroubovici B řetězce formující se aminokyselinami SerB9-CysB19. Centrální α -šroubovice je dále obklopena β -otáčkami na pozicích GlyB8 a GlyB20-GlyB23. Na C-konci B řetězce je antiparalelně s centrální α -šroubovicí položen β -skládaný list rozkládající se mezi GlyB23-ThrB30. Řetězec A obsahuje dvě α -šroubovice, které jsou umístěny antiparalelně vůči sobě, čímž jsou v relativní blízkosti N a C-konec A řetězce. První α -šroubovice se nachází na N-konci a je tvořena GlyA1-ThrA8 a druhý šroubovicový segment aminokyselinami SerA12-TyrA19. Obě šroubovice jsou spojeny SerA9-SerA12, jež vytváří ohyb pro šroubovice viz obr. 1 shrnuto v (Blundell *et al.*, 1972).

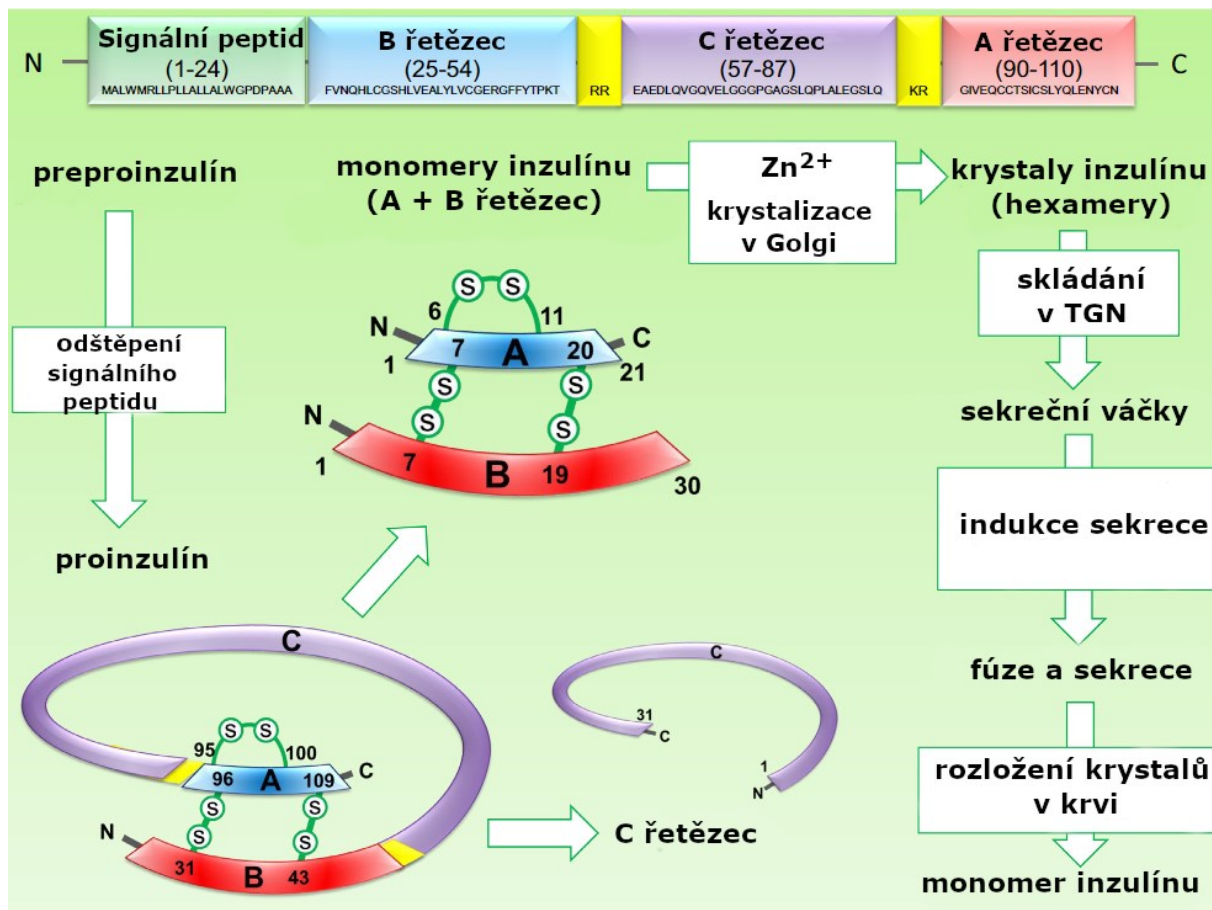


Obr. 1: Lidský inzulín – zeleně znázorněn řetězec A, který tvoří dvě antiparalelní α šroubovice, oranžově znázorněn řetězec B s centrální α šroubovicí; PDB ID: 3I40

3.2.2 Biosyntéza inzulínu

Inzulín vzniká β -buňkách Langerhansových ostrůvků nejprve jako jednořetězcový prekurzor, který prochází postupnou maturací. Inzulínová mRNA je translatována v polypeptid takzvaný proinzulín, který obsahuje signální aminokyselinovou sekvenci rozeznávanou signál-rozpoznávající částicí, díky níž je prekurzor inzulínu ko-translačně naveden do hrubého endoplasmatické retikula (Patzelt *et al.*, 1978; Eskridge & Shields, 1983). Zde dochází k odštěpení signální sekvence za vzniku proinzulínu. Toto odštěpení je důležitým krokem v maturaci inzulínu, protože již neschopnost buňky odštěpit signální sekvenci může vést k rozvoji diabetu mellitu (Liu *et al.*, 2012). Proinzulín je tedy jednořetězcový prekurzor inzulínu obsahující B řetězec, vmezeřený C řetězec a A řetězec viz obr. 2 (Steiner *et al.*, 1967; Oyer *et al.*, 1971). V oxidativním prostředí endoplazmatického retikula dochází ke sbalování proinzulínu a správnému utvoření disulfidických můstků za pomoci disulfid oxidázy ERO1- β a protein disulfid izomerázy. Následně proinzulín opouští endoplazmatické retikulum a přechází do Golgiho aparátu (Zito *et al.*, 2010; Rajpal *et al.*, 2012). Jak postupuje sekrece, je v časných sekrečních váčcích vyštěpen řetězec C z proinzulínu prohormon konvertázami 1/3 a 2, čímž dostává maturovaný inzulín podobu monomerního hormonu tvořeného dvěma řetězci spojenými disulfidickými můstky (Smeekens *et al.*, 1991; Huang & Arvan, 1994).

Před kompletní konverzí na inzulín dochází za přítomnosti zinečnatých iontů k dimerizaci a následné hexamerizaci proinzulínu v trans Golgiho aparátu (Huang & Arvan, 1995). Je předpokládáno, že k vyštěpení C řetězce dochází již v hexamerním stavu, ale proinzulín si udržuje rozpustnou podobu, než dojde k místu konverze (Grant *et al.*, 1972). V kyselém pH 5,5 sekrečních váčků hexamery inzulínu krystalizují a stávají se nerozpustné. Následný kontakt s neutrálním mimobuněčným prostředím při sekreci způsobuje rozpad krystalů a v krvi tak aktivní inzulín koluje jako monomer shrnuto v (Dodson & Steiner, 1998). Biosyntéza inzulínu je vizuálně shrnuta na obr. 2.



Obr. 2: Biosyntéza inzulinu – inzulín je syntetizován jako preproinzulín, po odštěpení signálního peptidu vzniká proinzulín. Proinzulín je konverzován na inzulín tvořený dvěma řetězci A a B. Za přítomnosti zinečnatých kationtů tvoří inzulín krystaly hexamerů v trans Golgiho aparátu (TGN), které se po sekreci do krve rozpadají zpět na monomery. Převzato a upraveno dle (Vakilian et al., 2019).

3.2.3 Fyziologická funkce inzulinu a patologie

Inzulín je jedním z nejdůležitějších metabolických hormonů. Po příjmu a zpracování potravy trávicím systémem je inzulín sekretován z β -buněk. Snižuje hladinu glukózy v krvi, a to tím, že zvyšuje translokaci GLUT4 transportéru pro glukózu na cytoplazmatickou membránu především v myocytech a adipocytech. Díky tomu se zrychluje vstřebávání glukózy do buněk. Kromě toho v játrech inzulín zastavuje glykogenolýzu a glukoneogenezi, a naopak stimuluje syntézu glykogenu. Zároveň inzulín stimuluje i syntézu lipidů shrnuto v (Saltiel & Kahn, 2001).

Poruchy v drahách vedoucích k produkci inzulinu či signalizačních drahách inzulinové odpovědi mají za následek metabolická onemocnění diabetem mellitem typu 1 respektive typu 2. Pro tato onemocnění je typická dlouhodobě zvýšená hladina glukózy v krvi. Diabetes mellitus typu 1 se vyznačuje inzulinovou deficiencí v důsledku

autoimunitní reakce proti pankreatickým β -buňkám a často se projevuje již v dětství. Oproti tomu diabetes mellitus typu 2 je spojován s rezistencí vůči inzulínu nejčastěji způsobenou obezitou a nezdravým životním stylem (Tan *et al.*, 2019). Dle mezinárodní diabetologické federace trpělo diabetem mellitem v roce 2019 celosvětově 463 milionů lidí, což představovalo 9,3 % světové populace. Je předpokládáno, že do roku 2030 stoupne počet lidí s diagnostikovaným onemocněním až na 10,2 % světové populace (Saeedi *et al.*, 2019).

Kromě diabetu je role inzulínu uvažována u rakovinných onemocnění. Inzulín vykazuje mitogenní působení například u karcinomu slinivky břišní (Fisher *et al.*, 1996). Zvýšená hladina inzulínu v krvi tzv. hyperinzulinémie je považována za rizikový faktor u rakoviny prostaty, u které také indikuje větší agresivitu tumoru a horší prognózu onemocnění (Hammarsten & Högstedt, 2005). Hyperinzulinémie dále koreluje s rizikem vzniku rakoviny kolorekta, jater a chronického onemocnění jater, a to bez ohledu na BMI pacienta (Ma *et al.*, 2004; Loftfield *et al.*, 2016). U žen je inzulín spojován s rakovinou prsu, vaječníků či endometria (Sun *et al.*, 2016). Je předpokládáno, že vysoká koncentrace inzulínu v krvi obecně podporuje rozvoj rakovinného bujení, jelikož onkologičtí pacienti s rozvinutou hyperinzulinémií mají zvýšené riziko úmrtí na své rakovinné onemocnění (Tsujimoto *et al.*, 2017).

Inzulín proniká také do mozku přes hematoencefalickou bariéru (Banks *et al.*, 1997). Experimenty na zvířecích modelech ukazující přítomnost mRNA pro inzulín genu *ins2* ve specializovaných neurogliální buňkách naznačují, že také v mozku probíhá lokální syntéza inzulínu, která odpovídá na hladinu glukózy v mozku (Molnár *et al.*, 2014). Takové výsledky podtrhují důležitost inzulínu v mozkových funkcích. Jednou z funkcí inzulínu v mozku je komplexní regulace příjmu potravy. Nedostatečnost inzulínové signalizace vede u myší k obezitě (Brüning *et al.*, 2000). Přísun inzulínu snižuje odpověď mozku na objekty připomínající jídlo, snižuje chuť k jídlu, a tím i klesá přísun potravy (Guthoff *et al.*, 2010; Jauch-Chara *et al.*, 2012). Inzulín se také účastní procesu učení, zlepšuje kognitivní funkce, paměť i náladu (Zhao *et al.*, 1999; Kern *et al.*, 2001; Benedict *et al.*, 2004). Nízké hladiny inzulínu v mozkomíšním moku jsou spojovány s rozvojem neurodegenerativní Alzheimerovy choroby (Craft *et al.*, 1998). Inzulín má totiž neuroprotektivní účinky, především zabraňující produkci a akumulaci amyloidu- β , který je asociován s Alzheimerovou chorobou (Pandini *et al.*, 2013). Nesprávné fungování

inzulínových drah se uvažuje rovněž v asociaci s Parkinsonovou a Huntingtonovou chorobou (Lalić *et al.*, 2008; Aviles-Olmos *et al.*, 2013).

3.3 Inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1)

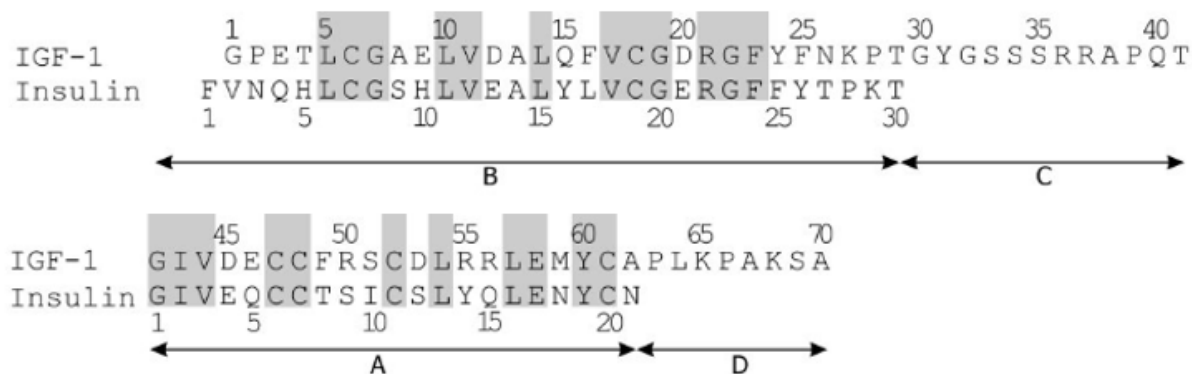
Inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) je jednořetězcový peptidový hormon z rodiny inzulínu podobných peptidů. Vykazuje přibližně 50% strukturní homologii s inzulínovými řetězci A a B (Rinderknecht & Humbel, 1978). Na rozdíl od inzulínu, je IGF-1 produkován v mnoha tkáních. Hlavním místem syntézy IGF-1 je jaterní tkáň, odkud je vyplavován do krve. Produkce ale může probíhat i v ledvinách, plicích, děloze, varlatech, kosterní a srdeční svalovině, střevech, kůži či dokonce v placentě a mozku (Murphy *et al.*, 1987; Hant *et al.*, 1988). Exprese IGF-1 probíhá jak v prenatalní, tak i postnatalní fázi života člověka. Postnatalní sekrece IGF-1 jaterními buňkami do krve je stimulována růstovým hormonem shrnuto v (Daughaday, 2000). Gen pro IGF-1 je lokalizován na dlouhém rameni chromozomu 12 a odpovídá pruhu 12q22-24 (Brissenden *et al.*, 1984).

IGF-1 se v krevním řečišti nejčastěji vyskytuje ve vazbě na IGF vazebné proteiny (IGFBP), které k němu mají vysokou afinitu. Rodina IGFBP obsahuje šest evolučně konzervovaných zástupců vazebných proteinů, které regulují biologické funkce a aktivitu inzulínu podobných růstových faktorů. 80 % IGF-1 kolujícího v krvi je vázáno proteinem IGFBP-3, zbylých 20 % je vázáno ostatními pěti IGFBPs shrnuto v (Hoeflich *et al.*, 2018).

IGF-1 byl objeven již roku 1957 a pojmenován jako „sulphation factor“, který stimuluje inkorporaci sulfátu do chondroitin-sulfátu v chrupavkách potkanů shrnuto v (Hendler *et al.*, 1972). Následně byl IGF-1 popsán jako faktor s aktivitou podobnou inzulínu, ale neodpovídající na vazbu protilátek proti inzulínu (Froesch *et al.*, 1963). Jelikož se jedná o stejný hormon, došlo ke sjednocujícímu přejmenování na somatomedin C (Hendler *et al.*, 1972). V roce 1976 byly izolovány dva aktivní peptidy z lidského séra, které byly podobné inzulínu, díky jejich mitogenním účinkům byly nazvány IGF-1 a IGF-2 (Rinderknecht *et al.*, 1976). V roce 1983 bylo potvrzeno, že somatomedin C a IGF-1 jsou sekvenčně identické peptidové hormony (Klapper *et al.*, 1983). Nakonec bylo přijato konečné označení peptidu jako IGF-1 shrnuto v (Daughaday *et al.*, 1987).

3.3.1 Struktura IGF-1

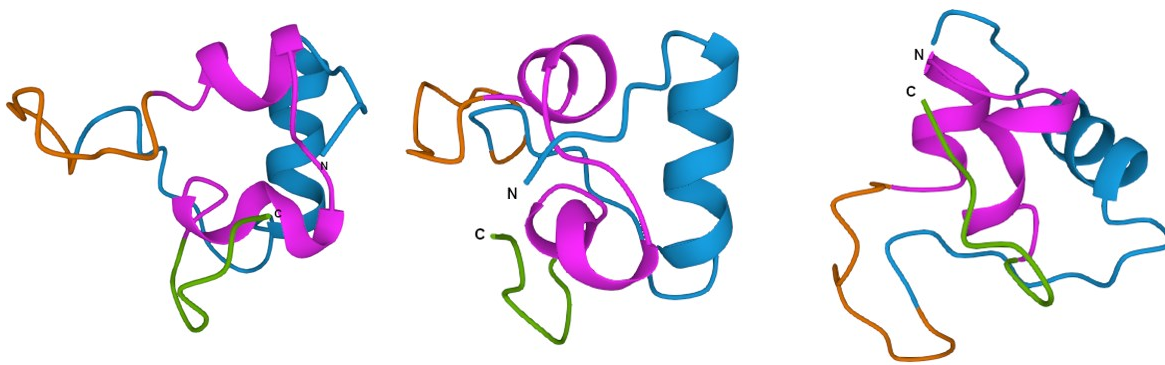
IGF-1 je tvořen 70 aminokyselinami a dosahuje molekulové hmotnosti 7649 Da. Oproti inzulínu tvoří IGF-1 jeden řetězec, který je možné rozdělit na 4 domény. Domény A a B jsou přibližně z 50 % sekvenčně homologické s inzulínovými řetězci viz obr. 3.



Obr. 3: Porovnání primárních struktur IGF-1 a inzulínu – šedě označeny shodné aminokyseliny, šipkami označeny domény B, C, A a D. Domény A a B jsou přibližně z 50 % homologické s inzulínovými řetězci A a B.

Od N-konce IGF-1 se nachází domény B (B1-29), C (C30-41), A (A42-62) a D (D63-70). Domény A a B jsou jako u proinzulínu spojeny doménou C, kterou však u IGF-1 tvoří pouze 12 aminokyselin a není sekvenčně podobná s proinzulínovým řetězcem C. Na C-konci IGF-1 se vyskytuje dalších 7 aminokyselin tvořící doménu D (Rinderknecht & Humbel, 1978). Stejně jako inzulín, IGF-1 obsahuje tři disulfidické můstky na pozicích Cys61-Cys18, Cys48-Cys6, které propojují A a B doménu a Cys47-Cys52 tvořící můstek v A doméně (Blundell *et al.*, 1978).

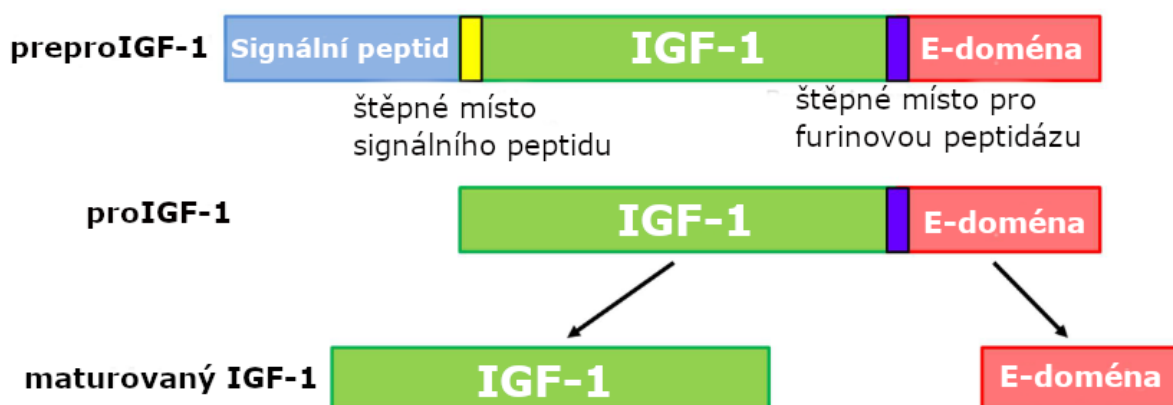
Kromě sekvenční homologie sdílí inzulín s IGF-1 také podobnosti v sekundární a terciární struktuře. IGF-1 vytváří tři α -šroubovicové struktury, které odpovídají umístěním inzulínových α -šroubovic a formují jádro peptidu. Jedna α -šroubovice se nachází mezi aminokyselinovými zbytky IGF-1 Ala8-Cys18 domény B, další dvě se formují v A doméně na pozicích Gly42-Cys48 a Leu54-Cys61. Dále IGF-1 obsahuje dva β -skládané listy na pozicích Gly19-Gly22 a následovně Phe23-Asn26 v B doméně. Spojovací doména C a C-koncová doména D se jeví jako flexibilní bez pevné sekundární struktury viz obr. 4 (Blundell *et al.*, 1978; Sato *et al.*, 1993).



Obr. 4: Lidský IGF-1 – modře označena doména B, oranžově označena doména C, růžově označena doména A a zeleně označena doména D; PDB ID: 10.2210/pdb2GF1/pdb

3.3.2 Biosyntéza IGF-1

Z mRNA pro IGF-1 se po translaci stává prekurzorový peptid tzv. preproIGF-1, který je tvořen přídatnými doménami na N i C-koncích (Jansen *et al.*, 1983). Gen pro lidský IGF-1 je složen ze 6 exonů, díky alternativnímu sestřihu transkriptu mohou vznikat dvě izoformy lišící v signální N-koncové sekvenci a tři izoformy v tzv. doméně E na C-konci preproIGF-1 (Wallis, 2009). PreproIGF-1 obsahuje 48 aminokyselin dlouhou N-koncovou signální sekvenci následovanou doménami B, C, A, D a na C-konci doménou E. Po odštěpení signální peptidové sekvence v endoplazmatickém retikulu vzniká proIGF-1 (Rotwein *et al.*, 1987). Až odštěpením E domény furinovou peptidázou vzniká jednořetězcový maturovaný IGF-1, který je následně sekretován mimo buňku (Duguay *et al.*, 1995). Biosyntéza IGF-1 je shrnuta na obr. 5.



Obr. 5: Biosyntéza IGF-1: Nejprve vzniká prekurzor preproIGF-1. Následně dochází k odstřížení signální sekvence a tvorbě proIGF-1. Nakonec je prekurzor konvertován na maturovaný IGF-1 odstřížením E domény. Převzato a přeloženo dle (Brisson & Barton, 2013)

3.3.3 Fyziologická funkce IGF-1 a patologie

Na rozdíl od inzulínu, vykazuje IGF-1 spíše mitotické účinky. Je významným regulátorem růstu. Hladina IGF-1 v krvi je nejvyšší v pubertálním věku člověka, kdy je růst nejvýznamnější, posléze v dospělosti postupně klesá (Juul *et al.*, 1994). IGF-1 cirkulující v krvi je jedním z hormonů, který je důležitý pro správný vývoj a růst kostí a udržení kostní hmoty (Yakar *et al.*, 2002). Předpokládá se, že vysoká hladina IGF-1 v krvi během puberty koreluje s růstem kostní tkáně právě v tomto období (Kanbur *et al.*, 2005). Snižování produkce IGF-1 s vyšším věkem se odráží na kvalitě kostí. Nízká koncentrace IGF-1 je spojována s rozvojem osteoporózy u žen po menopauze (Seck *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2008). Deficience či mutace genu pro IGF-1 či jeho receptoru vedou k nitroděložní i postnatální růstové retardaci (Liu *et al.*, 1993; Woods *et al.*, 1996; Abuzzahab *et al.*, 2003). Nedostatečnost IGF-1 se může projevovat růstovým onemocněním tzv. Laronovým syndromem, který se vyznačuje nízkou hladinou IGF-1 v krvi a rezistencí k růstovému hormonu shrnuto v (Laron, 1999).

Kromě růstu je IGF-1 zapojen také ve vývoji mozku. Myši s deletovaným genem pro IGF-1, pokud přežijí po narození, mají menší mozkovou hmotu se sníženou myelonizací neuronů (Beck *et al.*, 1995). Stejně tak mutace v genu pro IGF-1 či jeho receptoru u lidí jsou provázeny defekty nervového systému a mentální retardací (Woods *et al.*, 1996; Abuzzahab *et al.*, 2003). Podobně jako inzulín, IGF-1 prochází hematoencefalickou bariérou do mozku. Penetrace IGF-1 do mozku je stimulována neuronální aktivitou (Nishijima *et al.*, 2010). Nízká hladina IGF-1 v mozku se uvažuje také v souvislosti s rozvojem Alzheimerovy choroby. IGF-1 napomáhá snižovat koncentraci amyloidu- β v mozku, a zároveň zabraňuje hyperfosforylaci tau proteinu, což je spojováno s rozvojem neurodegenerace (Carro *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2005). Pozitivní vliv IGF-1 byl popsán také v regeneraci mozkové tkáně po cévní mozkové příhodě (de Smedt *et al.*, 2011). IGF-1 podporuje proliferaci při diferenciaci mesenchymálních kmenových buněk na nervové buňky, tím vykazuje potenciál pro terapie neurodegenerativních onemocnění (Huat *et al.*, 2014). V neposlední řadě je nedostatek IGF-1 předpokládán v rozvoji úzkostných, stresových stavů či posttraumatické stresové poruchy (Santi *et al.*, 2018; Fernández de Sevilla *et al.*, 2022).

Jak již název tohoto hormonu napovídá, IGF-1 podporuje růst a proliferaci buněk. Kvůli tomu je jeho deregulace asociována také s některými typy rakovinného onemocnění. Vysoká koncentrace IGF-1 v krevní plazmě pozitivně koreluje s vyšším

rizikem rozvoje rakoviny prsu u žen či rakoviny prostaty u mužů (Peyrat *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 1998; Knuppel *et al.*, 2021). IGF-1 přímo napomáhá invazivitě prostatických nádorových buněk (Saikali *et al.*, 2008). Vyšší hodnoty plazmatického IGF-1 zvyšují riziko vzniku kolorektálního karcinomu nezávisle na pohlaví (Murphy *et al.*, 2020; Knuppel *et al.*, 2021). Dále byla tato korelace určena také pro rakovinu štítné žlázy, mnohočetný myelom či maligní melanom (Knuppel *et al.*, 2021). IGF-1 je nadprodukován v rakovinných buňkách jater a podporuje jejich proliferaci a metastatickou aktivitu. Vyšší exprese IGF-1 v tomto typu rakoviny zhoršuje prognózu onemocnění především u pacientů s diabetem mellitem 2. typu (Shan *et al.*, 2022).

3.4 Inzulínový receptor

Inzulín se váže na svůj receptor zakotvený v cytoplazmatické membráně. Inzulínový receptor (dále IR) byl objeven zkoumáním vazby ^{125}I -inzulínu na cytoplazmatickou membránu hepatocytů v roce 1971 (Freychet *et al.*, 1971). Dále byl izolován z membránové frakce potkaních hepatocytů a adipocytů již rok poté (Cuatrecasas, 1972). Díky podobnosti intracelulární domény IR s receptorem epidermálního růstového faktoru je řazen do rodiny tyrozinkinázových receptorů (Ebina *et al.*, 1985; Ullrich *et al.*, 1985). Avšak oproti jiným tyrozinkinázovým receptorům v této rodině se vyskytuje ve formě heterotetrameru, který je složen ze dvou α a dvou β podjednotek, které jsou spojeny disulfidickými můstky. Nicméně podjednotka α navazuje na podjednotku β a společně se chovají jako monomerní jednotka, která je spojená s druhým $\alpha\beta$ monomerem. Proto se také uvádí uspořádání IR jako heterodimer $(\alpha\beta)_2$ (Massague *et al.*, 1980; Kasuga, Hedou, *et al.*, 1982; Ebina *et al.*, 1985; Ullrich *et al.*, 1985).

Gen pro lidský IR je lokalizován na krátkém rameni chromozomu 19, konkrétně odpovídá pruhu 19p13.2-3 (Ebina *et al.*, 1985; Yang-Feng *et al.*, 1985). Mutace v tomto genu způsobují závažnou inzulínovou rezistenci jako je syndrom leprauchismus či méně závažný Rabson-Mendenhall syndrom. Mutace, které se nacházejí v α podjednotce, a tedy narušují vazbu inzulínu na receptor, vedou k závažnější formě rezistence (de Geest *et al.*, 2002; Ardon *et al.*, 2014). Kódující sekvence je tvořena 22 exony (Seino *et al.*, 1989). Během transkripce dochází k alternativnímu sestřihu exonu 11 za vzniku dvou receptorových izoform IR-A a IR-B. Tyto izoformy se liší v délce C-konce α podjednotky. IR-B obsahuje o 12 aminokyselin na C-konci α podjednotky více než IR-A (Seino & Bell, 1989; Seino *et al.*, 1989). Izoformy A a B se odlišují v míře exprese v různých tkáních.

Kratší izoforma IR-A je dominantně exprimována v méně diferencovaných buňkách, jako jsou lymfoblasty, embryonální či rakovinné buňky (Seino & Bell, 1989; Sesti *et al.*, 1994; Frasca *et al.*, 1999). Dále se vyskytuje také v leukocytech, buňkách placenty, mozku či sleziny (Seino & Bell, 1989; Benecke *et al.*, 1992). Oproti tomu delší izoforma IR-B je dominantně exprimovaná v tkáních, které jsou typicky senzitivní na inzulín, jako jsou játra, kosterní svalovina, tuková tkáň či ledviny (Moller *et al.*, 1989; Seino & Bell, 1989; Benecke *et al.*, 1992). Ve tkáních, které exprimují obě izoformy, může docházet i ke vzniku hybridních receptorů tvořených monomerem IR-A a monomerem IR-B (Blanquart *et al.*, 2008). Na rozdíl od IR-B má izoforma IR-A také relativně vysokou afinitu k IGF-2 (Frasca *et al.*, 1999). Zároveň aktivace IR-A má spíše mitotické účinky oproti IR-B. Vazba ligandu na IR-A stimuluje proliferaci buněk a působí proti apoptóze (Massimino *et al.*, 2021).

3.4.1 Biosyntéza a struktura IR

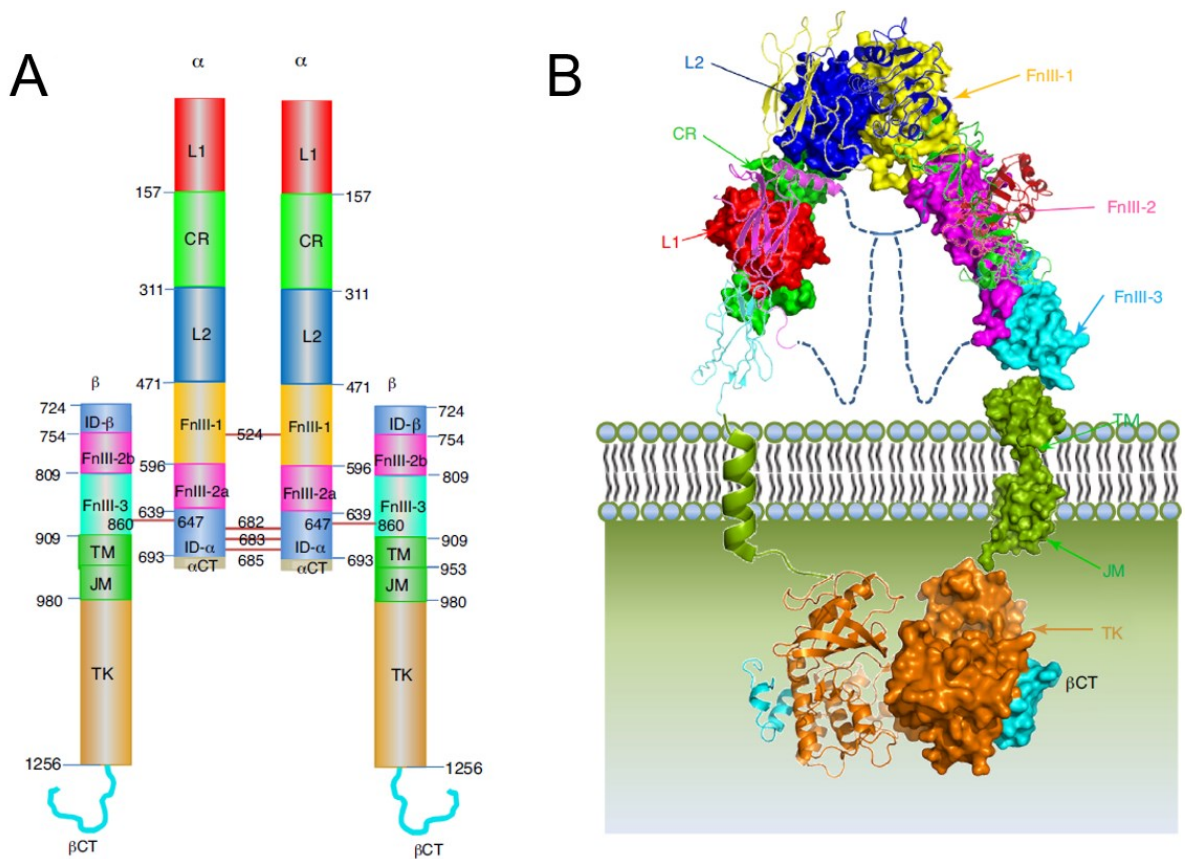
Inzulínový receptor je glykoprotein s celkovou molekulovou hmotností přibližně 320 kDa. Receptor je složen ze čtyř podjednotek, dvou α a dvou β podjednotek (Massague *et al.*, 1980; Kasuga, Hedo, *et al.*, 1982). Maturovaný receptor vzniká z prekurzoru, který prochází výraznými post-translačními úpravami. mRNA kódující α a β podjednotku je translatována se signální sekvencí, která navádí proreceptor do endoplazmatického retikula. Zde dochází k N-glykosylacím a k tvorbě disulfidických můstků v rámci monomeru, ale také ve spojení v dimer. Dále se v Golgiho aparátu od sebe odštěpí α a β podjednotky pomocí proteolytického štěpení. V Golgiho aparátu prochází proreceptor dalším kolem glykosylace, než se dostane sekreční dráhou do cytoplazmatické membrány shrnuto v (Gorden *et al.*, 1989). Na receptorové ektodoméně se nachází celkem až 18 N-glykosylací (α i β podjednotka) a šest O-glykosylací (β podjednotka) (Sparrow *et al.*, 2007, 2008). Tyto glykosylace zajišťují správnou maturaci receptoru. Současně mutační analýza ukázala vliv glykosylací na vazebnou afinitu či aktivaci receptoru (Elleman *et al.*, 2000).

Strukturu IR lze pomyslně rozdělit do tří částí podle lokalizace v prostoru na extracelulární, transmembránovou a intracelulární část viz obr. 6.

Extracelulární část (ektodoména) je tvořena dvěma celými α podjednotkami a N-koncovou částí β podjednotek. Ektodoménu tvoří od N-konce α podjednotky dvě domény bohaté na leuciny (L1 a L2), mezi které je vmezežena doména bohatá na cysteiny (CR), následují tři domény „fibronectin-type III“ (FnIII-1-3). V rámci domény FnIII-2 se

nachází inzerční doména (ID- α) se štěpným místem pro furinovou proteázu pro rozdělení α a β podjednotky viz obr. 6. Na C-konci α podjednotky vyčnívá C-terminální doména (α CT), která je tvořena aminokyselinovými zbytky 693-719 pro IR-A, IR-B obsahuje 12 aminokyselin navíc za pozicí 717. Extracelulární část dále tvoří N-konec β podjednotky se třemi doménami: ID- β , FnIII-2b a FnIII-3b shrnuto v (Ye *et al.*, 2017). Spojení α a β podjednotek je zajištěno disulfidickým můstkem na pozici Cys647-Cys872 (Sparrow *et al.*, 1997). Dimerizace receptoru je stabilizována disulfidickými můstky mezi α podjednotkami na pozicích Cys524, 682, 683 a 685 viz obr. 6 (Schäffer & Ljungqvist, 1992; Sparrow *et al.*, 1997).

Transmembránová část je tvořena 23 aminokyselinovým α helixem β podjednotky, která má schopnost dimerizace (Li *et al.*, 2014). Již v intracelulárním prostoru na ni navazuje juxtamembránová doména (JM), která obsahuje fosforylovatelné tyrozinové zbytky, čímž se účastní následné signalizace. Zároveň se zde nachází signál pro internalizaci receptoru (Sattar *et al.*, 2007). Cytoplazmatická část je dále tvořena tyrosinkinázovou doménou (TK) a C-terminální doménou β podjednotky (β CT). Tyrosinkinázová doména je tvořena dvěma laloky a aktivační smyčkou (Hubbard *et al.*, 1994). V rámci této smyčky se nachází tři konzervované fosforylovatelné tyroziny důležité pro aktivaci signálních drah (Hubbard, 1997). Kromě tyrozinů podléhají fosforylaci také dva seriny (Al-Hasani *et al.*, 1997).



Obr. 6: (A) Struktura IR/IGF-1R dimeru z pohledu rozložení domén. L1 a L2 označuje domény bohaté na leuciny, CR doménu bohatou na cysteiny; FnIII1-3 domény „fibronectin type-III“, ID inzerční domény, α CT a β CT označují C-terminální domény, TM transmembránovou doménu, JM juxtamembránovou dománu a TK tyrozinkinázovou doménu (B) Prostorová představa dimeru IR, jeden z monomerů je zobrazen v sekundární struktuře, druhý monomer představuje povrchovou strukturu. Převzato z (Ye et al., 2017).

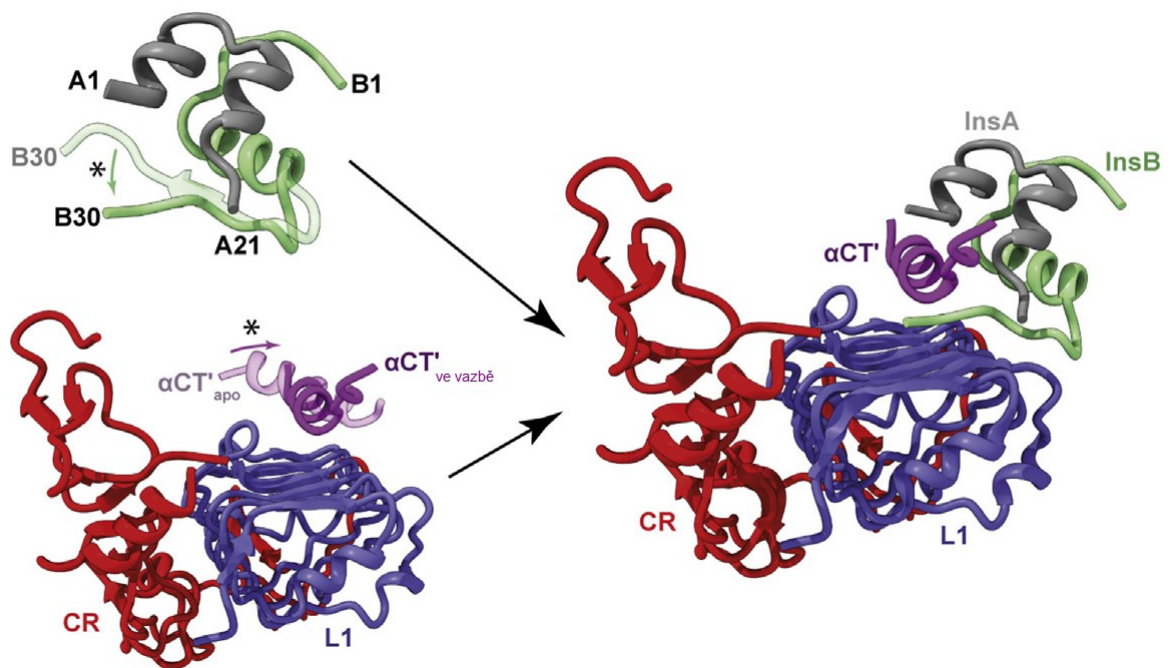
Přestože je IR známý již od 70. let 20. století, bylo velice obtížné rozluštit jeho trojrozměrnou strukturu. Kvůli své velikosti, rozsáhlým glykosylacím a membránové lokalizaci je složitá jeho krystalizace.

Na základě krystalografických studií receptorových ektodomén bylo navrženo, že dimer IR bez vazby inzulínu (neaktivní forma) vytváří strukturu tvarem podobnou obrácenému písmenu V, které vzniká ohybem mezi doménami L2 a FnIII-1 respektive L2' a FnIII-1' (domény druhého monomeru) viz obr. 6 (McKern *et al.*, 2006; Croll *et al.*, 2016). I když ektodoména neodráží plně skutečné chování IR, byla struktura obráceného V nakonec pozorována pomocí elektronové mikroskopie také u celkových receptorů. Konformace obráceného V dovoluje separaci tyrozinkinázových domén a udržuje je v neaktivním stavu (Schäffer, 1994; Gutmann *et al.*, 2018).

3.4.2 Vazba inzulínu na IR a jeho aktivace

Inzulín se může vázat až do čtyř vazebných míst v rámci dimeru IR. Každý z monomerů obsahuje dvě vazebná místa primární a sekundární, které se liší svou afinitou (Whittaker *et al.*, 2008; Menting *et al.*, 2013). Inzulín interaguje s primárním vazebným místem především aminokyselinovými zbytky GlyA1, IleA2, ValA3, GlnA5, TyrA19, AsnA21, ValB12, TyrB16, GlyB23, PheB24, PheB25 a TyrB26 shrnuto v (de Meyts, 2015). Primární vazebné místo pokrývá L1 doména jednoho monomeru IR společně s α CT doménou druhého monomeru (Shu *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010). Zatímco doména L1 je v kontaktu pouze s B řetězcem inzulínu, α CT interaguje s oběma řetězci inzulínu (Menting *et al.*, 2013). Již studium mutantních receptorových ektodomén pomohlo odhalit zásadní aminokyselinové zbytky α CT' domény, které se účastní vazby inzulínu. Jedná se konkrétně o aminokyselinové zbytky Thr704', Phe705', Glu76', Tyr708', Leu709', His710', Asn711', Val713', Phe714' a Val715', přičemž klíčovými pro vazbu jsou především His710', Asn711' a Phe714' (Mynarcik *et al.*, 1996, 1997a, 1997b; Menting *et al.*, 2013). Nicméně u mutací způsobující aminokyselinovou záměnu na pozicích kódujících aminokyselinové zbytky Asp707', Val712', Pro716' a nakonec Arg717' nebyla pozorována změna vazby inzulínu (Mynarcik *et al.*, 1996). V pozdějších studiích vazby inzulínu na receptor nebyl již Arg717 zahrnut.

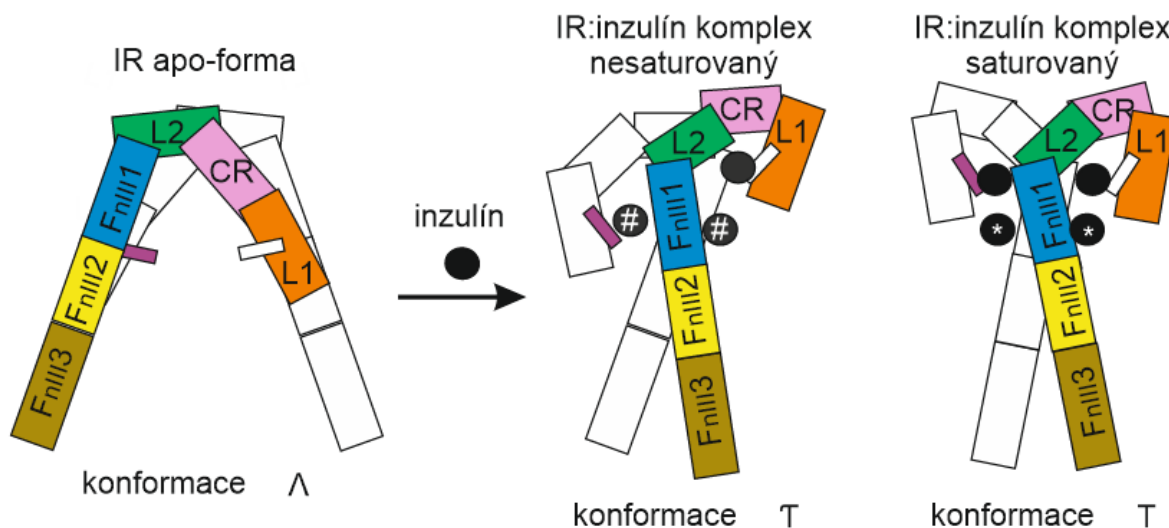
Dle strukturních studií bylo zjištěno, že α CT' se formuje jako α -helix, který v důsledku vazby inzulínu podléhá změně konformace a nasedá kolmo k L1 doméně, a poskytuje tak více interakčních partnerů (aminokyselinové zbytky 697-719) jak pro L1 doménu, tak pro inzulín (Smith *et al.*, 2010; Whittaker *et al.*, 2012; Menting *et al.*, 2013). Zároveň inzulín také prochází konformační změnou, C-terminální část B řetězce (B24-B30) se oddaluje od jádra hormonu a odkrývá aromatické aminokyselinové zbytky pro vazbu do vazebného místa (Menting *et al.*, 2014). Vazba do primárního vazebného místa je znázorněna na obr. 7. Sekundární vazebné místo na receptoru je očekáváno v oblasti FnIII-1 domény (Scapin *et al.*, 2018; Weis *et al.*, 2018; Gutmann *et al.*, 2020). Předpokládané aminokyselinové zbytky inzulínu účastníci se vazby do sekundárního vazebného místa jsou ThrA8, IleA10, Ser A12, LeuA13, GluA17, HisB10, GluB13 a LeuB17 shrnuto v (de Meyts, 2015).



Obr. 7: Strukturální představa vazby inzulinu do primárního vazebného místa na IR. Během vazby inzulinu do primárního vazebného místa dochází k oddálení C-terminální části B řetězce inzulinu a natočení α CT' domény IR. L1 doména IR interaguje s B řetězcem inzulinu, α CT' doména interaguje s řetězcem inzulinu A i B. Šedě je znázorněn A řetězec inzulinu (InsA), zeleně pak B řetězec (InsB). U IR je červeně značena CR doména, fialově L1 doména, která interaguje s B řetězcem inzulinu. Vínově je označena α CT' doména. Hvězdičky představují změnu konformace během vazby inzulinu na receptor. Převzato a upraveno dle (Lawrence, 2021).

Inzulínový receptor vykazuje složitou a velice komplexní kinetiku vazby inzulinu. Kromě toho, že receptorový dimer obsahuje až čtyři vazebná místa pro inzulin, mají tato vazebná místa i odlišné vlastnosti (Schäffer, 1994; Whittaker *et al.*, 2008). Disociační konstanta (K_D) inzulinu pro primární vazebné místo se pohybuje přibližně 6,4 nM, oproti tomu sekundární vazebné místo dosahuje K_D přibližně 400 nM inzulinu (Menting *et al.*, 2013). Kooperace obou vazebných míst vytváří vysoko afinitní vazbu inzulinu na receptor o K_D přibližně 0,4 nM (Whittaker *et al.*, 2008; Menting *et al.*, 2013). Vazba inzulinu na IR vykazuje tzv. negativní kooperativitu, kdy vazba jednoho ligandu znesnadňuje vazbu dalších. Disociace ligandu je závislá na jeho koncentraci a se zvyšující se koncentrací inzulinu se mění také rychlost disociace (de Meyts *et al.*, 1973, 1976). Vazebná kinetika je proto složitě postihnuteľná matematickým modelem. Kiselyov *et al.* navrhli model založený na harmonickém oscilátoru předpokládající vazbu tří inzulinů s podmínkou, že jeden z ligandů je spřažen s dvěma vazebnými místy najednou (Kiselyov *et al.*, 2009). Tento model se s objevem struktury inzulinu se čtyřmi nezávisle vázanými inzulinu stal nedostačujícím (Gutmann *et al.*, 2020).

Mechanismus vazby pomáhají odhalit nedávné strukturní studie. Vazba všech čtyř inzulinů (ve vysoké koncentraci inzulinu) do primárního i sekundárního vazebného místa způsobuje dramatickou změnu konformace ze struktury obráceného písmena V do symetrické struktury připomínající písmeno T, čímž se tyrozinkinázové domény dostávají do relativní blízkosti důležité pro aktivaci receptoru (Gutmann *et al.*, 2018, 2020; Uchikawa *et al.*, 2019). Avšak byla dokumentována také asymetrická struktura T s pouze jedním inzulinem vázaným v primárním vazebném místě. Tato konformace je již aktivní. Je proto usuzováno, že pro aktivaci IR je dostatečná vazba jednoho inzulinu do primárního vazebného místa (Li, Park, *et al.*, 2022; Nielsen *et al.*, 2022). Dále byly dokumentovány struktury IR s různým počtem inzulinů (1-3) v odlišných kombinacích vazby inzulinů do primárních či sekundárních míst (Li, Park, *et al.*, 2022). Bylo navrženo, že se inzulin pravděpodobně váže nejprve do sekundárního vazebného místa i přes jeho nižší afinitu, protože je prostorově přístupnější. Následně jsou obsazována primární vazebná místa (Gutmann *et al.*, 2020; Li, Park, *et al.*, 2022; Nielsen *et al.*, 2022). Přesto je dynamika přechodů mezi těmito konformacemi či vazebnými místy stále nejasná, stejně tak přesný mechanismus aktivace receptoru. Změny konformace na základě vazby rozdílného počtu inzulinů jsou zobrazeny na obr. 8.



Obr. 8: Schématické znázornění změn konformace po vazbě různého počtu molekul inzulinu na modelu receptorové ektodomény. IR bez navázaného inzulinu se formuje do struktury obráceného V. Po vazbě alespoň jednoho inzulinu do primárního vazebného místa přechází do konformace T. Pokud jsou vázány čtyři molekuly inzulinu, IR vykazuje symetrickou konformaci T. Dva inzulíny jsou vázány v primárním vazebném místě a dva v sekundárním. Označení domén na monomeru IR je stejné jako na obr. 6, vínový obdélník znázorňuje α CT doménu. Černý kruh znázorňuje molekulu inzulinu. # označuje inzulíny v sekundárním vazebném místě, které v této konformaci IR může, ale nemusí být přítomné. * označuje přítomný inzulin v sekundárním vazebném místě.

3.4.3 Signalizace IR

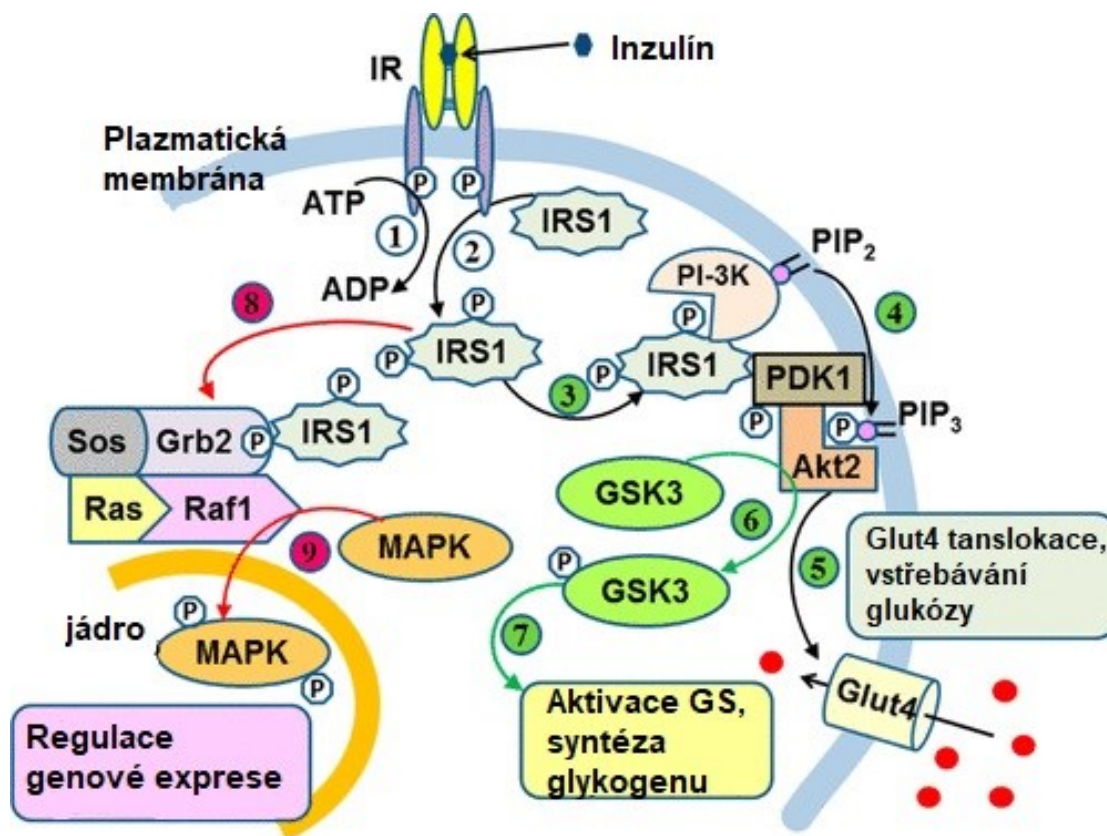
Vazba inzulínu na receptor a konformační změna do struktury T či T vede k přiblížení a dimerizaci tyrozinkinázových domén, tím dochází k aktivaci receptoru (Cabail *et al.*, 2015; Gutmann *et al.*, 2018; Li, Park, *et al.*, 2022). Aktivace probíhá vzájemnou autofosforylací konzervovaných tyrozinových zbytků Tyr1158, Tyr1162 a Tyr1163 (číslování dle IR-B) na TK intracelulární β podjednotek IR (Kasuga, Karlsson, *et al.*, 1982; Ellis *et al.*, 1986; Tornqvist *et al.*, 1987). Tato fosforylace dovoluje změnu konformace tyrozinkinázové domény, čímž stimuluje její schopnost fosforylovat další molekuly signalizačních drah (Rosen *et al.*, 1983; Hubbard, 1997). Mezi substráty pro receptorovou tyrozinkinázu patří především substráty inzulínového receptoru 1-6 (IRS) a různé izoformy „Src-homology-2-containing protein“(Shc). Izoformy IRS se liší v tkáňové distribuci a funkci, kdy nejvíce zastoupené jsou IRS1 a IRS2 shrnuto v (Taniguchi *et al.*, 2006).

Inzulínová signalizace je komplexní, nicméně ji lze rozdělit do dvou základních drah. První dráhou je takzvaná fosfatidylinositol-3-kinázová (PI3K)/Akt dráha, druhou pak mitogenem aktivovaná proteinkinázová (MAPK) dráha viz obr. 9.

Po aktivaci tyrozinkinázových domén receptoru autofosforylací jsou dále fosforylovány IRS (White & Kahn, 1985). IRS-1 obsahuje alespoň 20 potenciálně fosforylovatelných tyrozinových motivů, tudíž vytváří vazebná místa pro signální molekuly s „Src-homology 2“ (SH2) doménami (Sun *et al.*, 1991). Jednou z nich je regulační podjednotka p85 PI3K (Myers *et al.*, 1992). Vazba p85 stimuluje aktivaci katalytické podjednotky p110 PI3K, která přeměňuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP₃) (Backer *et al.*, 1992). K odhalenému PIP₃ na cytoplazmatické membráně asociuje 3-fosfoinositid-dependentní protein kináza 1 (PDK1), která následně aktivuje protein kinázu B neboli Akt (Yamada *et al.*, 2002). Akt je serin/threoninová kináza, která má mnoho různých substrátů signalizačních drah. Mezi ně patří glykogen syntáza kináza-3 (GSK3), která reguluje syntézu glykogenu. Působení inzulínu inhibuje GSK3 a stimuluje syntézu glykogenu (Cross *et al.*, 1995). Především se inzulín podílí na translokaci a zvýšení koncentrace glukózových transportérů typu 4 (GLUT4) na cytoplazmatické membráně pomocí této signalizační dráhy, a tím k rychlejšímu vstřebávání glukózy do buněk. Akt aktivuje protein AS160, jehož doména slouží jako aktivační GTPáza pro proteiny rodiny Rab, které se účastní organizace cytoskeletu (Sano *et al.*, 2003). Dále Akt aktivuje enzym 6-fosfofrukto-2-kinázu, která se

účastní regulace glykolýzy (Deprez *et al.*, 1997). Zároveň Akt také stimuluje produkci proteinů aktivací mTOR komplexu (Scott *et al.*, 1998).

Druhou hlavní inzulínem aktivovanou signální dráhou je mitogenem aktivovaná proteinkinázová dráha (MAPK). Inzulín stimuluje autofosforylaci receptoru a následnou asociaci a fosforylaci IRS1 či Shc. S těmito proteiny následně pomocí SH2 domén interaguje adaptorový „growth factor receptor-bound protein 2“ (Grb2) (Skolnik *et al.*, 1993). Grb2 je adaptorovým proteinem pro „son of sevenless“ (SoS) protein, který následně aktivuje Ras protein (Baltensperger *et al.*, 1993; Medema *et al.*, 1993). Ras dále aktivuje kinázu Raf-1, která následně spouští fosforylační kaskádu vedoucí k aktivaci MAPK především kinázy ERK1 a ERK2 (Kovacina *et al.*, 1990). Inzulínem stimulovaná MAPK dráha vede k regulaci genové exprese, buněčnému růstu, proliferaci či diferenciaci (Kim & Kahn, 1997; Buscà *et al.*, 2016).



Obr. 9: Základní signální dráhy inzulínu. Po vazbě inzulínu na receptor dochází k autofosforylaci receptoru a jeho aktivaci (1). Následují fosforylační kaskády, prvním členem je IRS (2). Dále se signalizace dělí na dvě hlavní dráhy: PI3K a MAPK dráha. IRS1 asociuje s PI3K (3), která vytváří PIP₃, což aktivuje PDK1 a následně Akt (4). Akt má mnoho substrátů, například GSK3 (6), která reguluje syntézu glykogenu. Dalším je protein AS160 regulující transport Glut4 na membránu a zajišťuje větší vstřebávání glukózy do buňky (5). IRS1 také asociuje s Grb2 a Sos proteiny (8), které aktivují Ras a následně Raf. Kaskáda pokračuje až k MAPK, která může být transportována do jádra a regulovat genovou expresi (9). Převzato a přeloženo z (Tatulian, 2015).

3.5 IGF-1 receptor

Přestože má IGF-1 afinitu také k IR je primárním kontaktem s buňkou samostatný IGF-1 receptor (IGF-1R) (Hintz *et al.*, 1972; Marshall *et al.*, 1974). IGF-1R je stejně jako IR heterotetramer (homodimer) tvořen ze dvou α podjednotek, které jsou spojeny se dvěma β podjednotkami (Chernašek *et al.*, 1981). IR a IGF-1R jsou ze 60 % strukturně homologickými receptory. Největší podobnosti vykazují tyrozinkinázové domény obou receptorů, které dosahují homologii až 84 %. Nižší homologie je pozorovatelná u α podjednotek (64-67 % pro L1 a L2 domény a 48 % pro CR domény) (Ullrich *et al.*, 1986).

Gen pro IGF-1R se nachází na dlouhém rameni chromozomu 15, konkrétně byl lokalizován pruhem 15q26 (Ullrich *et al.*, 1986). „Knock-out“ tohoto genu u myší způsobuje letalitu (Liu *et al.*, 1993). U člověka byl zatím dokumentován pouze jediný případ homozygotní mutace v genu *IGF-1R* způsobující záměnu jedné aminokyseliny v IGF-1R (Gannagé-Yared *et al.*, 2013). Heterozygotní mutace způsobují závažnou intrauterinní i postnatální růstovou či mentální retardaci (Fang *et al.*, 2012). Proto se předpokládá, že závažné mutace v *IGF-1R* jsou letální také pro člověka. Gen *IGF-1R* je tvořen 22 exony. Avšak na rozdíl od IR, nemá IGF-1R sestřihové varianty v exonech 10 a 12 korespondujících s exonem 11 IR (Abbott *et al.*, 1992). IGF-1R je exprimován ve většině lidských tkání včetně rakovinných buněk. U některých rakovinných typů je IGF-1R dokonce nadprodukován oproti normální tkáni shrnuto v (Adams *et al.*, 2000).

3.5.1 Biosyntéza a struktura IGF-1R

Stejně jako IR je IGF-1R produkován jako prekurzor, který je během sekreční dráhy upravován proteolytickým štěpením a glykosylacemi, které mají zásadní vliv pro správnou maturaci receptoru (Jacobs *et al.*, 1983; Ullrich *et al.*, 1986; Growth *et al.*, 1996).

IGF-1R je tvořen dimerem $(\alpha\beta)_2$, který svou velikostí, složením domén i umístěním disulfidických můstků mezi podjednotkami odpovídá inzulinovému receptoru (Massague & Czech, 1982; Ullrich *et al.*, 1986). Extracelulární část je tedy složena od N-konce z domén: L1, CR, L1, FnIII-1, FnIII-2, ID α , α CT (α podjednotka); ID β , FnIII-2 a FnIII-3 (β podjednotka). Poté navazuje TM doména, intracelulárně JM a TK doména, která je zakončena β CT viz obr. 6 (A) (Ullrich *et al.*, 1986; Adams *et al.*, 2000). Tyrozinkinázová doména obsahuje konzervované fosforylovatelné tyrozinové zbytky Tyr1131, Tyr1135

a Tyr1136 (ekvivalentní s tyrozinovými zbytky Tyr1158, Tyr1162 a Tyr1163 IR) (Favelyukis *et al.*, 2001).

Díky homologii v primární struktuře obou receptorů je zřejmá podobnost i v kvartérní struktuře. IGF-1R se formuje do tvaru obráceného písmene V, avšak oproti IR jsou FnIII-3 domény monomerů v menší vzdálenosti a celá struktura IGF-1R ektodomény působí uzavřeněji (Xu *et al.*, 2018). To může být způsobeno rozdílným natočením L2 domény vůči L1, CR doménám (Lou *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2018). Zhang *et al.* navrhli, že se IGF-1R chová velice dynamicky a může nabývat více různých konformací bez navázaných ligandů (podobajících se obrácenému V), tak s navázanými ligandy (Zhang, Wei, *et al.*, 2022; Zhang, Wu, *et al.*, 2022). Další odlišnosti oproti IR se dají nalézt především v CR doméně IGF-1R, která nabízí negativně nabitý povrch pro vazbu pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků řetězce C a D IGF-1, IR obsahuje v této oblasti převážně pozitivně nabitě aminokyseliny (Zhang *et al.*, 1994; Lou *et al.*, 2006). Rozdíly v L1, CR a α CT doménách zajišťují specifitu IGF-1 k IGF-1R (Zhang *et al.*, 1994; Lou *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2018).

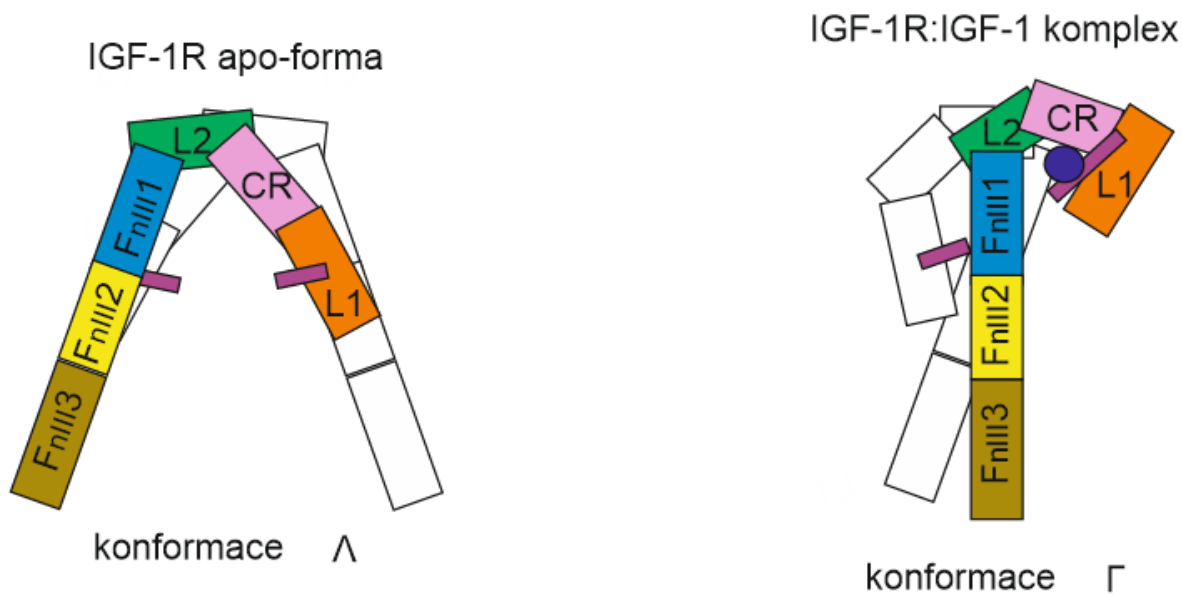
3.5.2 Vazba IGF-1 na IGF-1R a jeho aktivace

Analogicky k inzulinu se IGF-1 váže do primárního vazebného místa pomocí A a B řetězce, konkrétně jsou důležité Phe23, Tyr24, Val44, Tyr60 či Ala62 korespondující s důležitými aminokyselinovými zbytky inzulinu (Cascieri *et al.*, 1988; Shooter *et al.*, 1996). Primární vazebné místo IGF-1R zahrnuje L1, CR, FnIII-1' a α CT' domény (Xu *et al.*, 2018). Sekundární vazebné místo jako u IR nebylo pro vazbu IGF-1 rozřešeno (Li *et al.*, 2019). Dále byly identifikovány aminokyseliny Glu9, Asp12, Phe19, Leu54 či Glu58, které by měly odpovídat reziduíům vážícím se do sekundárního vazebného místa (analogicky k inzulinu a IR) (Gauguin *et al.*, 2008). Nicméně právě Glu58 je spíše součástí primárního vazebného místa IGF-1R (Xu *et al.*, 2018; Macháčková *et al.*, 2019). Na rozdíl od inzulinu, IGF-1 k vazbě na receptor přispívá také svými C a D řetězci, které v inzulinu nejsou přítomny (Bayne *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1994). Stejně jako u IR dochází při vazbě IGF-1 k remodelaci α CT domény, která následně odhaluje interakční partnery (Xu *et al.*, 2018). Mutagenní analýzy L1 a α CT domén IGF-1R potvrdily zapojení aminokyselinových zbytků ve vazbě IGF-1, které jsou ekvivalentní k těm zbytkům IR účastnících se ve vazbě inzulinu, avšak mutace těchto zbytků měly jiné důsledky. Například mutace na pozici kódující His697, který je ekvivalentní ke kruciálnímu His710 IR, způsobila pouze přibližně

pětinásobný rozdíl afinity. Oproti tomu mutace na pozici pro Phe701 IGF-1R vede k úplnému narušení vazby (Mynarcik *et al.*, 1997b; Whittaker *et al.*, 2001). Aminokyselinové zbytky dále od Val702 nebyly ve vztahu k vazbě experimentálně zkoumány (Mynarcik *et al.*, 1997b; Whittaker *et al.*, 2001). Strukturální studie navrhly dodatečně roli Arg704 (analogický k Arg717 IR), který by mohl interagovat právě se zmíněným Glu58 IGF-1 (Xu *et al.*, 2018; Macháčková *et al.*, 2019).

IGF-1R vykazuje efekt negativní kooperativity, protože pouze první ligand je vázán na receptor s vysokou afinitou. Na rozdíl od IR však nedochází ve vyšších koncentracích IGF-1 ke změně v disociaci ligandu (Christoffersen *et al.*, 1994).

Pro aktivaci IGF-1R je dostatečná vazba jedné molekuly IGF-1 (Kavran *et al.*, 2014). Vazba IGF-1 na receptor způsobuje změnu konformace, která vede k přiblížení a dimerizaci TK domén a jejich autofosforylaci (Kavran *et al.*, 2014; Cabail *et al.*, 2015). Při aktivaci jednou molekulou IGF-1 se receptor dostává ze struktury obráceného V do asymetrické struktury připomínající písmeno Γ . Tato konformace je stabilizována kontaktem domén L1', FnIII-2' druhého monomeru a α CT viz obr. 10 (Li *et al.*, 2019; Zhang, Wu, *et al.*, 2022). Přesto je možné, že vazba IGF-1 k receptoru je komplexnější a zahrnuje více dynamických strukturálních stavů (Zhang, Wei, *et al.*, 2022). Nově byly publikovány strukturální studie, které uvádí dvě molekuly IGF-1, či jeho analogy vázané na IGF-1R, avšak pravděpodobně reprezentují spíše neaktivní formu IGF-1R (Moreau *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2022). IGF-1R s mutací způsobující zánik disulfidických můstků v oblasti α CT mohou vytvářet strukturu tvaru T s dvěma navázanými molekulami IGF-1, která je podobná symetrické struktuře IR (Li, Wu, *et al.*, 2022).



Obr. 10: Schématické znázornění změny konformace po vazbě jedné molekuly IGF-1 na modelu receptorové ektodomény na základě strukturálních studií. IGF-1R se bez navázaného ligandu formuje do struktury obráceného V. Po vazbě IGF-1 konformace Γ . Označení domén na monomeru IGF-1R je stejné jako na obr. 6, vínový obdélník znázorňuje α CT doménu. Fialový kruh znázorňuje molekulu IGF-1.

3.5.3 Signalizace IGF-1R

Ačkoliv sdílí IGF-1R díky své strukturální homologii s IR i základní signalizační dráhy, jako jsou PI3K/Akt a MAPK dráhy (viz obr. 9), je účinek IGF-1 spíše mitogenní, než metabolický shrnuto v (Hakuno & Takahashi, 2018). Proteomická analýza ukázala obecně vyšší aktivaci signalizačních molekul ovlivňujících buněčný cyklus, dělení či diferenciaci ve srovnání s IR (Nagao *et al.*, 2021). Překvapivě je jednoduchá záměna leucinu 973 za fenylalanin, který se nachází v oblasti vazby IRS, dostačující ke změně signalizace typu IR na typ IGF-1R (Nagao *et al.*, 2022).

Například dlouhotrvající stimulace PI3K dráhy přímou vazbou PI3K na IGF-1R vede k buněčné proliferaci odblokováním přechodu buněčného cyklu z G₁ do S fáze (Fukushima *et al.*, 2012). Stimulace buněk pomocí IGF-1 zvyšuje expresi cyklinu D1, D3 a degradaci inhibitoru cyklin-D dependentní kinázy p27^{Kip1}, což napomáhá aktivaci cyklin dependentních kináz G₁ fáze a postupu v buněčném cyklu a zahájení replikace DNA (Fukushinish., 2008; Mairet-Coello *et al.*, 2009).

Další důležitou úlohou IGF-1R je ochrana buněk před apoptózou. IGF-1 se řadí mezi tzv. faktory přežívání buněk (Datta *et al.*, 1997). K tomu využívá preferenčně PI3K/Akt dráhu, ale proti-apoptotický efekt je umocněn i alternativními drahami jako například

MAPK dráhou, či přímou interakcí s proteinem 14-3-3 (Furlanetto *et al.*, 1997; Kulik *et al.*, 1997; Peruzzi *et al.*, 1999). IGF-1 aktivuje IGF-1R a spouští fosforylační kaskádu, která aktivuje protein Akt, jehož substrátem je pro-apoptotický protein Bcl-2 asociovaný agonista buněčné smrti (BAD). Akt fosforyluje BAD, čímž indukuje asociaci s proteinem 14-3-3 v komplex BAD/14-3-3 (Datta *et al.*, 1997). Tato asociace udržuje BAD v cytosolu a zamezuje jeho translokaci do mitochondriální membrány a interakci s pro-apoptotickými proteiny Bcl-2 a Bcl-X_L a spuštění apoptózy (Zha *et al.*, 1996).

3.6 Hybridní molekuly IR/IGF-1R

V neposlední řadě byly na buněčných membránách identifikovány hybridní molekuly tvořené heterodimerem IR/IGF-1R (Moxham *et al.*, 1989). Zároveň mohou tyto hybridní receptory vznikat také *in vitro* pokusech (Treadway *et al.*, 1989). Hybridní receptory jsou široce zastoupené v různých typech tkání včetně například placenty, svalů, ledvin a tukové tkáně (Baillyes *et al.*, 1997; Federici *et al.*, 1997). Hybridní IR/IGF-1R váží s vysokou afinitou IGF-1, inzulin je vázán slaběji (Soos *et al.*, 1993). Na základě zastoupení IR izoforem jsou formovány hybridní receptory IR-A/IGF-1R či IR-B/IGF-1R, které mají rozdílné vazebné i funkční vlastnosti (Pandini *et al.*, 2002). Interakce ligandů s IR a IGF-1R tak vytváří velice komplexní systém, který je složitě postihnutelný. Proto je fyziologická úloha a funkce hybridních receptorů stále nejasná.

4 Materiál

4.1 Chemický materiál

Název	Zkratka/Vzorec	Výrobce
2-mercaptoetanol		Sigma-Aldrich, Německo
3-[(3-cholamidopropyl)- dimethylammonio]-1-propansulfonát	CHAPS	Thermo Scientific™, USA
acetonitril	ACN	VWR Chemicals, USA
agaróza		Sigma-Aldrich, Německo
akrylamid		Carl Roth, Německo
amonium persulfát	APS	Sigma-Aldrich, Německo
ampholyte high resolution pH 3-10		Sigma-Aldrich, Německo
bis-akrylamid		Sigma-Aldrich, Německo
bromfenolová modř		Lachema, Česká republika
deoxyribonukleosidtrifosfáty	dNTP	New England BioLabs, USA
dithiotreitol	DTT	Sigma-Aldrich, Německo
dodecylsírán sodný	SDS	Sigma-Aldrich, Německo
ektodoména lidského IR-A s mCherry		připraveno Mgr. Kateřinou Macháčkovou, Ph.D.
etanol		Penta, Česká republika
fetální hovězí sérum	FBS	BioSera, Francie
fluorid sodný	NaF	Lachema, Česká republika
Gel Loading Dye Purple (6×)		New England BioLabs, USA
glycerol		Penta, Česká republika
glycin		Sigma-Aldrich, Německo
heptahydrát síranu hořečnatého	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	Sigma-Aldrich, Německo
hovězí sérový albumin	BSA	Invitrogen, USA
hydroxid sodný	NaOH	Lach-Ner, Česká republika
chlorid nikelnatý	NiCl ₂	Lachema, Česká republika
chlorid sodný	NaCl	Lach-Ner, Česká republika
imidazol		Sigma-Aldrich, Německo

inhibitory proteáz – Proteas Inhibitor Coctail (P8340)		Sigma-Aldrich, Německo
Kolliphor P188		Sigma-Aldrich, Německo
kyselina boritá	H ₃ BO ₃	Sigma-Aldrich, Německo
kyselina etylendiamintetraoctová	EDTA	Sigma-Aldrich, Německo
kyselina chlorovodíková	HCl	Lach-Ner, Česká republika
LB Broth		Sigma-Aldrich, Německo
L-glutamin 100×		BioSera, Francie
Lipofectamine™ 2000 Transfect reagent		Thermo Scientific™, USA
metanol		Lach-Ner, Česká republika
Milli-Q® voda		
močovina		Sigma-Aldrich, Německo
N, N, N', N' – Tetrametyl- etylenediamine	TEMED	Sigma-Aldrich, Německo
N-2-hydroxyetylpiiperazin-N'-2- etansulfonová kyselina	HEPES	Sigma-Aldrich, Německo
neutravidin		Thermo Scientific™, USA
octan sodný	NaAc	Lachema, Česká republika
orthovanadičnan sodný	Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, Německo
peqGREEN DNA/RNA dye		VWR Chemicals, USA
polyetylenimin	PEI	Polysciences, USA
sušené odtučněné mléko		NutriStar, Česká republika
thiomočovina		Sigma-Aldrich, Německo
Trizma® Base	Tris	Sigma-Aldrich, Německo
Tween-20		Sigma-Aldrich, Německo

4.2 Ligandy

Název	Výrobce
lidský IGF-1	Tercica, USA
lidský IGF-1 značený radioizotopem ¹²⁵ I	připraveno skupinou Aleše Marka (UOCHB AV ČR) dle (Asai <i>et al.</i> , 2021)

lidský inzulin (HI)	Novo Nordisk, Dánsko
lidský inzulin značený radioizotopem ¹²⁵ I	připraveno skupinou Aleše Marka (UOCHB AV ČR) dle (Asai <i>et al.</i> , 2021)

4.3 Roztoky a pufrы

4.3.1 Připravované roztoky a pufrы

Název	Složení
10× elektroforetický pufr na SDS-PAGE	0,25 M Tris; 0,192 M glycin; 0,01 % SDS (w/V)
20× TAE pufr	0,8 M Tris, 4 % 0,5 M EDTA (V/V), 2,28 % (V/V) kyselina octová
30 % akrylamidový mix	29,2 % akrylamid (w/V); 0,8 % bis-akrylamid (w/V)
borátový pufr	50 mM kyselina boritá, pH 9,5 NaOH
eluční pufr na afinitní chromatografii	50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 0,25 M Imidazol, pH 8,0
HBB pufr	100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM MgSO ₄ ·7 H ₂ O; 1 mM EDTA, 10 mM glukosa, 15 mM NaAc, 1 % BSA (Sigma-Aldrich, Německo), pH 7,6
promývací pufr na afinitní chromatografii	50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, pH 8,0
pufr pro separační polyakrylamidový gel	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
pufr pro zaostřovací polyakrylamidový gel	1 M Tris/HCl, pH 6,8
rehydratační lyzační pufr (RLB)	7 M močovina, 2 M thiomočovina, 4 % CHAPS (w/V), 0,8 % amfoliny (V/V)
TBS pufr	20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 140 mM NaCl
transferový pufr na SDS-PAGE	20 mM Tris, 189 mM glycin, 10 % metanol (V/V), 0,1 % SDS (w/V)
T-TBS pufr	20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 140 mM NaCl, 0,1 % Tween-20 (V/V)

vzorkový (lyzační) pufr	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 Na ₃ VO ₄ , 0,5 % inhibitory proteáz
-------------------------	--

4.3.2 Komerční roztoky a pufr

Název	Složení	Výrobce
fosfátový pufr (PBS)	pH 7,4	Gibco™, USA
fyzilogický roztok	0,9 % NaCl	B.Braun, Německo
SuperSignal™ West Femto	výrobce neuvádí	Thermo Scientific™, USA
Trypan Blue		
Trypsin-EDTA 1× in PBS		BioSera, Francie
4× Laemmlí sample buffer	32,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % glycerol, 1 % SDS, 0,005 % bromfenolová modř	Bio-Rad, USA
5× Phusion® HF buffer	výrobce neuvádí	New England Biolabs, USA
10× FastDigest™ Green Buffer	výrobce neuvádí	Thermo Scientific™, USA
10× T4 ligase buffer	400 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5mM ATP, pH 7,8	Thermo Scientific™, USA
Casein Buffer Concentrate	5,5 % (w/V) casein – biotin and IgG free	SDT GmbH, Německo
His-Select® Nickel Affinity gel	výrobce neuvádí	Sigma-Aldrich, Německo

4.4 Enzymy

Název	Koncentrace	Výrobce
BamHI	10 U/μl	Thermo Scientific™, USA
FastDigest™ DpnI	výrobce neuvádí	Thermo Scientific™, USA
FastDigest™ HindIII	výrobce neuvádí	Thermo Scientific™, USA

Phusion® High-fidelity DNA Polymerase	2 U/μl	New England BioLabs, USA
T4 DNA ligase	5 U/μl	Thermo Scientific™, USA

4.5 Antibiotika

Název	Výrobce
amplicilin	Duchefa Biochemie, Nizozemsko
kanamycin	Sigma-Aldrich, Německo
Penicillin-Streptomycin Solution 100×	BioSera, Francie

4.6 Protilátky

Detekovaný protein	Název a výrobce	Ředění	Organismus původu	Oblast Mr [kDa]
Primární protilátky				
Aktin	Anti-Actin (20-33) antibody produced in rabbit; Sigma-Aldrich, Německo	1:500	králík	42
β-podjednotka IGF-1R	IGF-1 Receptor beta (11A9) Rabbit mAb; Cell Signalling Technology, USA	1:1000	králík	95
β-podjednotka IR	Insulin Receptor beta (4B8) Rabbit mAb; Cell Signalling Technology, USA	1:1000	králík	95
α-podjednotka IGF-1R	IGF-1 Receptor alpha (D3A2W) Rabbit mAb; Cell Signalling Technology, USA	1:1000	králík	140

α -podjednotka IR	Ms mAb Anti-Hu IR (α -subunit); Life- Technologies Corporation, USA	1:500	myš	135
Fosforylovaná β -podjednotka IR a IGF-1R	P-IGF-1R beta (Y1135/1136)/InsR beta (19H7) Rabbit mAb; Cell Signalling Technology, USA	1:1000	králík	95

Sekundární protilátky

Protilátka proti primárním protilátkám králíčího původu	Anti-Rabbit IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in goat; Sigma-Aldrich, Německo	1:8000	koza	
Protilátka proti primárním protilátkám myšího původu	Anti-Mouse IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit; Sigma-Aldrich, Německo	1:2000	králík	

Syntetické protilátky

Název	Detekovaná struktura	Výrobce
iBodies [®] 4	His-tag	IOCB Tech, ČR (Šácha <i>et al.</i> , 2016)

4.7 Komerční kity

Název	Výrobce
ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, USA

Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymao Research, USA
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, Německo

4.8 Plazmidy

Plazmid	Selekce	Výrobce
pCMV3 nesoucí cDNA pro lidský IGF1 receptor s C-terminalním His-tag	kanamycin	Sino Biological, Čína
pCMV3 nesoucí cDNA pro lidský inzulinový receptor s C-terminalním His-tag	kanamycin	Sino Biological, Čína
pTT5SH8Q2_IR-A_ecto+mCherry vektor	ampicilin	NRC Biotechnology Research Institute, Kanada – upraveno přidáním mCherry sekvence Mgr. Kateřinou Macháčkovou, Ph.D. (nepublikováno)

4.9 Primery

Všechny oligonukletidové primery byly dodány firmami Generi Biotech, Česká republika či Sigma-Aldrich, Německo.

4.9.1 Mutageneze

Receptor	Pozice	Mutace	Orientace	Sekvence
IR-A	H710	A	přímý	GAGGATTACCTG GCCA ACGTGGTTTTTCG
IR-A	H710	A	zpětný	CGAAAACCACGTT GGCC AGGTAATCCT
IR-A	R717	A	přímý	GAGATGG TGCG GGGACGAAAAC
IR-A	R717	A	zpětný	GTTTTTCGTCCCC GCA CCATCTC
IR-A	R717	Q	přímý	GAGATGG CTG GGGACGAAAAC
IR-A	R717	Q	zpětný	GTTTTTCGTCCCC CAG CCATCTC
IR-A	R717	F	přímý	CGAGATGG GAA GGGACGAAAAC
IR-A	R717	F	zpětný	GTTTTTCGTCCCC TTC CCATCTCG

IR-A	R717	K	přímý	CGAGATGGCT TT GGGGACGAAAAC
IR-A	R717	K	zpětný	GTTTTTCGTCCCC AAG CCATCTCG
IGF-1R	H697	A	přímý	GAGAATTTCTCTG GCCA ACTCCATCTTCG
IGF-1R	H697	A	zpětný	CGAAGATGGAGTT GGC CAGGAAATTCTC
IGF-1R	R704	A	přímý	GCTTCCTTTCAGGT TGCG GGGCAC
IGF-1R	R704	A	zpětný	GTGCCC GCA CCTGAAAGGAAGC

4.9.2 Klonování

Popis	Orientace	Sekvence
IGF-1R (1-932) s nástavcem pro HindIII	přímý	AAAAAGCTTACCATGAAGTCTGGCTCCGGAGGAGGGTC
IGF-1R (1-932) s nástavcem pro Bsp119I	zpětný	TTTTTCGAAGTTTTTCATATCCTGTTTTGGCCTGGACATAGAAGAACAC
IR (1-944) s nástavcem pro HindIII	přímý	AAAAAGCTTACCATGGCCACCGGGGGCCGGCGGGGGGC
IR (1-944) s nástavcem pro Bsp119I	zpětný	TTTTTCGAAGTTTTTTGCAATATTTGACGGGACGTCTAAATAGTCTGT

4.9.3 Sekvenování

Popis	Sekvence
sekvenační primer pro ověření mutací v IR-A	GGATCCAATCTCAGTGTC
sekvenační primer pro ověření mutací v IGF-1R	AGGCTGTGACCCTCACCATG

4.10 Hmotnostní markery



Název

Výrobce

(A) 1 kb DNA Ladder

New England BioLabs, USA

(B) Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

Bio-Rad, USA

4.11 Živná a kultivační média

Název	Popis	Výrobce
DMEM	základní médium pro kultivaci R- buněk	Biosera, Francie
OPTI-MEM™	médium pro transfekci R- buněk	Gibco, USA
Freestyle™ F17 Expression medium	základní médium pro kultivaci Hek293-6E buněk	Gibco, USA
LB	médium pro kultivaci bakteriálního kmene <i>E. coli</i> TOP10	Sigma-Aldrich, Německo

4.12 Bakteriální kmeny

Název

Zdroj

Kompetentní bakteriální kmen *E. Coli* TOP10

Biotechnologický ústav AV ČR, ČR

4.13 Buněčné kultury

Název	Popis
R-	myší embryonální fibroblasty odvozeny od myší s disrupcí genu pro IGF-1 receptor dle (Sell <i>et al.</i> , 1993), darováno laboratoří prof. Basergy, USA
Hek293-6E	lidské embryonální ledvinné buňky se stabilní expresí EBNA1 proteinu; NRC Biotechnology Research Institute, Kanada

5 Metody

5.1 Práce s DNA

5.1.1 Místně specifická mutagenese pomocí PCR reakce

Pro vnesení „missense“ mutací byla využita místně specifická mutagenese, která je založena na principu PCR s primery obsahujícími požadovanou mutaci uprostřed jejich sekvence. Oba primery jsou komplementární ke stejné sekvenci na DNA. Takto byly připraveny mutace v sekvenci DNA kódující konkrétní aminokyselinu, tak aby došlo k záměně za jinou aminokyselinu konkrétně: IGF-1R H697A a IGF-1R R704A, respektive IR-A H710A, R717A, R717F, R717Q a R717K dle primerů (viz 4.9).

Byla smíchána PCR směs o složení viz tab. 1. Jako templát pro reakci byly použity expresní vektory pCMV3 nesoucí cDNA pro IGF-1 či inzulinový receptor.

Tab. 1: Složení PCR reakce místně specifické mutagenese

	V [μ l]
5× Phusion® HF buffer	10
10 mM dNTPs	1
10 μ M primer 1 přímý	2
10 μ M primer 2 zpětný	2
templátová DNA (100 ng)	1-2 (v závislosti na koncentraci templátu)
2 U/ μ l Phusion® High-fidelity DNA Polymerase	0,5
Sterilní MilliQ® voda	do celkového objemu 50 μ l
Celkový objem	50

Po přidání všech složek byla směs opatrně promíchána pipetou. Reakce proběhla dle zvoleného programu viz tab. 2 v termocykleru PCR Sprint (Thermo Scientific™ Hybaid, USA).

Tab. 2: Program PCR reakce místně specifické mutagenese

Krok	Teplota	Čas	Počet opakování
počáteční denaturace	98 °C	30 s	1×
denaturace	98 °C	10 s	20×
nasednutí primerů	55-60 °C (tab. 3)	20 s	
syntéza DNA	72 °C	6 min	
závěrečná syntéza DNA	72 °C	7 min	1×
	4 °C	do odvolání	1×

Tab. 3: Teploty nasedání primerů pro mutagenese

Dvojice primerů pro mutagenese	Teplota nasedání primerů
IGF-1R H697A	55 °C
IGF-1R R704A	60 °C
IR-A H710A	55 °C
IR-A R717A	55 °C
IR-A R717Q	55 °C
IR-A R717F	55 °C
IR-A R717K	55 °C

Po proběhnutí reakce byl přidán 1 µl enzymu DPNI, aby došlo k degradaci původního templátu a zachování pouze amplifikátu s mutací. Reakce byla inkubována 1 h při 37 °C. Takto připravenou plazmidovou DNA byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* TOP10 (viz 5.1.4) a izolovaný produkt (viz 5.1.5) byl sekvenován (Eurofins Genomics, Německo), aby byla potvrzena mutace na požadované pozici (viz 5.1.6).

5.1.2 Příprava plazmidových konstruktů receptorových ektodomén

Mutantní varianty receptorů byly využity pro tvorbu fúzních proteinů receptorových ektodomén s fluorescenčním proteinem mCherry a His-tagem na C-konci proteinů. Sekvence pro receptorové ektodomény byla vložena do expresního veku pTT5SH8Q. Po inzerci fragmentu kódujícím receptorové ektodomény, jsou tyto sekvence obklopeny z 5' konce sekvencí pro sekreční signál a na 3' konci pro fluorescenční protein

mCherry s následnou His-tag sekvencí. Exprimované fúzní proteiny tedy obsahují sekreční signál na N-konci a mCherry s His-tagem na C-konci proteinů.

Sekvence kódující ektodomény receptorů byly amplifikovány pomocí PCR reakce za použití primerů obsahujících adaptor se sekvencemi rozeznávanými restriktivními endonukleázami HindIII na 5' konci a Bsp119I na 3' konci amplifikované sekvence. Jako templát byly použity plazmidy připravené místně specifickou mutagenezí (viz 5.1.1).

Tab. 4: Složení PCR reakce pro amplifikaci sekvence receptorových ektodomén

	V [μ l]
5× Phusion® HF buffer (pro IGF-1R)/GC buffer (pro IR)	10
10 mM dNTPs	1
10 μ M primer 1 „přímý“	2,5
10 μ M primer 2 „zpětný“	2,5
templátová DNA (100 ng)	1-2 (v závislosti na koncentraci templátu)
2 U/ μ l Phusion® High-fidelity DNA Polymerase	0,5
Sterilní MilliQ® voda	do celkového objemu 50 μ l
Celkový objem	50

PCR reakce běžela dle nastaveného programu viz tab. 5.

Tab. 5: Program PCR reakce pro amplifikaci sekvencí receptorových ektodomén

Krok	Teplota	Čas	Počet opakování
počáteční denaturace	98 °C	30 s	1×
denaturace	98 °C	10 s	30×
nasednutí primerů (IR/IGF-1R)	64/50 °C	20 s	
syntéza DNA	72 °C	3 min	
závěrečná syntéza DNA	72 °C	7 min	1×
	4 °C	do odvolání	1×

Po PCR reakci byl odebrán kontrolní vzorek na agarózovou DNA elektroforézu (viz 5.1.3). Následně byla PCR směs přečištěna pomocí GeneJet PCR Purification Kit dle přiloženého návodu a eluována do objemu 10 μ l.

Dále byla připravena štěpná reakce za použití restrikčních endonukleáz HindIII a Bsp119I o složení viz tab. 6, aby vznikly shodné kohezní konce inzertu a vektoru. Jako inzert byla použita DNA amplifikovaná PCR reakcí v přechozím kroku, jako vektor byl použit expresní vektor pTT5SH8Q2_IR-A_ecto+mCherry, ze kterého byl reakcí vyštěpen původní gen pro IR-A.

Tab. 6: Složení štěpné směsi s restrikčními endonukleázami

	V [μ l]	V [μ l]
	inzert	vektor (500 ng/ μ l)
10× FastDigest™ Green Buffer	2	2
FastDigest™ Bsp119I	1	1
FastDigest™ HindIII	1	1
DNA	10	1
Sterilní MilliQ® voda	6	15
Celkový objem	20	20

Po štěpné reakci byla provedena agarózová elektroforéza (viz 5.1.3) pro kontrolu velikosti fragmentů. Požadované proužky na gelu byly vyříznuty skalpelem a přeneseny do mikrozkuumavky (přibližně 3000 bp pro inzert a 5000 bp pro vektor). Pro izolaci DNA z gelu byl použit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit dle pokynů výrobce. Nakonec byla stanovena koncentrace DNA ve vzorku na přístroji NanoDrop™ One^C (Thermo Fisher Scientific, USA) (viz 5.1.5).

Poté byla připravena ligační směs, poměr množství použité DNA vektoru a inzertu byl 1:3, tedy bylo použito 100 ng vektoru a 300 ng inzertu viz tab. 7. Reakce byla inkubována přes noc při 16 °C.

Tab. 7: Složení ligační směsi

	V [μl]
10× T4 ligase buffer	2
vektor	100 ng
inzert	300 ng
5 U/μl T4 ligase	0,5
Sterilní MilliQ® voda	do celkového objemu 20 μl
Celkem	20

Směs byla přenesena do bakteriální suspenze a byla provedena transformace pomocí teplotního šoku (viz 5.1.4). Z narostlých kolonií byla izolována plazmidová DNA (viz 5.1.5). Pro kontrolu úspěšnosti ligace byla provedena štěpná reakce v polovičním objemu reakce popsané v tab. 6 a vyhodnocena na agarózové DNA elektroforéze. Pokud ligace proběhla, došlo ke zpětnému vyštěpení fragmentu inzertu. Úspěšnost ligace inzertu a vektoru byla ověřena také sekvenací.

5.1.3 Agarózová DNA elektroforéza

Pro analýzu DNA byla použita agarózová elektroforéza o koncentraci agarózy 1 %. Agaróza byla teplem rozpouštěna v 1× TAE pufru (1 g rozpuštěn ve 100 ml 1× TAE pufru), následně byla směs zchlazena a nalita do připravené elektroforezické vany do výšky přibližně 1 cm. Pro vizualizaci DNA bylo přidáno 40 μl peqGREEN DNA/RNA dye (20× ředěný) a byl vsazen plastový hřebínek. Po ztuhnutí gelu byla vana přemístěna do elektroforetického aparátu (Bio-Rad, USA), zalita 1× TAE puftrem a byl vytažen hřebínek. Vzorky DNA byly smíchány s nanášecí barvou (využíváno 10x FastDigest™ Green Buffer) a nanášeny společně s hmotnostním DNA markerem 1 kb DNA Ladder v nanášecí barvě v 1× Gel Loading Dye Purple. Separace probíhala po zapojení do zdroje (Bio-Rad, USA) při konstantním napětí 100 V po dobu 30 min. DNA v gelu byla vizualizována pod UV světlem pomocí přístroje CCD camera ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, USA) a programu Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA).

5.1.4 Transformace bakterií pomocí teplotního šoku

Pro amplifikaci plazmidových DNA byla využita transformace bakterií teplotním šokem.

Na ledu bylo rozmrazeno 50 μ l kompetentních bakterií *E. coli* TOP10. K bakteriální suspenzi bylo sterilně přidáno 5 μ l DNA z PCR reakce po rozštěpení DPNI. Směs byla inkubována v ledu 45 min v lednici při 4 °C. Poté byla bakteriální suspenze inkubována v termobloku (Biosan, Lotyšsko) 90 s při teplotě 42 °C. Směs byla okamžitě zchlazena na ledu po dobu 2 min. Sterilně bylo přidáno 950 μ l LB média. Suspenze byla inkubována 2 h za stálého třepání v termobloku při teplotě 37 °C.

Suspenze byla centrifugována 3 min při 4301 rcf v centrifuze MiniSpin® Plus (Eppendorf, Německo). Po stočení bylo odebráno 700 μ l média a bakterie byly resuspendovány ve zbylých 300 μ l LB média. Bakterie byly vysévány na agarózové plotny s příslušným selekčním antibiotikem. Plotny byly připravované v laboratoři přípravy médií na UOCHB AV ČR. Bakterie na plotnách byly inkubovány 16-20 hodin při 37 °C v inkubátoru (Memmert, Německo).

5.1.5 Izolace plazmidové DNA z bakterií a stanovení koncentrace DNA

Pokud došlo k nárůstu bakteriálních kolonií na agarózových plotnách, byly bakterie rozmnoženy do většího počtu. Bylo použito 5 ml LB média s příslušným selekčním antibiotikem (kanamycin pro plazmidy odvozeny od pCMV3 vektoru, či ampicilin pro plazmidy odvozeny od pTT5SH8Q2 v ředění antibiotik 1:1000) v 15 ml sterilních plastových zkumavkách. Bakteriální kolonie byla špičkou seškrábnuta z plotny a přidána do LB média. Směs byla inkubována 16-20 h při 37 °C v třepačce MaxQ™ 4000 (Thermo Fisher Scientific, USA) při maximální rychlosti.

Suspenze byla centrifugována 2 min při 5104 rcf v centrifuze CR3i (Jouan SA, Francie) a pokojové teplotě. Supernatant byl vylit a následná izolace probíhala podle manuálu komerční sady ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit. Eluce proběhla do konečného objemu 25 μ l elučního pufru.

Pro větší výtěžky plazmidové DNA byla provedena izolace ze 100 ml narostlé bakteriální kultury komerční sadou NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel, Německo) dle přiloženého návodu.

Stanovení koncentrace bylo prováděno pomocí spektrofotometrického měření 1 μ l vzorku na přístroji NanoDrop™ One^c (Thermo Fisher Scientific, USA).

5.1.6 Sekvenace

Pro účely stanovení mutace v plazmidu byla prováděna sekvenace. Bylo smícháno 5 μ l vzorku DNA o koncentraci 80-100 ng/ μ l s 5 μ l 5 μ M sekvenačního primeru dle požadavků firmy. Sekvenační primery byly zvoleny, tak aby byly komplementární s nukleotidovou sekvencí genu pro IR-A či IGF-1R ve vzdálenosti alespoň 350 bp před místem vložení mutace. Vzorky byly označeny čárovým kódem a odeslány na analýzu firmou Eurofins Genomics (Německo), která provedla sekvenaci Sangerovou metodou. Výsledek sekvenace byl vyhodnocen srovnáním s „wildtype“ (dále jen WT) sekvencí programem SeqBuilder Pro (DNASTar, USA).

5.2 Práce s buněčnými kulturami

Pro transientní expresi celkového IGF-1R/IR-A a jejich mutantních variant byly využity myší embryonální fibroblasty, které byly odvozeny z myší s disrupcí genu kódujícího IGF-1R tzv. R- buňky (Liu *et al.*, 1993; Sell *et al.*, 1993). Zároveň mají tyto buňky relativně nízkou expresi myšího inzulinového receptoru, a to přibližně 5×10^3 receptorů na buňku. Oproti tomu produkce lidského inzulinového receptoru po transfekci expresním vektorem pNTK2 je přibližně o dva řády vyšší (Sciacca *et al.*, 2010). Na transfekci buněk byl použit expresní vektor pCMV3 s cDNA pro IGF-1R/IR-A a jejich mutantních variant IGF-1R H697A a R704A či IR-A H710A, R717A, R717Q, R717F a R717K.

Produkce receptorových ektodomén probíhala v buněčné linii lidských embryonálních ledvinných buněk Hek293-6E, které byly transfekovány expresním vektorem pTT5SH8Q2 nesoucím cDNA pro WT a mutantní varianty IGF-1R/IR-A ektodomény s mCherry a C-terminálním His-tagem. Díky sekreční signální sekvenci na N-konci ektodomén, docházelo k sekreci proteinů do média.

5.2.1 R- buňky - kultivace a pasážování

R- buňky byly kultivovány v CO₂ inkubátoru (Panasonic, Japonsko) ve vlhku při 37 °C, 5 % CO₂ v kultivačním médiu DMEM s 10 % FBS (V/V), 2 mM L-glutaminem a 1 % směsi antibiotik penicillin-streptomycin (V/V) v 15 ml kultivačního média v kultivační lahvi s plochou 75 cm² (TPP, Švýcarsko).

Pro snížení počtu buněk, tzv. pasážování, bylo odebráno médium, buňky byly opláchnuty 8 ml bez-sérového DMEM média. Dále bylo přidáno 2,5 ml Trypsinu, buňky byly inkubovány přibližně 2 min v inkubátoru při 37 °C. Po odloupení buněk od podkladu bylo přidáno 12,5 ml kultivačního sérového DMEM média. Buňky byly resuspendovány pipetou a převedeny do 50 ml plastové zkumavky. Bylo odebráno 100 µl ze suspenze a naneseno do počítací Bürkerovy komůrky. Buňky byly spočítány. Požadované množství buněk bylo centrifugováno při laboratorní teplotě a 244 rcf v centrifuze Rotofix 32 A (Hettich, Německo). Bylo nasazováno 400 tisíc buněk na dva dny a 200 tisíc buněk na tři dny do 15 ml média na kultivační lahev. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 1 ml sérového média a převedeny do celkového objemu 15 ml v kultivační lahvi.

5.2.2 Tranzientní transfekce R- buněk

Do každé jamky 24jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) bylo přidáno 200 µl kultivačního DMEM média se sérem a 20 tisíc buněk ve 100 µl. Buňky byly inkubovány do druhého dne v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂.

Před transfekcí byly buňky zbaveny sérového média a byly opláchnuty 300 µl bez-sérového DMEM média. Na transfekci v každé jamce bylo použito 250 ng plazmidové DNA nesoucí gen pro IGF1R/IR-A a jejich mutantní varianty a 0,75 µl Lipofectaminu™. Transfekční činidlo bylo smícháno s 50 µl na jamku OPTI-MEM™ média, zvláště byla stejným způsobem smíchána plazmidová DNA s OPTI-MEM™ médiem. Směs byla inkubována po dobu 5 min. Následně bylo smícháno transfekční činidlo s DNA v poměru 1:1 v objemu 100 µl na jamku, směs byla inkubována 20 min při laboratorní teplotě. Na buňky bez média bylo po kapkách přidáno 100 µl směsi DNA s Lipofectaminem™ do každé jamky. Buňky byly inkubovány 1 h při 37 °C. Po hodině bylo přidáno 100 µl na jamku sérového DMEM média bez antibiotik a buňky byly dále inkubovány při teplotě 37 °C a 5 % CO₂.

Pro analýzu úspěšnosti transfekce byla provedena denaturační proteinová elektroforéza SDS-PAGE a imunochemická detekce metodou Western Blot (viz 5.3.1 a 5.3.2). Pro specifickou detekci receptorů byly použity primární protilátky proti β-podjednotce IGF-1R či IR-A, jako kontrolní byly použity protilátky proti aktinu.

5.2.3 Hek293-6E buňky – kultivace a pasážování

Buňky Hek293-6E byly kultivovány suspenzně v Corning® Erlenmeyerově baňce s filtrem (Corning, USA) ve vlhku v inkubátoru (Panasonic, Japonsko) při 37 °C, 5 % CO₂ za stálého míchání na třepačce (Thermo Scientific™, USA) při 120 rpm. Pro kultivaci bylo použito F17 médium s 4 mM L-glutaminem a 0,1 % Kolliphoru (V/V).

Bylo smícháno 50 µl buněčné suspenze s 450 µl Trypanové modři v PBS a 100 µl směsi bylo přidáno do Bürkerovy komůrky. Buňky byly spočítány a převedeny v žádaném množství do nové baňky s F17 médiem v celkovém objemu 50 ml. Na dva dny bylo nasazováno 500 tisíc buněk na 1 ml média, na tři dny 250 tisíc buněk na 1 ml média. Buňky byly převážně inkubovány v objemu 50 ml.

5.2.4 Tranzientní transfekce Hek293-6E buněk

Na transfekci suspenzních Hek293-6E bylo použito 50 milionů buněk v koncentraci 1 milion buněk/ml F17 média.

Poměr přidávané plazmidové DNA a tranfekčního činidla PEI byl 1:4. Do 1 ml F17 média bylo přidáno nejprve čtyřnásobné množství PEI. Směs byla inkubována 5 min. Následně bylo přidáno 1 µg plazmidové DNA kódující IGF-1R/IR-As ektodoménu na 1 milion buněk. Následovala inkubace 20 min a poté byla transfekční směs nakapána na buňky, které byly v objemu 15 ml. Buňky byly inkubovány za stálého míchání 1 h při 37 °C, potom byl objem zvýšen dodáním F17 média na 25 ml. Následující den bylo přidáno F17 médium na konečný objem buněčné suspenze 50 ml. Transfekované buňky byly inkubovány na třepačce v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 5 dní.

Receptorové ektodomény fúzované s mCherry proteinem byly buňkami sekretovány do média.

Pro kontrolu transfekce proběhla analýza denaturační proteinovou elektroforézou SDS-PAGE a imunochemická detekce metodou Western Blot (viz 5.3.1 a 5.3.2). Na detekci receptorových ektodomén byly použity primární protilátky proti α-podjednotce IGF-1R či IR.

5.3 Práce s proteiny

5.3.1 Denaturační proteinová elektroforéza – SDS-PAGE

Příprava kontrolních vzorků z R⁻ buněk

Den po transfekci byly kontrolní R⁻ buňky lyzovány v 50 μ l RLB pufru. Před elektroforetickou analýzou bylo smícháno 8 μ l buněčného lyzátu s 4 μ l 4 \times Laemmli vzorkového pufru s 10 % 2-mercaptoetanolu (V/V). Vzorky byly denaturovány po dobu 2 min při 100 °C. Bylo nanášeno vždy 10 μ l vzorku.

Srážení proteinů acetonitrilem a příprava kontrolních vzorků z média Hek293-6E buněk

Odebraný supernatant po centrifugaci Hek293-6E buněk obsahoval médium se sekretovanými receptorovými ektodomény. Pro zakoncentrování proteinů bylo využito srážení proteinů acetonitrilem.

K supernatantu byl přidán 1 ml (2 \times odebrané množství supernatantu) acetonitrilu. Směs byla promíchána otočením mikrozkuhavky a byla inkubována 1 h v lednici při 4 °C. Následně byla směs centrifugována v centrifuze MiniSpin® Plus 5 min při 1374 rcf. Supernatant byl opatrně odstraněn a mikrozkuhavka byla vysušena na vzduchu od zbytků acetonitrilu. Pelet byl resuspendován v 20 μ l 1 \times Laemmli vzorkovém pufru s 2,5 % 2-mercaptoetanolu. Před nanášením byly vzorky denaturovány 2 min při 100 °C. Na elektroforézu bylo nanášeno 10 μ l vzorku.

Provedení SDS-PAGE

Pro separaci proteinů byl připraven polyakrylamidový gel v aparatuře (Bio-Rad USA) dle rozpisu viz tab. 8. Po nanesení separačního gelu mezi skla byl přidán 50% metanol, aby došlo k polymeraci s rovnou hladinou gelu. Po ztuhnutí gelu byl metanol vylit a vrchní hrana gelu byla vysušena filtračním papírem. Nakonec byl nanesen roztok pro zaostřovací gel dle rozpisu viz tab. 8, do kterého byl zasunut plastový hřeben vytvářející v gelu jamky. Roztok na gely polymeroval při laboratorní teplotě přibližně 30 min.

Tab. 8: Složení polyakrylamidového gelu

	separační gel (10 %)	zaostřovací gel (4 %)
MilliQ® voda	3 ml	1,35 ml
30% akrylamidový mix	2,5 ml	335 µl
Tris/HCl	1,9 ml (pH 8,8)	250 µl (pH 6,8)
10% SDS (V/V)	75 µl	20 µl
10% APS (w/V)	75 µl	20 µl
TEMED	3 µl	2 µl

Gely byly vsazeny do elektroforetické aparatury (Bio-Rad, USA) a byly zality po rysku 1× elektroforetickým pufrem. Z gelů byl vyňat hřebínek a byly nanесeny vzorky, jako marker molekulových vah byly použity 3 µl Precision Plus Protein™ Dual Color Standard. Aparatura byla zapojena do elektrického zdroje (Bio-Rad, USA). Separace proteinů probíhala za limitace elektrického proudu na hodnotu 12 mA/gel, počátečního napětí 100 V po dobu 10 min a následně se zvýšením proudu na 24 mA/gel a napětím na 200 V po dobu přibližně 1 hod.

5.3.2 Imunochemická detekce proteinů pomocí metody Western Blot

Po doběhnutí elektroforézy byly gely vyjmuty z aparatury a byla odstraněna zaostřovací část gelu. Gel s proteiny byl převeden do transferového pufru a byl inkubován po dobu alespoň 30 min při laboratorní teplotě na kývačce. Mezitím byla aktivována PVDF membrána Immobilon®-P (Merck, Německo) o požadované velikosti ponořením v metanolu po dobu 15 s a opláchnuta MilliQ® vodou. Poté byla membrána převedena do transferového pufru a inkubována alespoň 20 min.

Pro přenos proteinů na membránu byla použita metoda „semi-dry blot“. Byly nastříhány silné filtrační papíry (Bio-Rad, USA) o požadované velikosti a namočený v transferovém pufru a položeny do blotovací aparatury TransBlot® SD Transfer Cell (Bio-Rad, USA). Na nasáklý filtrační papír byla položena aktivovaná membrána a válečkem byly odstaněny vzduchové bubliny. Na membránu byl opatrně položen gel a na něj opět nasáklý filtrační papír. Na závěr byly opět odstraněny vzduchové bubliny, aby nebránily přenosu proteinů na membránu. Aparatura byla řádně uzavřena a zapojena do

elektrického zdroje. Přenos probíhal při konstantním napětí 12 V a elektrickém proudu 1,5 mA/1 cm² membrány po dobu 1,5-2 h.

Po doběhnutí transferu proteinů byl odstraněn horní filtrační papír i gel. Membrána s přenesenými proteiny byla podélně rozstříhnutá, tak aby se v rozmezí požadovaných molekulových hmotností vyskytoval protein zájmu. Následně byla membrána převedena do 5 % BSA rozpuštěného v T-TBS pufru a inkubována 1 h při laboratorní teplotě. Proužky membrán byly převedeny do primárních protilátek (konkrétní použité primární protilátky jsou uvedeny v kapitolách 5.2.2, 5.2.4 a 5.5), které byly ředěny v 5 % BSA v T-TBS. V primárních protilátkách byly membrány inkubovány přibližně 16 h v chladové místnosti při 5 °C na kývačce PSU-20i (Biosan, Lotyšsko).

Po inkubaci byly membrány promyty 3× po dobu 5 min v T-TBS pufru. Sekundární protilátky konjugované s křenuvou peroxidázou byly ředěny v 5% odtučněném sušeném mléce v T-TBS. Membrány byly převedeny do sekundárních protilátek a byly inkubovány 1 h při laboratorní teplotě. Poté byly membrány promyty 3× po dobu 5 min v T-TBS pufru. Nakonec byly ponechány v T-TBS pufru po dobu 10 min.

Pro vizualizaci proteinů na membráně byl použit chemiluminiscenční substrát SuperSignal™ West Femto. V mikroskopu byly smíchány roztoky „Stable peroxide buffer“ a „Luminol/Enhancer solution“ v poměru 1:1. Membrány byly položeny na skleněnou desku potaženou parafilmem a byly převrstveny směsí roztoků. Membrány byly inkubovány 2-3 minuty ve tmě. Membrány byly vloženy do plastové fólie a signál byl detekován přístrojem CCD camera ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad, USA) s programem Image Lab™ Software (Bio-Rad, USA).

5.3.3 Purifikace proteinů pomocí afinitní chromatografie

Díky His-tagu na C-konci receptorových ektodomén bylo možné purifikovat tyto proteiny z média transfekovaných Hek293-6E buněk pomocí afinitní chromatografie s matricí s nikelnatými ionty, které vyvazují histidiny v His-tagu.

Pět dní po transfekci Hek293-6E byly buňky převedeny do 50 ml plastové zkumavky a centrifugovány po dobu 5 min při 244 rcf v centrifuze Rotofix 32 A (Hettich, Německo), supernatant byl odebrán do čisté 50 ml plastové zkumavky a centrifugován dalších 5 min při 2706 rcf.

Mezitím byly 2 ml His-Select® Nickel Affinity gelu v 50 ml plastové zkumavce 2× promyty 4 ml Milli-Q® vody a následně 4× 4 ml promývacího pufru.

Po centrifugaci byl supernatant z buněk přidán k 2 ml His-Select® Nickel Affinity gelu a směs byla inkubována v chladové místnosti při teplotě 5 °C po dobu 1 h na kývačce Tube Roller (Benchmark Scientific, USA).

Po inkubaci byla směs postupně přidávána do plastové kolony. V koloně byl zachycen gel s navázaným proteinem zájmu, proteklý zbytek byl zachycen do plastové zkumavky a byl z něj odebrán 1 ml pro analýzu na SDS-PAGE dle postupu viz 5.3.1. Gel v koloně byl postupně promýván promývacím pufrem, aby byly odplaveny nespecificky navázané proteiny. Během promývání byly odebírány frakce po přidání 1. ml, 5. ml, 10. ml a 15. ml pufru. U všech frakcí byla změřena absorbance frakcí při vlnové délce 280 nm spektrofotometrem Lambda 25 UV/VIS Spectrophotometer (Perkin Elmer, USA), promývání gelu probíhalo, dokud nebyly hodnoty nízké a neměnné (do 15 ml). Pro odvázní požadovaného proteinu z matrice bylo přidáno přibližně 1,5 ml elučního pufru. Eluční pufr obsahuje 0,25 M imidazol, který vytěsňuje His-tag z vazby na matici. Všechny pufrы byly během afinitní chromatografie uchovávány na ledu a používány vychlazené, aby se zamezilo poškození proteinů. Gel s elučním pufrem byl v koloně inkubován na ledu po dobu 30 min. Byly jímány frakce při přidávání elučního pufru po objemech 1 ml, přičemž celkový objem přidaného elučního pufru dosahoval 5 ml. Opět byla změřena absorbance elučních frakcí při vlnové délce 280 nm spektrofotometrem. Pro další práci byly využity eluční frakce, které vykazovaly nejvyšší absorbanci při vlnové délce 280 nm.

Po dokončení afinitní chromatografie byl afinitní gel vyčištěn dle pokynů výrobce a uchován v 30% etanolu (V/V).

5.3.4 Dialýza

Po afinitní chromatografii byl vzorek s požadovaným proteinem v elučním pufru s imidazolem, který byl nežádoucí pro další použití proteinů. Imidazol byl z pufru odstraněn dialýzou, která funguje na principu prosté difúze a vyrovnání chemické koncentrace přes polopropustnou membránu.

Nejprve byla připravena dialyzační membrána, která byla namočena v Milli-Q® vodě. Poté byl jeden konec membrány přeložen a upevněn do svorky. Vybrané eluční frakce z afinitní chromatografie byly opatrně přidány dovnitř dialyzační membrány, tedy v konečném objemu 2 ml. Druhý konec membrány byl opět upevněn svorkou. Následně byla dialyzační membrána se vzorkem ponořena do 500 ml PBS a inkubována přes noc

v chladové místnosti při 5 °C za pomalého míchání magnetickým míchadlem. Nakonec byl vzorek převeden do mikrozkuhavky a uskladněn při teplotě -20 °C.

5.3.5 Stanovení koncentrace fúzních proteinů pomocí fluorescence

Pro stanovení koncentrace purifikovaných proteinů byla využita vlastnost fluorescence proteinu mCherry, který byl fúzován s receptorovými ektodomény.

Intenzita fluorescence byla měřena v 96jamkové černé destičce MaxiSorp (Thermo Scientific™, USA) v triplikátech v objemu 100 µl přístrojem Infinite® M100 (Tecan Systems, USA) při excitaci o vlnové délce 587 nm, emisi při vlnové délce 610 nm a nastavení parametrů „gain“ 120 a „z-position“ 20000 µl. Nejprve byla vytvořena kalibrační křivka pomocí intenzity fluorescence fúzního proteinu IR-A ektodomény s mCherry (připraveno Mgr. Kateřinou Macháčkovou, Ph.D.) o známé koncentraci 81 ng/µl. Intenzita fluorescence byla měřena pro koncentrace 81, 60, 40, 20, 10 a 0 ng/µl. Dle směrnice kalibrační křivky byla určena koncentrace purifikovaných receptorových ektodomén podle jejich intenzity fluorescence ve vzorku.

5.4 Saturační vazebné zkoušky

Aby bylo možné určit afinitu WT a mutantních celkových receptorů či jejich ektodomén k jejich ligandům, byly provedeny saturační zkoušky za použití radioaktivně značeného monojodovaného ¹²⁵I-inzulínu a ¹²⁵I-IGF-1. Radioaktivně značené molekuly inzulínu a IGF-1 byly připraveny laboratoří Aleše Marka na ÚOCHB dle (Asai *et al.*, 2021).

5.4.1 Saturační vazebná zkouška s celkovými receptory v R⁻ buňkách

Do 24jamkové destičky (TPP, Švýcarsko) bylo přidáno 20 tisíc R⁻ buněk na jamku. Buňky byly kultivovány do dalšího dne v sérovém médiu v objemu 300 µl. Po cca 24 h byly buňky transfekovány plazmidy kódujícími WT či mutantní IGF-1R a IR-A (viz 5.2.2). Transfekce jednotlivými plazmidy probíhala v duplikátu (dvě řady na destičce). Buňky byly po transfekci kultivovány v sérovém DMEM médiu bez antibiotik.

Po dalších 24 h bylo vyměněno médium za bez-sérové DMEM médium a buňky byly kultivovány 4-5 h. Živočišná séra obsahují růstové faktory jako například IGF-1 či IGF-2 (Honegger & Humbel, 1986). Přítomnost IGF-1 v kultivačním médiu bylo nežádoucí pro následnou saturační zkoušku, protože by obsazovalo vazebná místa na receptorech na povrchu buněčných membrán. Následně bylo z jamek s buňkami odsáto médium

a jamky byly promyty 300 μ l HBB pufru. Dále bylo přidáno dalších 300 μ l HBB pufru na jamku a destička byla inkubována mimo inkubátor při laboratorní teplotě po dobu 1 h.

Mezitím byly rozpuštěny ligandy (inzulín, IGF-1) značené radioizotopem 125 I v malém množství Milli-Q® vody (do 500 μ l). Do druhé mikrozkušavky byl ligand 10 \times naředěn. Do skleněných zkumavek bylo připraveno 5 μ l a 3 μ l neředěného a 10 \times ředěného radioaktivního ligandu v duplikátech. Obsah zkumavky byl změřen na přístroji Wizard 2470 Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer, USA). Na základě dosažených impulzů za minutu (*cpm*) byla určena průměrná hodnota *cpm* 10 \times naředěného a nenaředěného radioligandu. Díky tomu byl dopočítán objem radioligandu přidávaného do reakce, aby odpovídal koncentracím 0 nM; 0,05 nM; 0,2 nM; 0,5 nM; 1 nM a 3 nM, tyto koncentrace odpovídají konkrétním hodnotám *cpm* (viz tab. 9) dle vztahu:

$$c = \frac{1}{V} \cdot \frac{cpm}{SA}$$

Kde *c* = koncentrace; *cpm* = impulzy za minutu (z anglického „counts per minute“); *SA* = specifická aktivita radioligandu (2200 Ci/mmol); *V* = objem.

Tab. 9: Hodnoty *cpm* odpovídající koncentraci radioligandu v reakci

<i>c</i> [nM]	<i>cpm</i>
0	0
0,05	20024,4
0,2	80097,6
0,5	200244
1	400488
3	1201464

Po inkubaci byl pufr odsát. Do jamek byl nejprve pipetován HBB pufr, o takovém objemu, aby byl výsledný objem reakce 250 μ l. Do druhé řady transfekovaných buněk bylo přidáno do každé jamky 25 μ l neradioaktivního ligandu o konečné koncentraci inzulínu v reakci $1,72 \times 10^{-6}$ M a IGF-1 $1,31 \times 10^{-6}$ M. Nakonec byl do obou řad transfekovaných buněk přidán radioaktivní ligand o požadované koncentraci v reakci viz tab. 9. Příklad provedení pokusu je znázorněn na obr. 11.

	0 nM	0,05 nM	0,2 nM	0,5 nM	1 nM	3 nM
A	1 IR-A WT	2 IR-A WT	3 IR-A WT	4 IR-A WT	5 IR-A WT	6 IR-A WT
B	IR-A WT NSB	IR-A WT NSB	IR-A WT NSB	IR-A WT NSB	IR-A WT NSB	IR-A WT NSB
C	IR-A H710A	IR-A H710A	IR-A H710A	IR-A H710A	IR-A H710A	IR-A H710A
D	IR-A H710A NSB	IR-A H710A NSB	IR-A H710A NSB	IR-A H710A NSB	IR-A H710A NSB	IR-A H710A NSB

Obr. 11: Příklad provedení saturační zkoušky na 24jamkové destičce pro WT IR-A a mutantní variantu H717A IR-A. Zleva doprava byl přidáván radioaktivně značený ligand se zvyšující se koncentrací. Na druhý řádek byl přidáván neradioaktivní ligand na určení nespecifické vazby.

Pomocí nadbytku neradioaktivního ligandu v druhé řadě transfekovaných buněk je měřena tzv. nespecifická vazba (NSB). Neradioaktivní ligand vysytí vazebná místa receptorů, zbytek radioaktivity, který je naměřen odpovídá nespecifickému navázání radioaktivního ligandu na buňky či povrch destičky.

Buňky byly inkubovány 16 h v chladové místnosti o teplotě 5 °C za stálého míchání na kývačce PSU-20i (Biosan, Lotyšsko).

Po inkubaci byla vazebná směs odsáta a buňky byly 2× promyty 300 µl fyziologického roztoku. Nakonec bylo přidáno 300 µl 0,1 M NaOH a buňky byly inkubovány minimálně 15 min.

Obsah jamek byl převeden do skleněných zkumavek, jamky byly vypláchnuty dalšími 200 µl 0,1 M NaOH a přidány do zkumavky. Intenzita radioaktivity byla změřena na přístroji Wizard 2470 Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer, USA) po dobu 1 min. Výsledek byl vyhodnocen v programu GraphPad Prism (GraphPad Software, USA). Pro dosažení výsledků specifické vazby byly od hodnot vzorků odečteny hodnoty nespecifické vazby.

5.4.2 Saturační vazebná zkouška s receptorovými ektodomény

Saturační vazebná zkouška byla prováděna s purifikovanými WT či mutantními IGF-1R a IR-A ektodomény na adsorbční černé 96jamkové destičce MaxiSorp (Thermo Scientific™, USA) s využitím syntetických protilátek iBodies® proti His-tagu dle (Šácha *et al.*, 2016; Potalitsyn *et al.*, 2020).

Nejprve bylo naředěno 50 µl neutravidinu (5 ng/µl) v 10 ml borátového pufru (množství na jednu destičku). Do každé jamky bylo přidáno 100 µl, tedy 500 ng neutravidinu na jamku. Destička byla inkubována 1 h při laboratorní teplotě na kývačce. Následně byla destička 2× promyta 200 µl na jamku 1× TBS. Neobsazená místa na destičce byla zablokována přidáním 200 µl na jamku 10× ředěného kaseinového pufru v 1× TBS, destička byla inkubována 1 h za stejných podmínek. Poté byla destička 2× promyta 200 µl na jamku 1× TBS-0,05 % Tween 20.

Mezitím byly aktivovány syntetické protilátky iBodies® smícháním 10 µl 100 µM iBodies® s 10 µl NiCl₂ (poměr 1:1) na konečnou koncentraci 50 µM iBodies®. Nikl tvoří stabilní komplex s kyselinou nitrilotrioctovou ve struktuře iBodies®, díky čemuž se protilátky specificky vážou na polyhistidinový tag na C-konci receptorových ektodomén. Protilátky jsou konjugovány s biotinem, který se váže na adsorbovaný neutravidin na destičce. Aktivované iBodies® o objemu 20 µl byly naředěny v 10 ml 1× TBS-0,1 % Tween 20 (množství na jednu destičku) a přidány v objemu 100 µl na jamku a inkubovány na destičce po dobu 1 h za stejných podmínek. Destička byla 2× promyta 200 µl na jamku 1× TBS-0,05 % Tween 20.

Receptorové domény byly zředěny do celkového objemu 2,5 ml v TBS-0,1 % Tween 20. Na každou jamku bylo přidáno přibližně 300 ng receptorových ektodomén. Bylo přidáno 100 µl na jamku naředěných receptorových ektodomén, které byly inkubovány 2 h na kývačce při laboratorní teplotě. Proteiny byly nasazovány do dvou řad destičky, tedy 24 jamek na variantu receptorové ektodomény.

Po inkubaci byl obsah jamek převeden do plastové zkumavky. Radioaktivní ligandy byly rozpuštěny a změřeny jako v případě saturačních zkoušek s celkovými receptory (viz 5.4.1). Dle hodnot *cpm* byl dopočítán objem přidávaného radioaktivního ligandu (IGF-1 a inzulín) odpovídající koncentracím viz tab. 10.

Tab. 10: Hodnoty *cpm* odpovídající koncentraci radioligandu přidávaného do reakce

<i>c</i> [nM]	<i>cpm</i>
0	0
0,05	20024,4
0,1	40048,8
0,2	80097,6
0,3	120146,4
0,5	200244,0
0,7	280341,6
1	400488
2	800976
3	1201464
5	2002440

Do 96jamkové destičky s adsorbovanými receptorovými doménami byl postupně přidán HBB pufr tak, aby celkový objem na jamku odpovídal 100 μ l. Dále bylo přidáno 25 μ l neradioaktivního ligandu do každé jamky druhé řady s přidávanými ektodomény pro určení nespecifické vazby podobně jako dle schéma obr. 11. Nakonec byl přidán požadovaný objem radioaktivního ligandu z výpočtu dle *cpm* viz tab. 10. Takto připravené destičky byly inkubovány v chladové místnosti při 5 °C za stálého míchání na kývačce PSU-20i (Biosan, Lotyšsko) do druhého dne.

Druhý den byl odsát obsah jamek a destička byla promyta 2 \times 200 μ l 1 \times TBS. Dále bylo přidáno 200 μ l na jamku 0,1 M NaOH a destička byla inkubována minimálně 15 min při laboratorní teplotě. Obsah jamek byl převeden do skleněných zkumavek, do jamek bylo přidáno dalších 100 μ l 0,1 M NaOH a převedeno do odpovídajících skleněných zkumavek. Obsah zkumavek byl změřen na přístroji Wizard 2470 Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer, USA) po dobu 1 min. Výsledek byl vyhodnocen programem GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, USA). Od výsledných hodnot vzorků pouze s radioaktivním ligandem byly odečteny hodnoty vzorků nespecifické vazby pro získání hodnot specifické vazby ligandů.

5.5 Stimulační zkoušky

Díky stimulačním zkouškám je možné určit míru aktivace receptorů a jejich mutantních variant v buněčném kontextu. Při vazbě ligandu dochází ke změně

konformace IR i IGF-1R a k přiblížení tyrozin-kinázových domén a následné fosforylaci tyrozinových zbytků. Tuto fosforylaci lze detekovat metodou Western blot viz 5.3.2.

Na 24jamkovou destičku (TPP, Švýcarsko) bylo nasazeno 20 tisíc buněk na jamku, které byly následně transfekovány plazmidy kódujícími IR a IGF-1R a jejich varianty viz 5.2.2 v duplikátech. Den po transfekci bylo do každé jamky přidáno dalších 100 μ l kultivačního média bez antibiotik. Po 24 h bylo médium odstraněno a nahrazeno 300 μ l bez-sérového DMEM média a buňky byly kultivovány dalších 4-5 h.

Ze zásobních roztoků lidského IGF-1 a inzulínu byly naředěny roztoky v bez-sérovém DMEM médiu tak, aby koncentrace hormonů odpovídala 5×10^{-7} M. Buňkám na destičce bylo opět vyměněno médium za 300 μ l bez-sérového DMEM média. Na buňky v jedné jamce z duplikátu bylo přidáno 6 μ l naředěného hormonu, aby výsledná koncentrace IGF-1 a inzulínu v jamce byla 10 nM. Druhá jamka s buňkami nebyla stimulována, aby bylo možné porovnat signály s a bez stimulace. Destička byla inkubována 10 min na kývačce. Poté byl veškerý obsah jamek odsát a jamky byly promyty vychlazeným fyziologickým roztokem. Po odsátí fyziologického roztoku byla destička převrstvena tekutým dusíkem, aby se stimulace buněk okamžitě zastavila. Takto zmražená destička byla uchována v -70 °C po dobu minimálně 15 min.

Nakonec bylo na buňky aplikováno 50 μ l lyzačního vzorkového pufru. Destička byla vložena na vodní lázeň sonikátoru Elmasonic S30 (Elma, Německo) po dobu 1 min. Obsah jamek byl převeden do mikrozkušavek a následně analyzován metodou Western blot (viz 5.3.1 a 5.3.2). Pro detekci byly použity primární protilátky proti fosforylované β -podjednotce IGF-1R a IR, nefosforylované β -podjednotce IR a IGF-1R pro detekci množství transfekovaných receptorů a jako kontrolní byla použita primární protilátka proti aktinu.

6 Výsledky

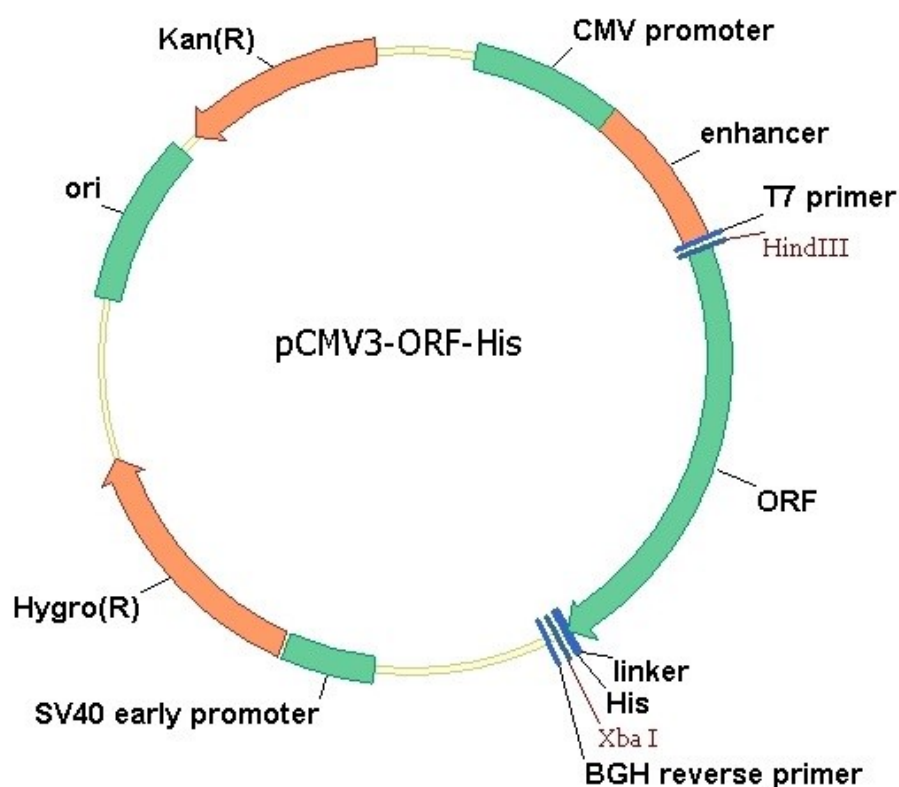
Předchozí práce v naší laboratoři ukázala, že analog IGF-1 se záměnou Glu58 na histidin vykazuje razantní snížení afinity k IGF-1R (Macháčková *et al.*, 2019). Krystalografická strukturní studie vazby IGF-1 k IGF-1R naznačila, že se Glu58 IGF-1 vyskytuje v blízkosti Arg704 IGF-1R. Na základě těchto poznatků se uvažuje interakce solnými můstky mezi těmito dvěma aminokyselinovými zbytky (Xu *et al.*, 2018; Macháčková *et al.*, 2019). Tato práce se zaměřuje na ověření významu Arg704 pro vazbu IGF-1 a dále byla zkoumána role ekvivalentního Arg717 IR pro vazbu inzulinu.

Pro studium funkce Arg704 IGF-1R, respektive Arg717 IR-A byla provedena záměna v aminokyselinové sekvenci receptorů pomocí místně specifické mutagenese. Jako kontrola byly vytvořeny mutantní varianty IGF-1R H697A a IR-A H710A se známou rolí ve vazbě ligandů (Mynarcik *et al.*, 1996, 1997b; Whittaker *et al.*, 2001; Menting *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2018). Význam mutovaných aminokyselinových zbytků pro vazbu ligandů byl studován pomocí saturačních vazebných zkoušek s radioaktivně značnými ligandy. Byly určeny vazebné vlastnosti mutantních variant receptorů a byly porovnány s WT receptory. Současně byly provedeny stimulační zkoušky na tranzientně transfekovaných R⁻ buňkách, aby byla ověřena biologická aktivita mutantních variant oproti nemutovaným receptorům.

Mutagenní studie byly prováděny na rekombinantních receptorových ektodoménách (Mynarcik *et al.*, 1996, 1997b; Whittaker *et al.*, 2001). Aby bylo možné naše výsledky porovnat s publikovanými daty, byly jako druhý model vytvořeny receptorové ektodomény IGF-1R a IR-A společně s jejich mutantními variantami, které byly fúzované s fluorescenčním proteinem mCherry. Jedná se o receptorovou část, která vyčnívá z cytoplazmatické membrány do extracelulárního prostoru, konkrétně zahrnuje aminokyselinové zbytky 1-932 IGF-1R a 1-944 IR-A. Nejprve byly vytvořené plazmidové konstrukty obsahující sekvence kódující pouze receptorové ektodomény. Tyto plazmidy byly poté transfekovány do buněčné linie Hek293-6E. Díky signální sekvenci na N-konci proteinů byly ektodomény buňkami sekretovány do kultivačního média. Z média byly ektodomény purifikovány pomocí niklové afinitní chromatografie a následné proteinové dialýzy. Nakonec byly receptorové ektodomény a jejich mutantní varianty podrobeny saturačním zkouškám stejně jako celkové receptory a byly s nimi porovnány.

6.1 Příprava mutantních variant expresních vektorů kódujících celkové IGF-1R a IR-A

Mutace v celkových receptorech byly vneseny do plazmidových vektorů pCMV3 (viz obr. 12) kódující cDNA pro WT IGF-1R či IR-A pomocí místně-specifické mutagenese provedením PCR s primery nesoucími informaci o cílové mutaci. Původní templát, původem izolovaný z bakteriální kultury, byl po PCR degradován enzymem DPNI, aby se ve směsi vyskytoval pouze produkt mutagenese. Pro další namnožení plazmidových vektorů byla využita transformace kompetentních bakterií *E. coli* TOP10 a jejich kultivace se selekčním antibiotikem. Na selekčním médiu vyrostly bakteriální kolonie obsahující požadovaný plazmid, který byl následně izolován. Přítomnost mutací na úrovni DNA byla ověřena sekvenací viz obr. 13 a obr. 14. Sekvence byla prováděna vždy pomocí sekvenačního primeru, který byl komplementární s DNA sekvencí ve vzdálenosti alespoň 350 bp před kontrolovaným místem mutace. V případě, že nebyly nalezeny kolonie obsahující cílovou mutaci, byla mutagenese opakována.



Obr. 12: Schéma expresního plazmidového vektoru pCMV3 (SinoBiological, Čína). Schéma bylo uvedeno firmou SinoBiological. Plazmidový vektor obsahuje kanamycinovou (Kan(R)) a hygromycinovou (Hygro(R) pod kontrolou SV40 promotoru) rezistenci. Gen zájmu (ORF z anglického „open reading frame“) je pod kontrolou cytomegalovirového promotoru. Za ORF se nachází krátký linker a sekvence pro His-tag.

Plazmidy pozitivní na mutaci byly dále transformovány do kompetentních bakterií *E. coli* TOP10 pro získání většího množství DNA. DNA byla izolována komerčními kity ZymoPURE™ Plasmid Miniprep, nebo NucleoBond® Xtra Midi. Úspěšně byly vytvořeny mutantní varianty IGF-1R H697A a IGF-1R R704A, respektive IR-A H710, R717A, R717Q, R717F a R717K. Záměna původních aminokyselin zavádí do struktury proteinu aminokyselinu s rozdílnými vlastnostmi.

Ruler 1	2 170	2 180	2 190	2 200
Consensus	TTGAGAAATTCCTGCACAACCTCCATCTTCGTGCCACAGACCTGAAAG			
IGF-1R WT control	TTGAGAAATTCCTGCACAACCTCCATCTTCGTGCCACAGACCTGAAAG			
IGF-1R H697A from seq	TTGAGAAATTCCTG G CACAACCTCCATCTTCGTGCCACAGACCTGAAAG			
IGF-1R R704A from seq	TTGAGAAATTCCTGCACAACCTCCATCTTCGTGCC G CACCTGAAAG			
Ruler 2	2 170	2 180	2 190	2 200

Obr. 13: Část sekvence plazmidů po místně-specifické mutagenězi izolované z *E. coli* TOP10 kompetentních bakterií. Sekvence mutantních variant IGF-1R H697A a IGF-1R R704A byly porovnány s WT sekvencí pomocí programu MegAlign Pro (DNASar, USA). Nukleotidová změna byla provedena na pozicích 2179-2180 bp u IGF-1R H697A a 2200-2201 bp u IGF-1R R704A – zobrazeno barevně.

Ruler 1	2,210	2,220	2,230
IR-AWT control	GATTACCTGCACAACGTGGTTTTTCGTCCCCAGGCCATCTC		
IR H710A from seq	GATTACCTG G CACAACGTGGTTTTTCGTCCCCAGGCCATCTC		
IR R717A from seq	GATTACCTGCACAACGTGGTTTTTCGTCCCC G CACCATCTC		
IR R717Q from seq	GATTACCTGCACAACGTGGTTTTTCGTCCCC C AGGCCATCTC		
IR R717F from seq	GATTACCTGCACAACGTGGTTTTTCGTCCCC T TCCATCTC		
IR R717K from seq	GATTACCTGCACAACGTGGTTTTTCGTCCCC A GCCATCTC		
Ruler 2	2,210	2,220	2,230

Obr. 14: Část sekvence plazmidů po místně-specifické mutagenězi izolované z *E. coli* TOP10 kompetentních bakterií. Sekvence mutantních variant IR-A H710A, IR-A R717A, R717Q, R717F a R717K byly porovnány s WT sekvencí pomocí programu MegAlign Pro (DNASar, USA). Nukleotidová změna byla provedena na pozicích 2209-2210 bp u IR-A H710A a 2230-2232 bp u IR-A R717A, R717Q, R717F a R717K – zobrazeno barevně.

Nukleotidové sekvence po sekvenaci byly přeloženy dle standardního genetického kódu do aminokyselinové sekvence. Mutace na nukleotidové úrovni se propsaly do změny aminokyselinové sekvence dle požadovaných receptorových variant viz obr. 15 a obr. 16.

Ruler 1	720 730 740
Consensus	QAEKEEEAEYRKVFFENFLHNSIFVPRPERKRRDVMQVANTTM
IGF-1R transl	QAEKEEEAEYRKVFFENFLHNSIFVPRPERKRRDVMQVANTTM
IGF-1R H697A transl	QAEKEEEAEYRKVFFENFLA ^N NSIFVPRPERKRRDVMQVANTTM
IGF-1R R704A transl	QAEKEEEAEYRKVFFENFLHNSIFVPA ^A PERKRRDVMQVANTTM
Ruler 2	720 730 740

Obr. 15: Výsledek sekvenace IGF-1R H697A a R704A byl převeden do aminokyselinové sekvence a porovnán s WT IGF-1R. Srovnání bylo provedeno programem MegAlign Pro (DNASar, USA). Záměny aminokyselin jsou vyznačeny barevně. WT reference je uvedena i s odštěpovanou signální sekvencí na N-konci receptoru, z toho důvodu je posunuto číslování aminokyselin.

Ruler 1	730 740 750
IR-A-transl	LKELEESSFRKTFEDYLNHNVVFVPRPSPRKRRSLGDVGNVTV
IR-A H710A transl	LKELEESSFRKTFEDYLA ^N NVVFVPRPSPRKRRSLGDVGNVTV
IR-A R717A transl	LKELEESSFRKTFEDYLNHNVVFVPA ^A SPRKRRSLGDVGNVTV
IR-A R717Q transl	LKELEESSFRKTFEDYLNHNVVFVPA ^Q SPRKRRSLGDVGNVTV
IR-A R717F transl	LKELEESSFRKTFEDYLNHNVVFVPA ^F SPRKRRSLGDVGNVTV
IR-A R717K transl	LKELEESSFRKTFEDYLNHNVVFVPA ^K SPRKRRSLGDVGNVTV
Ruler 2	730 740 750

Obr. 16: Výsledek sekvenace IR-A H710A, R717A, R717Q, R717F a R717K byl převeden do aminokyselinové sekvence a porovnán s WT IR-A. Srovnání bylo provedeno programem MegAlign Pro (DNASar, USA). Záměny aminokyselin jsou vyznačeny barevně. WT reference je uvedena i s odštěpovanou signální sekvencí na N-konci receptoru, z toho důvodu je posunuto číslování aminokyselin.

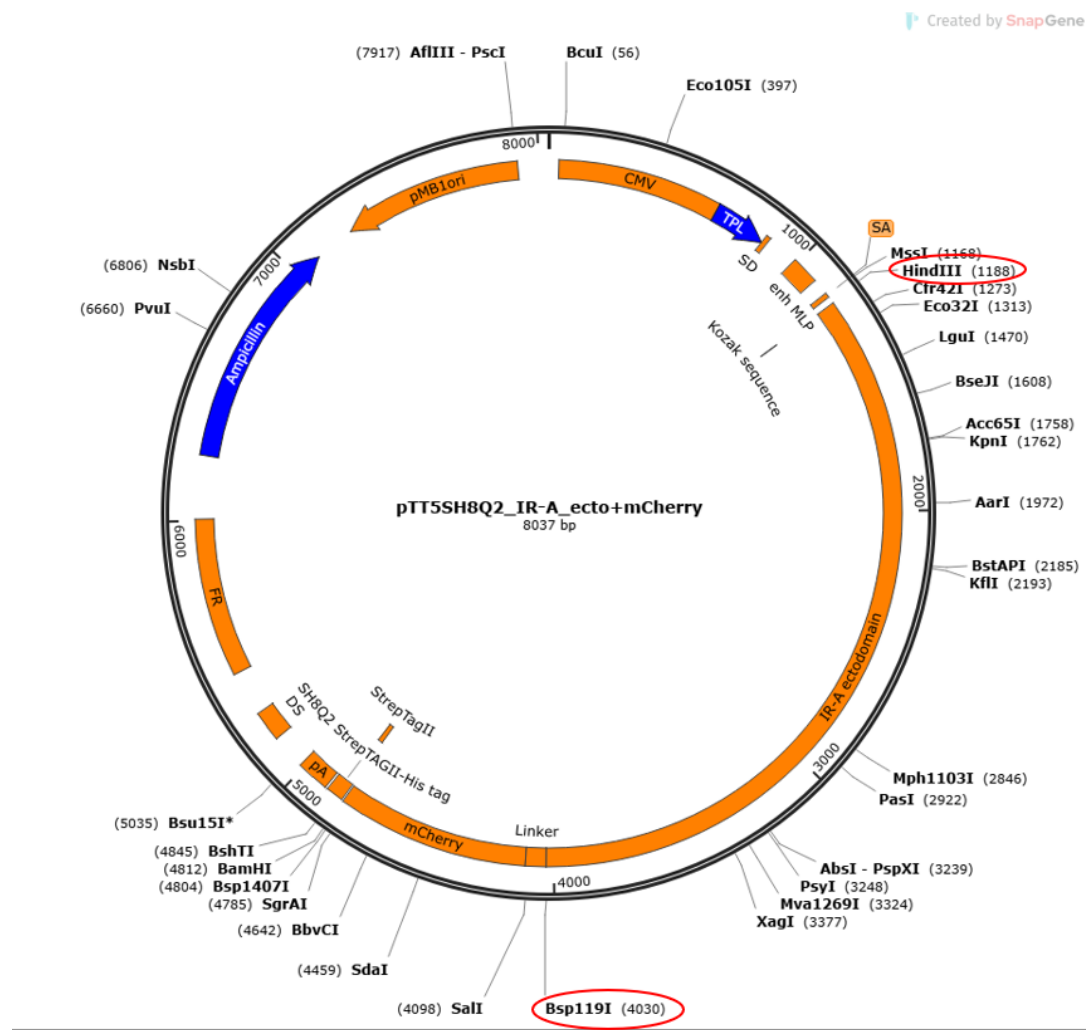
6.2 Příprava expresních vektorů kódujících ektodomény IGF-1R a IR-A

Aby bylo možné exprimovat receptorové ektodomény v Hek293-6E buňkách, bylo nejprve nutné připravit plazmidový konstrukt obsahující sekvenci, která definuje receptorové ektodomény spojené s fluorescenčním mCherry proteinem. Byly vytvořeny ektodomény IGF-1R WT, H697A a R704A a ekvivalentně IR-A WT, IR-A H710A, R717A, R717Q a R717F vložení genu pro tyto receptorové domény do expresního vektoru pTT5SH8G2_IR-A_ecto+mCherry viz obr. 17. Původní gen pro IR-A receptorovou ektodoménu v tomto vektoru byl tak nahrazen nově připravenými inzerty kódujícími receptorové ektodomény WT receptorů a jejich mutantních variant.

Původně měly být vytvořené plazmidové konstrukty vektoru pTT5SH8Q2 pouze s vloženými geny pro receptorové ektodomény bez přítomnosti mCherry proteinu. Bylo uvažováno použití restričních endonukleáz HindIII a BamHI (viz obr. 17), kdyby byl vyštěpen původní gen pro IR-A ektodoménu společně s mCherry. Takto bylo možné

připravit plazmidové konstrukty s IGF-1R ektodomény. Po transfekci do Hek293-6E však z neznámého důvodu nedocházelo k sekreci proteinů do média. Kvůli přítomnosti BamHI restričního místa v genu pro IR-A byla příprava IR-A ektodomén obtížnější. Prvním krokem tak byla místně specifická mutageneze právě tohoto restričního místa v genu pro IR-A. Nicméně i přes opakované pokusy bylo vnesení mutace do BamHI restričního místa neúspěšné. Proto bylo rozhodnuto, že bude v expresním vektoru ponechána sekvence pro mCherry protein a použití restričních endonukleáz Bsp119I. Díky fúzi s mCherry byla usnadněna kvantifikace proteinů a zároveň jeho přítomnost možná napomáhala správné maturaci receptorových ektodomén a následně jejich sekreci.

Nakonec byly tedy připraveny fragmenty DNA kódující receptorové ektodomény IGF-1R a IR-A a jejich mutantní varianty pomocí PCR s primery obsahujícími na 5' koncích nukleotidovou sekvenci rozeznávanou a štěpenou restričními endonukleázami HindIII a Bsp119I. HindIII restriční místo se vyskytovalo na 5' konci výsledného fragmentu a Bsp119I restriční místo na 3' konci. S použitím těchto restričních endonukleáz byl rovněž vyštěpený původní gen pro IR-A z vektoru pTT5SH8G2_IR-A_ecto+mCherry viz obr. 17.

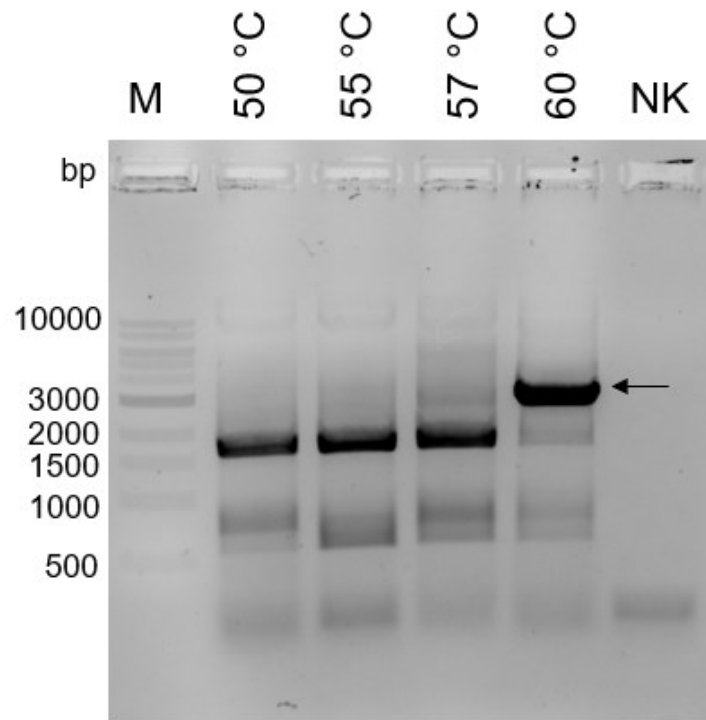


Obr. 17: Schéma plazmidu pTT5SH8Q2_IR-A_ecto+mCherry; červenými kroužky jsou označena využitá místa štěpení enzymy HindIII a Bsp119I. Plazmidový vektor obsahuje ampicilinovou rezistenci. Gen zájmu („IR-A ectodomain“) je pod kontrolou cytomegalovirového promotoru. Za ORF se nachází krátký linker a sekvence pro mCherry protein následovaný His-tagem. Po ligaci inzertů byla vytvořená sada plazmidů obsahující gen pro IGF-1R ektodomény WT, H697A a R704A a IR-A ektodomény WT, H710A, R717A, R717Q a R717F namísto původního genu pro IR-A ektodoménu uvnitř vektoru. Schéma bylo vytvořeno programem SnapGene (USA).

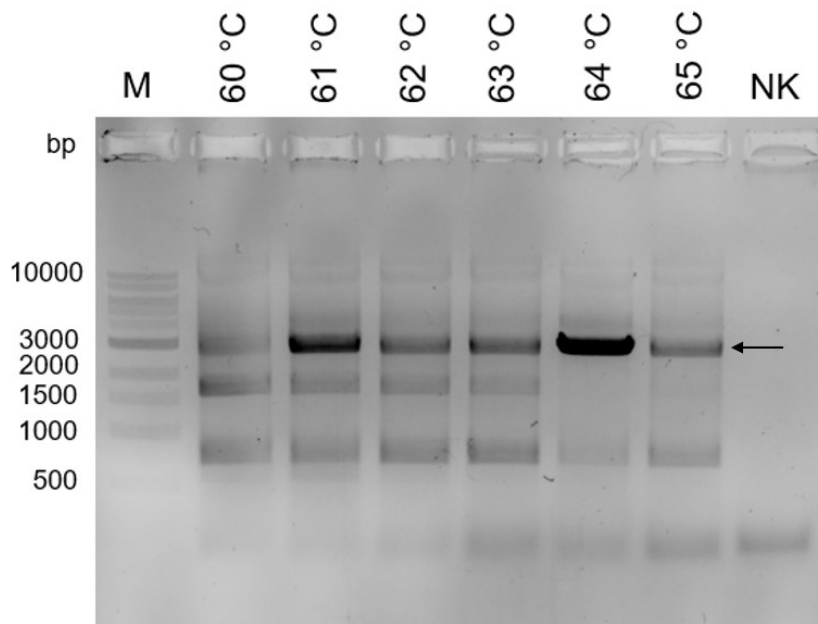
PCR reakce pro IGF-1R ektodomény proběhla úspěšně již v prvním pokusu za teplotních podmínek nasedání primerů při 50 °C dle předchozích protokolů v naší laboratoři. Avšak pro PCR reakci s genem pro IR-A byly navrženy nové primery a bylo nejprve nutné optimalizovat teplotní podmínky nasedání primerů. Pro analýzu výsledku PCR reakce byla provedena agarózová elektroforéza v 1% agarózovém gelu.

Při nižších teplotách než 60 °C vznikaly nespecifické produkty o nižší molekulové hmotnosti, než byl požadovaný gen pro IR-A ektodoménu (přibližně 3000 bp) viz obr. 18. Při 60 °C se na elektroforetogramu stále vyskytovaly nespecifické produkty, proto byla provedena další teplotní optimalizace nasedání primerů v teplotním rozmezí 60-65 °C

s rozestupy po jednom stupni viz obr. 19. Jako optimální se zde jevila teplota nasedání primerů 64 °C dle nízkého množství nespecifických produktů. Proto byla tato teplota použita pro všechny následující PCR reakce vytvářející DNA fragmenty s geny pro IR-A ektodomény.



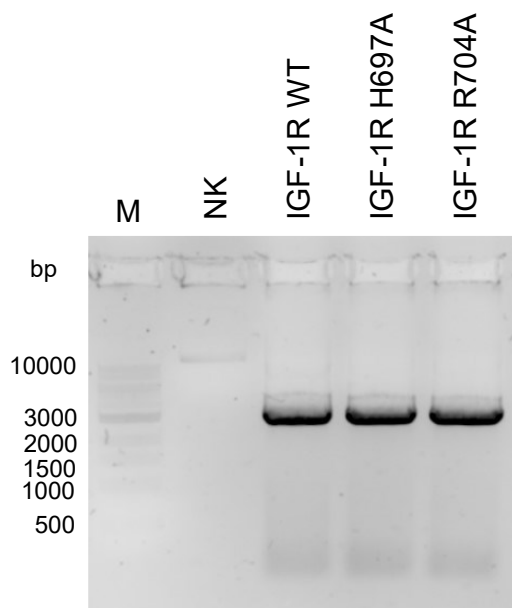
Obr. 18: Elektroforetogram optimalizace teploty nasedání primerů pro PCR reakci vzniku DNA fragmentu IR-A ektodomény. Zde byla použita templátová DNA plazmidu pCMV3 s genem pro IR-A WT. Černá šipka označuje požadovanou velikost fragmentu (cca 3000 bp). M označuje marker molekulových hmotností 1 kb DNA Ladder. NK označuje negativní kontrolu, kdy do reakce nebyla přidána templátová DNA, a tedy ukazuje, že PCR reakce proběhla specificky a není zde jiná kontaminující DNA. Elektrforéza byla prováděna v 1% agarózovém gelu.



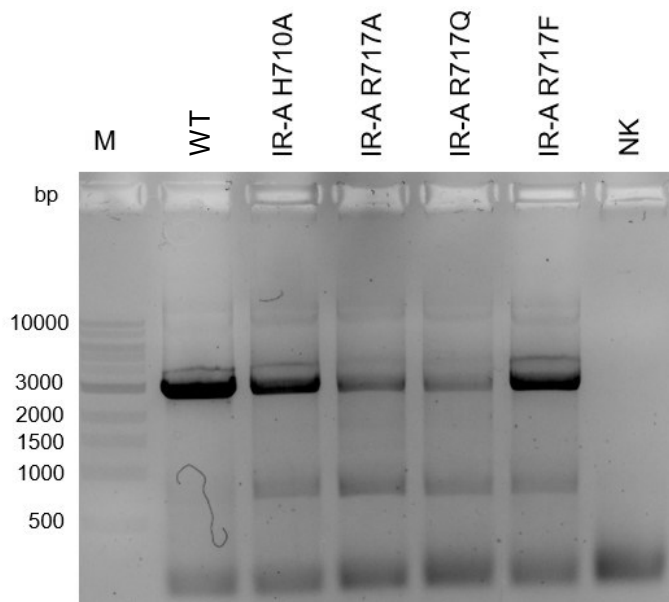
Obr. 19: Elektroforetogram optimalizace teploty nasedání primerů pro PCR reakci vzniku DNA fragmentu IR-A ektodomény. Zde byla použita templátová DNA plazmidu pCMV3 s genem pro IR-A WT. M označuje marker molekulových hmotností 1 kb DNA Ladder. Černá šipka označuje požadovanou velikost fragmentu (cca 3000 bp). Jako optimální se jevílo použití teploty nasedání primerů 64 °C. NK označuje negativní kontrolu, když do reakce nebyla přidána templátová DNA, a tedy ukazuje, že PCR reakce proběhla specificky bez další kontaminující DNA. Elektroforéza byla prováděna v 1% agarózovém gelu.

Po proběhnutí PCR reakce byla směs vždy přečištěna komerčním kitem GeneJet PCR Purification Kit.

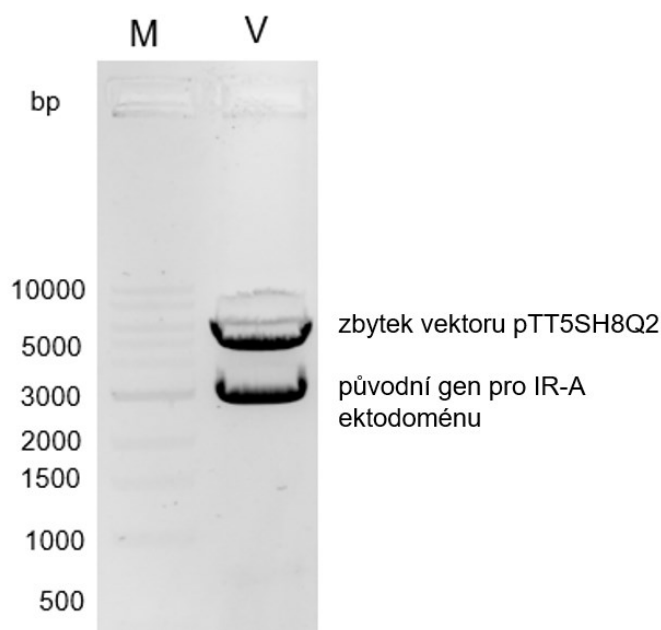
Pro vytvoření definovaných konců byla následně provedena štěpná reakce s restrikními endonukleázami HindIII a Bsp119I. Byly provedeny dvě nezávislé reakce, kde v jedné byl použit plazmidový fragment (inzert) kódující receptorovou ektodoménu a v druhé reakci byl použit expresní vektor pTT5SH8Q2_IR-A_ecto+mCherry. Z vektoru tak byl vyštěpen původní gen pro IR-A ektodoménu, vektor byl konstruován dříve v naší laboratoři Mgr. Kateřinou Macháčkovou, Ph. D (nepublikováno). Díky tomu vznikly vzájemně kompatibilní konce inzertu a vektoru určující i správný směr vložení inzertu do vektoru. Výsledek štěpné reakce byl ověřen elektroforeticky na 1% agarózovém gelu viz obr. 20, obr. 21, a obr. 22.



Obr. 20: Elektroforetogram plazmidových fragmentů IGF-1R (inzertů) po PCR a štěpné reakci s restričními endonukleázami HindIII a Bsp119I. Inzerty o velikosti přibližně 3000 bp kódují receptorové ektodomény. M označuje marker molekulových hmotností 1 kb DNA Ladder. NK označuje negativní kontrolu, kdy do reakční směsi PCR nebyla přidána Phusion® High-fidelity DNA Polymerase. Tato negativní kontrola demonstruje přítomnost pouze templátové DNA, lze dle ní pozorovat amplifikaci DNA o správné molekulové hmotnosti po PCR. Následují vzorky ektodomén IGF-1R WT a její mutantní varianty. Elektroforéza probíhala v 1% agarózovém gelu



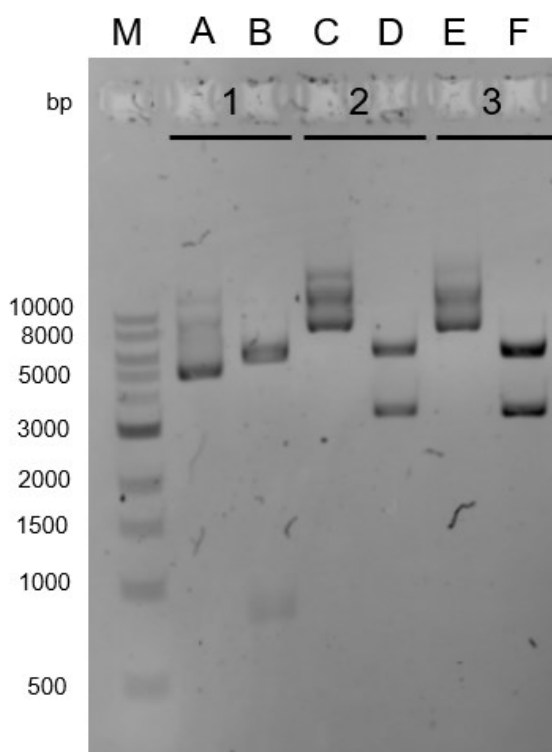
Obr. 21: Elektroforetogram plazmidových fragmentů IR-A (inzertů) po PCR a štěpné reakci s restričními endonukleázami HindIII a Bsp119I. Inzerty o velikosti přibližně 3000 bp kódují receptorové ektodomény. M označuje marker molekulových hmotností 1 kb DNA Ladder. Následují vzorky ektodomén IR-A WT a jeho mutantní varianty. NK označuje negativní kontrolu, kdy do reakční směsi PCR nebyl přidán DNA templát. Ze vzorku negativní kontroly je patrné, že reakce proběhla specificky a nebyla přítomna kontaminující DNA. Elektrforéza byla prováděna v 1% agarózovém gelu.



Obr. 22: Reprezentativní elektroforetogram expresního vektoru pTT5SH8Q2_IR-A_ecto+mCherry (označeno V) po štěpení restrikcí endonukleázami HindIII a Bsp119I. Po reakci došlo k vyštěpení původního genu pro IR-A ektodoménu (cca 3000 bp), aby mohl být nahrazen nově připravenými inzerty IGF-1R či IR-A ektodomén WT a jejich mutantními variantami. M označuje marker molekulových hmotností 1 kb DNA Ladder. Elektroforéza probíhala v 1% agarózovém gelu.

Z gelu byly vyříznuty a izolovány požadované fragmenty inzertu (přibližně o velikosti 3000 bp) a proužek vektoru (přibližně o velikosti 5000 bp) viz obr. 22. Pro spojení inzertu a vektoru byla využita T4 DNA ligáza. Poté byla ligační směs transformována do kompetentních *E. Coli* TOP10 bakterií. Z narostlých kolonií byla izolována plazmidová DNA. Ověření úspěšné ligace proběhlo zpětným restrikcí štěpením s následnou elektroforetickou analýzou v 1% agarózovém gelu viz obr. 23. Pokud došlo k úspěšné ligaci, bylo možné u neštěpených vzorků pozorovat přítomnost DNA o velikosti odpovídající spojení inzertu a vektoru, tedy přibližně 8000 bp. Naopak po kontrolní štěpné reakci byly přítomny dva fragmenty, jeden odpovídající velikosti inzertu (3000 bp) a druhý odpovídající velikosti vektoru (5000 bp) viz obr. 23. Plazmidová DNA s pozitivním výsledkem ligace byla poslána na dodatečné potvrzení ligace konkrétních variant na sekvenaci. Potvrzené ligované konstrukty byly dále namnoženy v kompetentních *E. coli* TOP10 bakteriích.

Úspěšně byly vytvořeny plazmidové konstrukty všech variant kódující ektodomény IGF-1R WT, H697A a R704A; IR-A WT, H710A, R717A, R717Q a R717F.



Obr. 23: Reprezentativní elektroforetogram kontrolního štěpení plazmidového konstruktu IR-A ektodomény H710A enzymy HindIII a Bsp119I. (M) marker molekulových hmotností 1 kb DNA Ladder; 1, 2, 3 označují kolonie, ze kterých byla izolována plazmidová DNA; (A) konstrukt IR-A ektodomény H710A bez štěpné reakce z kolonie 1; (B) konstrukt IR-A ektodomény H710A štěpený HindIII a Bsp119I z kolonie 1; vyizolovaná DNA z kolonie 1 velikostně neodpovídá požadovanému plazmidovému konstrukt; (C) konstrukt IR-A ektodomény H710A bez štěpné reakce z kolonie 2; (D) konstrukt IR-A ektodomény H710A štěpený HindIII a Bsp119I z kolonie 2; (E) konstrukt IR-A ektodomény H710A bez štěpné reakce z kolonie 3; (F) konstrukt IR-A ektodomény H710A štěpený HindIII a Bsp119I z kolonie 3. U kolonií 2 a 3 jsou po štěpné reakci pozorovatelné dva proužky odpovídající zpětně vyštěpenému inzertu (cca 3000 bp) a vektoru (cca 5000 bp). Zároveň vzorky C a D obsahují neštěpenou plazmidovou DNA odpovídající hmotnosti přibližně 8000 bp dokládající spojení inzertu a vektoru. Elektroforéza byla provedena v 1% agarózovém gelu. Stejným způsobem byla ověřena ligace inzertů a vektoru u všech vytvářených plazmidových konstruktů.

6.3 Produkce celkových receptorů v buněčné linii R-

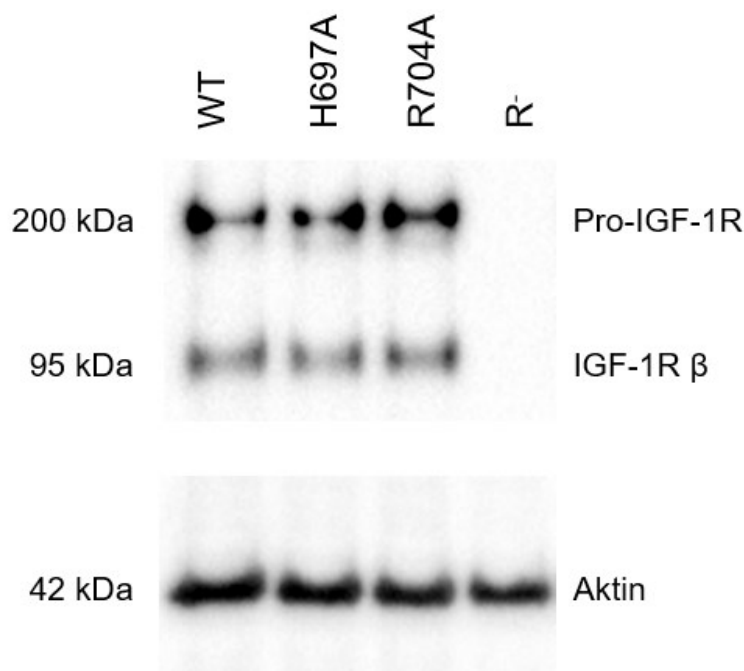
Pro studium celkových receptorů v buněčném kontextu byly předem připravené (viz 6.1) plazmidové vektory pCMV3 nesoucí geny pro IGF-1R či IR-A a jejich mutantní varianty tranzientně transfekovány do buněčné linie myších embryonálních fibroblastů s „knock-outovaným“ genem pro IGF-1R do tzv. R- buněk. Tyto buňky nemají detekovatelnou expresi IGF-1R, ale také mají relativně nízkou expresi myšského IR (Liu *et al.*, 1993; Sell *et al.*, 1993; Sciacca *et al.*, 2010). Tudíž exprese lidského IR-A z expresního vektoru je větší a lidský IR-A se vyskytuje na cytoplazmatické membráně ve větším počtu

než přirozený myší homolog. Proto jsou tyto buňky vhodné pro expresi a měření vlastností mutantních variant obou typů receptorů.

Nejprve bylo uvažováno, že buňky budou transfekovány stabilně. Stabilní transfekce byla dosažena hygromycinovým selekčním tlakem, neboť expresní vektor pCMV3 obsahuje hydromycinovou rezistenci viz obr. 12. Nicméně po opakovaných pokusech nebylo dosaženo dostatečně velké exprese receptorů při stabilní transfekci vhodné pro saturační vazebné zkoušky. Dále jsme tak pokračovali s tranzientní transfekcí R- buněk.

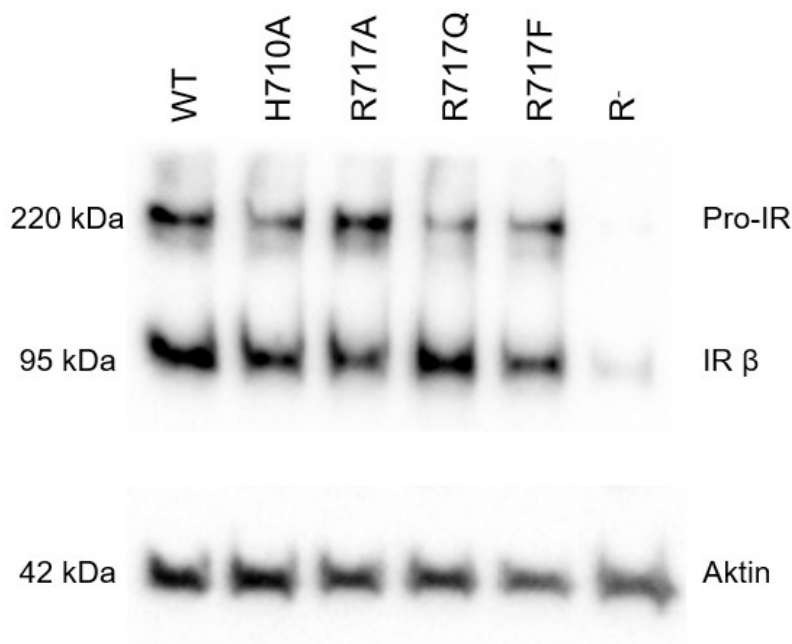
Pro transfekci bylo použito transfekční činidlo Lipofectamine™ 2000 Transfect reagent. Po inkubaci buněk s bezsérovým kultivačním médiem byly buňky z kontrolní 24jamkové destičky lyzovány přidáním RLB lyzačního pufru. Tyto vzorky byly využity pro analýzu transfekce pomocí metody Western blot za použití protilátek proti IGF-1R β podjednotce (oblast detekce 95 kDa) a IR β podjednotce (oblast detekce 95 kDa). Jako kontrola nanášky byl vizualizován aktin protilátkou proti aktinu (oblast detekce 42 kDa). Western blotová analýza byla prováděna při každém nezávislém opakování saturační zkoušky.

Na základě provedené Western blotové analýzy bylo prokázáno, že dochází k dostatečné expresi všech variant IGF-1R po tranzientní transfekci vektorem pCMV3 nesoucím gen pro IGF-1R WT a jeho mutantní varianty H697A a R704A viz obr. 24. Míra exprese byla u všech receptorových variant srovnatelná viz obr. 24. Pokud by se exprese receptorových variant výrazně lišila, buňky by obsahovaly rozdílný počet vazebných míst, což by mohlo vést ke zkreslení výsledků saturačních vazebných zkoušek. Stejně tak žádná z mutantních variant (H697A či R704) nebránila vzniku maturovaných receptorů z pro-receptorů, jelikož jsou pozorovatelné dva proužky odpovídající jak pro-receptorům (přibližně 200 kDa), tak samotným IGF-1R β podjednotkám (přibližně 95 kDa) viz obr. 24. Pokud by k maturaci z pro-receptoru nedocházelo, byl by pozorovatelný pouze pruh odpovídající pro-receptoru IGF-1R. Zároveň obr. 24 potvrzuje, že R- buňky, které nebyly transfekovány, neobsahují detekovatelné množství IGF-1.



Obr. 24: Reprezentativní Western blotová analýza exprese IGF-1R v R⁻ buňkách po tranzientní transfekci expresním vektorem pCMV3 nesoucím gen pro IGF-1R WT a mutantní varianty H697A a R704A. Vrchní proužek o molekulové hmotnosti přibližně 200 kDa znázorňuje pro-IGF-1R, ze kterého poté vzniká maturovaný IGF-1R. Jako negativní kontrola byly použity netransfekované R⁻ buňky.

Dle Western blotové analýzy je možné na obr. 25 pozorovat, že došlo k expresi všech variant IR-A po tranzientní transfekci R⁻ buněk z expresního vektoru pCMV3 kódujícího IR-A a jeho mutantní varianty. Zároveň je dle obr. 25 znatelné, že úroveň exprese byla u všech receptorových variant na podobné úrovni. U kontrolního vzorku z netransfekovaných R⁻ buněk byla patrná nízká exprese přirozených myších IR ve srovnání s expresí variant IR-A z expresního vektoru pCMV3. Proto je vliv myších IR v saturačních vazebných zkouškách zanedbatelný. Žádná z mutací neovlivňovala vznik maturovaného receptoru z pro-receptoru, na obr. 25 jsou viditelné oba proužky odpovídající jak pro-receptorům (přibližně 220 kDa) tak maturovaným receptorům (přibližně 95 kDa).



Obr. 25: Reprezentativní Western blotová analýza exprese variant IR-A R⁻ buněk po tranzientní transfekci expresním vektorem pCMV3 nesoucím gen pro IR-A WT a mutantní varianty H710A, R717A, R717Q a R717F a následně exprese těchto proteinů. Vrchní proužek o molekulové hmotnosti přibližně 220 kDa znázorňuje pro-IR, ze kterého poté vzniká maturovaný IR-A (přibližně 95 kDa). Jako negativní kontrola byly použity netransfekované R⁻ buňky. Nanášková kontrola byla provedena vizualizací aktinu (přibližně 42 kDa).

6.4 Produkce receptorových ektodomén v buněčné linii Hek293-6E

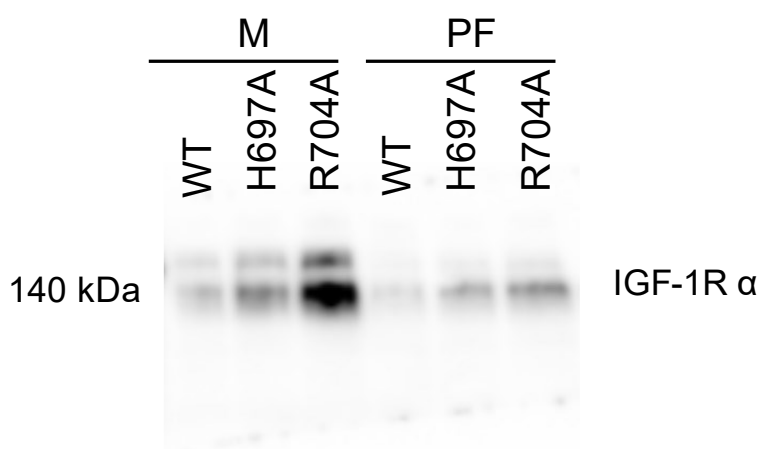
Plazmidové konstrukty receptorových ektodomén (viz 6.2) byly použity k expresi rekombinantních proteinů v suspenzní buněčné linii Hek293-6E. Díky signální sekvenci na N-konci proteinu byly receptorové ektodomény s mCherry sekretovány do média, tím se zjednodušila purifikace proteinu. Produkce receptorových ektodomén probíhala ve třech nezávislých pokusech, kdy byly purifikovány v jednom pokusu ektodomény IGF-1R WT, H697A a R704A, druhém IR-A WT, H710A a R717A a ve třetím ektodomény IR-A R717Q a R717F.

Prvním krokem byla tranzientní transfekce plazmidových konstruktů do buněk linie He293-6E pomocí transfekčního činidla PEI. Každá varianta proteinu byla produkována jednotlivě. Po pěti dnech kultivace byla buněčná suspenze centrifugována a byl odebrán supernatant – kultivační médium obsahující vyprodukovaný protein. Tento supernatant byl smíchán s His-Select® Nickel Affinity gelem. Matrice s nikelnatými ionty vychytává receptorové ektodomény pomocí histidinů obsažených v His tagu na C-konci proteinů. Pro vyčištění vzorku od ostatních proteinů byl gel s navázanými proteiny umístěn do plastové kolony. Nenavázané proteiny protekly kolem pevné matrice. Celý

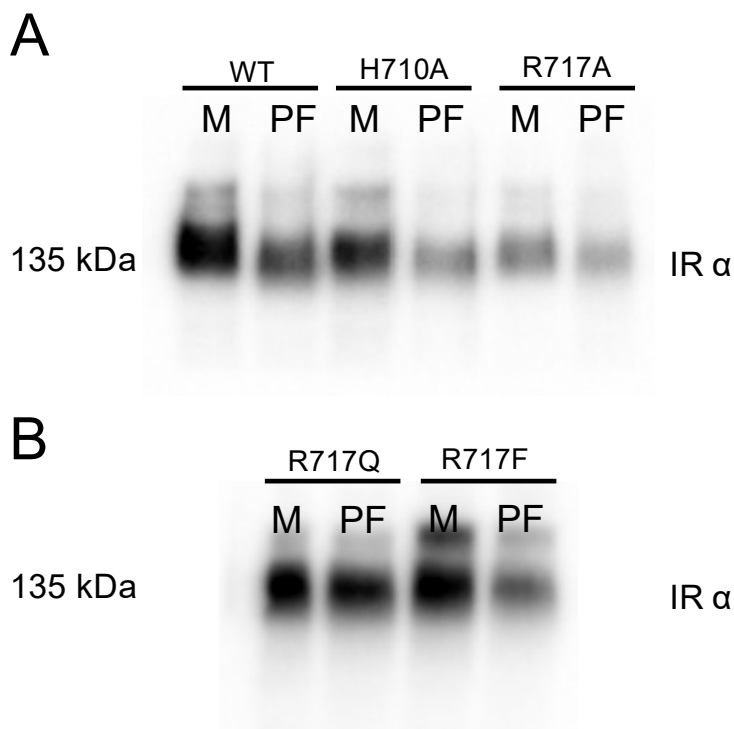
vzorek byl následně dočištěn promývacím pufrům. Eluce receptorových ektodomén poté probíhala pomocí elučního pufru s 0,25 M imidazolem, který vytěsnil proteiny s His tagem z vazby na nikelnaté ionty. Tím se naše proteiny uvolnily do roztoku. Výsledný vzorek proteinů byl spojen z prvních dvou elučních frakcí, tedy finální objem činil přibližně 2 ml. Nakonec byla provedena proteinová dialýza, aby došlo k odstranění imidazolu z proteinových vzorků.

Průběžně byly odebírány vzorky na SDS-PAGE a následnou analýzu pomocí metody Western blot pro potvrzení výskytu požadovaných receptorových ektodomén. Vzorky byly připraveny z odebraného kultivačního média po centrifugaci buněk u všech receptorových ektodomén. Z proteklé frakce (z anglického „flow through“) byl také odebrán vzorek, aby bylo ověřeno vychytání ektodomén na afinitní gel. Pro detekci receptorových ektodomén byly použity primární protilátky proti IR α podjednotce (oblast detekce 135 kDa) a IGF-1R α podjednotce (oblast detekce 140 kDa). Provedené Western bloty ukazují, že transfekované buňky Hek293-6E exprimovaly a sekretovaly naše proteiny zájmu v dostatečném detekovatelném množství viz obr. 26 a obr. 27. U vzorků IR-A ektodomén je patrné, že množství afinitního gelu nebylo dostatečné a průtoková frakce obsahovala stále velké množství proteinu viz obr. 27. Nicméně pro naše účely byla výsledná koncentrace proteinů dostačující a další purifikace průtokové frakce již nebyla provedena.

Před použitím purifikovaných receptorových ektodomén na saturační zkoušky byla provedena výsledná Western blotová analýza vzorků viz obr. 29. Imunochemická detekce potvrdila přítomnost všech receptorových ektodomén v purifikovaných vzorcích.

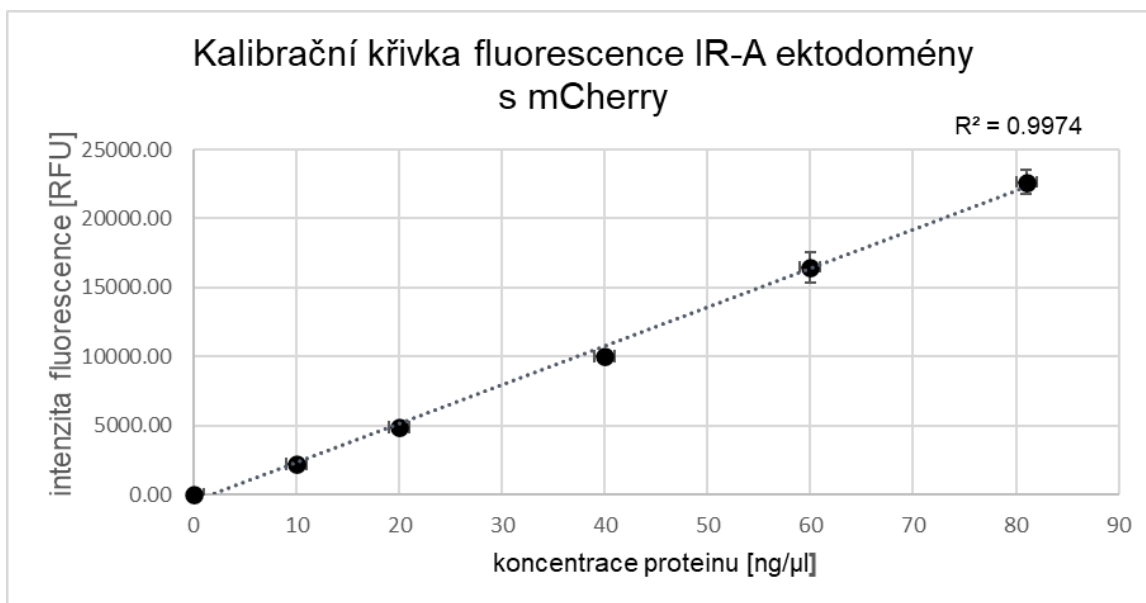


Obr. 26: Western blot sekretovaných IGF-1R ektodomén z kultivačního média (označeno M) a proteklé frakce (označeno PF) s použitím primární protilátky proti IGF-1R α podjednotce. Produkce IGF-1R ektodomén probíhala v jiném pokusu než produkce IR-A ektodomén.



Obr. 27: Western blot sekretovaných IR-A ektodomén z kultivačního média před přidáním afinitního gelu (označeno M) a proteklé frakce (označeno PF) s použitím primární protilátky proti IR α podjednotce. (A) Průběh purifikace IR-A ektodomén WT, H710A a R717A. (B) Průběh purifikace IR-A ektodomén R717Q a R717F. Purifikace A a B byly prováděny jako dva pokusy v jiném časovém období.

Pro stanovení koncentrace purifikovaných proteinů byla využita fluorescenční vlastnost proteinu mCherry, který byl fúzován s receptorovými ektodomény. Pomocí již dříve purifikované IR-A WT ektodomény s mCherry o známé koncentraci 81 ng/ml (připraveno Mgr. Kateřinou Macháčkovou, Ph.D.) byla připravena kalibrační křivka z hodnot intenzity fluorescence. Intenzita fluorescence lineárně závisí na koncentraci fúzního proteinu, tedy čím větší je koncentrace proteinu ve vzorku, tím je vyšší intenzita fluorescence (Duellman *et al.*, 2015). Vzorek byl vždy měřen ve stejném objemu ve třech opakováních. Z průměrných hodnot intenzity fluorescence byla vytvořena kalibrační křivka určující vztah intenzity fluorescence a koncentrace proteinu viz obr. 28.



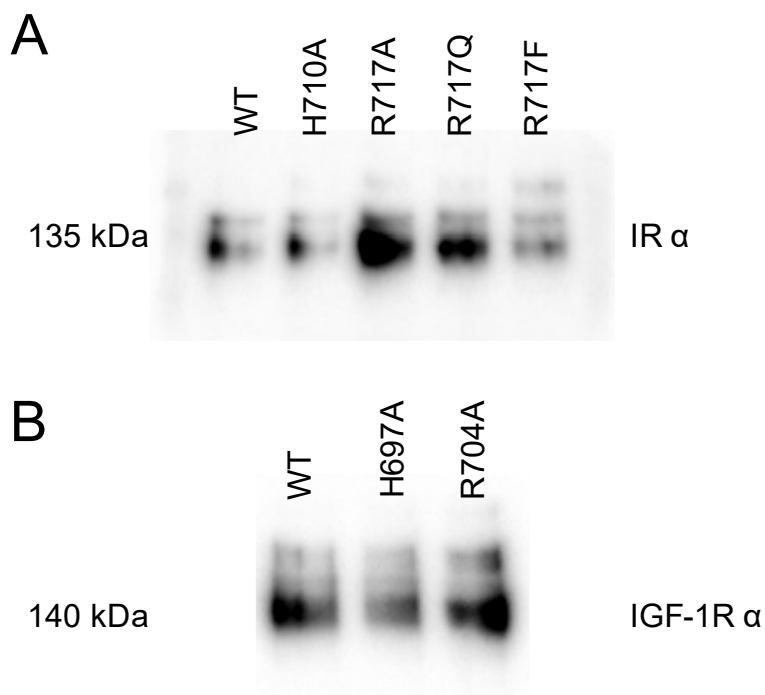
Obr. 28: Kalibrační křivka intenzity fluorescence vytvořená pomocí ředění IR-A ektodomény o známé koncentraci 81 ng/μl. Intenzita fluorescence byla měřena na přístroji Infinite® M100 (Tecan Systems, USA).

Na základě této křivky byla vypočítána rovnice regrese, dle které byly dále určovány koncentrace purifikovaných receptorových ektodomén viz tab. 11. Intenzita fluorescence byla měřena vždy ve třech opakováních ve stejném objemu jako kontrolní vzorek.

Rovnice regrese:

$$y = 281,8x - 523,93$$

Všechny receptorové ektodomény byly purifikovány v dostatečné koncentraci pro použití na saturační zkoušky na adsorbčních destičkách viz 6.5.



Obr. 29: Western blot purifikovaných receptorových ektodomén s nanáškou 300 ng proteinu. (A) purifikované ektodomény IR-A; (B) purifikované IGF-1R ektodomény

Tab. 11: Výsledné koncentrace purifikovaných receptorových domén určené na základě intenzity fluorescence mCherry proteinu, který byl fúzován s receptorovými ektodoménami; SD vyjadřuje směrodatnou odchylku (z anglického „standard deviation“).

Purifikovaný protein	Průměrná intenzita fluorescence ± SD	koncentrace proteinu [ng/μl]
ektodoména IGF-1R WT	6910 ± 39	26
ektodoména IGF-1R H697A	8787 ± 39	33
ektodoména IGF-1R R704A	24203 ± 359	88
ektodoména IR-A WT	18385 ± 552	67
ektodoména IR-A H710A	21739 ± 715	79
ektodoména IR-A R717A	7053 ± 160	27
ektodoména IR-A R717Q	13845 ± 317	51
ektodoména IR-A R717F	13214 ± 190	49

6.5 Vazebné a aktivační vlastnosti IGF-1R a IR-A a jejich ektodomén

Vlastnosti WT receptorů a receptorů se změněnými aminokyselinami na pozicích 697 a 704 u IGF-1R a 710 a 717 u IR-A byly zkoumány pomocí saturačních zkoušek s radioaktivně značenými ligandy, tedy se značeným IGF-1 a inzulinem.

Buňky byly nanášeny na 24jamkovou destičku. Tranzientní transfekce byla prováděna následující den, kdy buňky byly již přichyceny k podkladu a dále se dělily. Buňky byly ponechány v inkubátoru do druhého dne, aby byla exprese receptorů dostatečná pro saturační zkoušku. Čím více radioligandu bylo navázáno na receptory, tím vyšší hodnoty impulzů za minutu (*cpm*) byly naměřeny. Pro zjištění signálu nespecifické vazby radioligandu byl ve druhé řadě transfekovaných buněk přidán nadbytek neradioaktivního ligandu, který vysytil vazebná místa. Naměřené hodnoty *cpm* radioaktivního ligandu tak odpovídaly nespecificky navázanému radioligandu. Specifická vazba radioligandu byla určena odečtením hodnot *cpm* nespecifické vazby od celkově naměřených hodnot *cpm*.

Pro porovnání vazebných vlastností celkových receptorů byly provedeny saturační vazebné zkoušky na modelu receptorových ektodomén dle předchozích studií (Mynarcik *et al.*, 1996, 1997b; Whittaker *et al.*, 2001).

Samostatné ektodomény IGF-1R a IR-A fúzované s mCherry (viz kapitola 6.4) byly purifikovány a imobilizovány na černé adsorbční destičce MaxiSorp (Thermo Scientific™, USA) za pomoci synteticky připravených protilátek iBodies® proti His tagu na C-konci proteinů. Díky přichycení ektodomén na C-konci fúzního proteinu byla vazebná místa na α podjednotkách receptorů stále zcela přístupná pro vazbu ligandů.

Nejprve bylo přidáváno 100 ng purifikované ektodomény na jamku. Nicméně naměřené hodnoty *cpm* byly příliš nízké a hodnoty nespecifické vazby vysoké, což znemožňovalo věrohodné určení vazebných vlastností. V následujících pokusech bylo již přidáváno 300 ng na jamku (v nadbytku), aby všechna vazebná místa iBodies® byla obsazena receptorovými ektodomény.

Saturační vazebná zkouška byla provedena se zvyšující se koncentrací ^{125}I -IGF-1 či ^{125}I -inzulinu. Pro saturační vazebné zkoušky s receptorovými ektodomény bylo využito větší rozmezí přidávaných koncentrací než u saturačních vazebných zkoušek s celkovými receptory. Receptorové ektodomény se obecně vyznačují nižší afinitou k ligandům v porovnání s celkovými receptory (Schäffer, 1994; Surinya *et al.*, 2008).

Podle naměřených hodnot saturačních vazebných zkoušek byly vypočítány hodnoty B_{max} a rovnovážné disociační konstanty K_D pomocí zjednodušujícího modelu nelineární regrese pro jedno vazebné místo. B_{max} udává maximální obsazenost vazebných míst systému, a tedy i koncentraci volných receptorů na povrchu buněk. Pro porovnání mutantních variant s WT receptory byla určena relativní maximální vazba ($\% B_{max}$) v jednotlivých opakováních dle rovnice:

$$\% B_{max} = \left(\frac{B_{max} \text{ mutant}}{B_{max} \text{ wt}} \right) \cdot 100.$$

Stejně tak byly určeny hodnoty K_D . Rovnovážná disociační konstanta udává sílu asociace ligandu s receptorem. Čím vyšší je hodnota K_D , tím se schopnost vazby snižuje. Pro srovnávání byla mutantních variant receptoru byla spočtena relativní K_D ($\% K_D$) vůči hodnotám WT v jednotlivých opakováních dle rovnice:

$$\% K_D = \left(\frac{K_D \text{ wt}}{K_D \text{ mutant}} \right) \cdot 100.$$

Pro určení biologické aktivity receptorů byly provedeny stimulační zkoušky aplikací 10 nM IGF-1 či inzulinu na receptorové varianty exprimované v R- buňkách. Aktivace byla ověřena imunochemickou metodou Western blot s použitím primárních protilátek proti fosforylovaným β podjednotkám IGF-1R či IR-A.

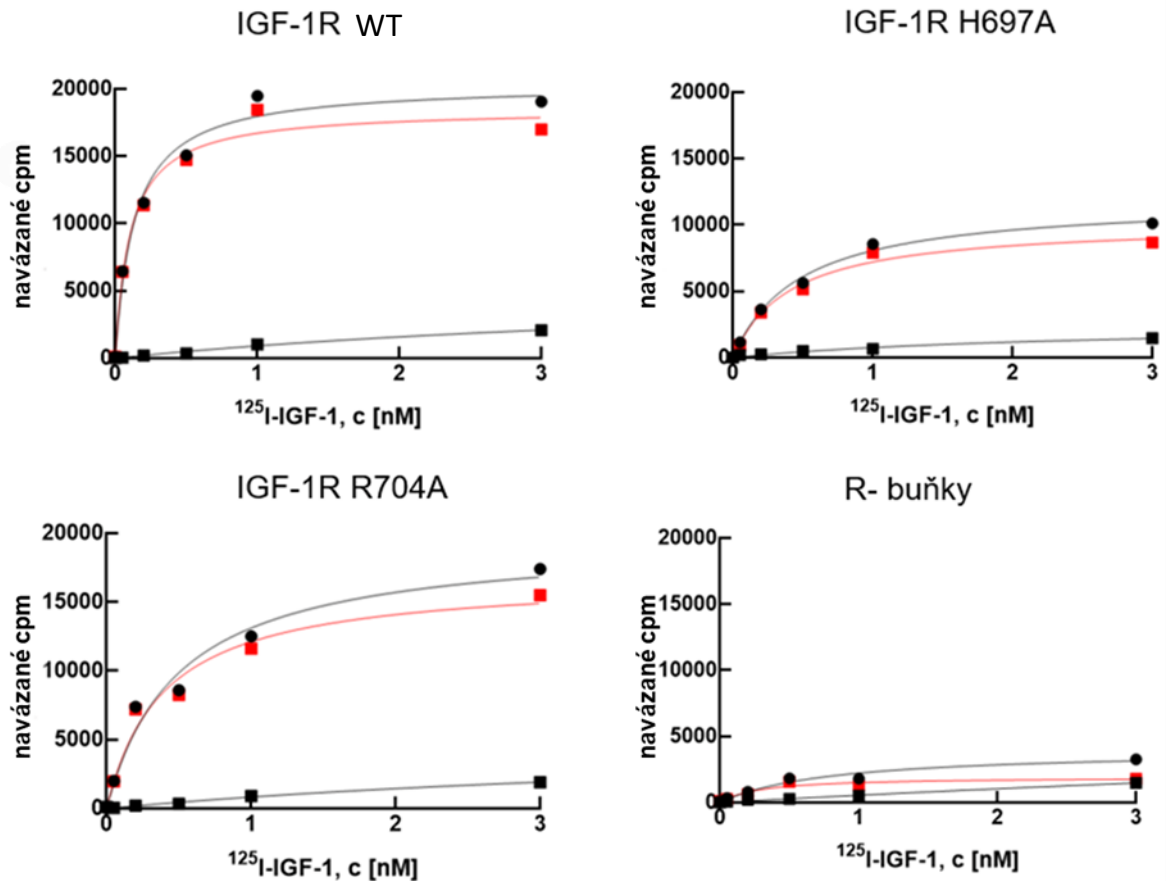
6.5.1 Varianty IGF-1R

Saturační vazebné zkoušky byly provedeny se všemi variantami IGF-1R. Naměřená vazba radioligandu na kontrolních R- buňkách je zanedbatelná. V samostatných pokusech byly po přidání ^{125}I -IGF-1 změřeny celkové hodnoty *cpm* a hodnoty *cpm* nespecifické vazby. Pro odvození specifické vazby ^{125}I -IGF-1 byly tyto hodnoty od sebe odečteny viz obr. 30. Hodnoty B_{max} dosahovaly stejných hodnot v rámci tří opakování, tedy úspěšnost transfekce byla konstantní. WT IGF-1R dosahovala hodnot $K_D = 0,09 \pm 0,01$ nM.

Již z obr. 30 a obr. 31 je patrné, že varianty IGF-1R H697A i R704A mají odlišné vazebné vlastnosti, než WT IGF-1R. Obě mutantní varianty IGF-1R mají signifikantně nižší B_{max} hodnoty než WT receptor viz tab. 12. Varianta R704A dosahuje $80 \pm 8 \%$ B_{max} WT a H697A pouze $52 \pm 2 \%$ viz obr. 31. Tedy u varianty H697A je patrný pokles volných vazebných míst o polovinu, přestože exprese IGF-1R po tranzientní transfekci je srovnatelná u všech variant viz obr. 24.

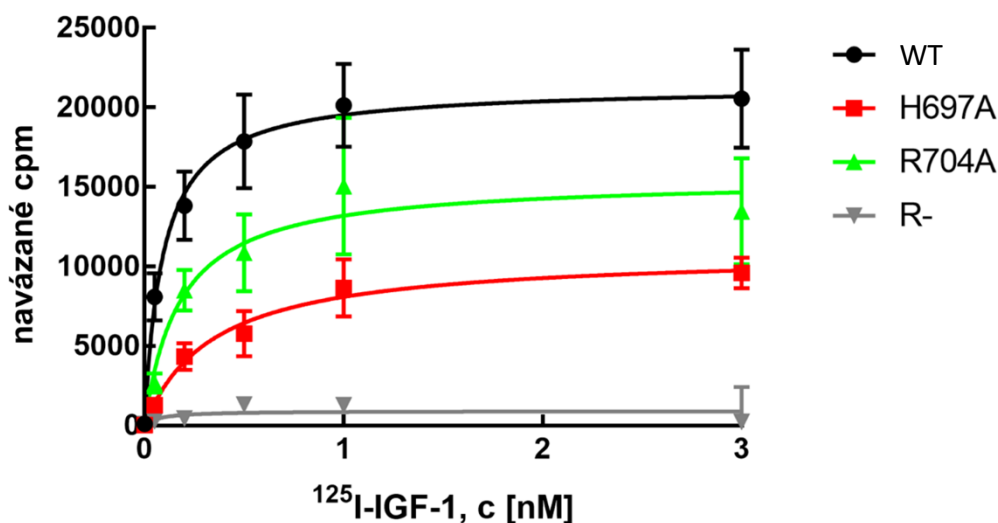
Stejně tak jsou odlišné hodnoty K_D mutantních variant oproti WT receptoru. Dle obr. 30 a obr. 31 je možné pozorovat změnu sklonu křivky, která je proložená

naměřenými body, u mutantních variant. U obou mutantních variant se hodnoty relativní K_D snížily přibližně na 30 % hodnoty WT IGF-1R, tedy tyto mutantní varianty vážou IGF-1 slaběji než WT receptor. Výsledky jsou uvedeny v tab. 12.



Obr. 30: Reprezentativní výsledek saturační vazebné zkoušky jednotlivých IGF-1R variant. Černými body a křivkami jsou označeny přímo naměřené hodnoty cpm. Černými kruhovými body jsou vyneseny naměřené celkové hodnoty; černými čtvercovými body jsou vyneseny hodnoty nespécificky navázaného ¹²⁵I-IGF-1. Červeně jsou vyznačeny body a křivky specifické vazby radioligandu určené odečtením hodnot nespécifické vazby od celkových naměřených cpm.

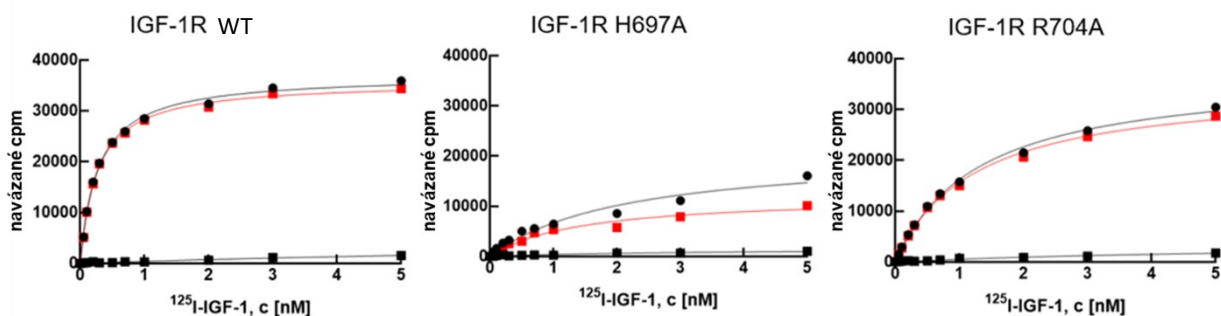
Vazebné vlastnosti variant IGF-1R



Obr. 31: Výsledek saturačních vazebných zkoušek v porovnání všech IGF-1R variant. Mutantní varianta IGF-1R H697A (červeně) dosahuje hodnot B_{max} pouze $52 \pm 2 \%$ oproti WT IGF-1R (černě), IGF-1R R704A (zeleně) dosahuje B_{max} $80 \pm 8 \%$ oproti WT IGF-1R. Vazba na netranfekované R- buňky je oproti všem variantám IGF-1R nízká. Hodnoty K_D u obou variant vrůstají o $27 \pm 7 \%$ (H697A) respektive $30 \pm 9 \%$ (R704A).

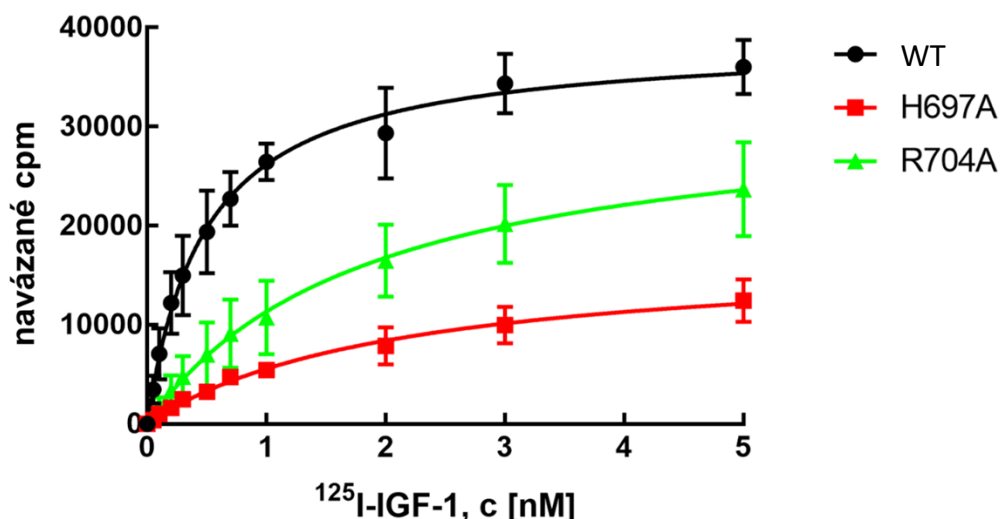
Na purifikovaných IGF-1R ektodoménách byly provedeny saturační vazebné zkoušky pro porovnání s celkovými receptory. Rovnovážná disociační konstanta K_D ektodomény WT IGF-1R byla určena v hodnotách $K_D = 0,53 \pm 0,19$ nM. Tato hodnota je vyšší než zjištěná hodnota K_D celkového WT IGF-1R ($K_D = 0,09 \pm 0,01$ nM), což je v souladu s předchozí studií, která ukázala, že se receptorové ektodomény vyznačují nižší afinitou oproti celkovým receptorům (Surinya *et al.*, 2008).

Dle dosažených poměrů B_{max} a K_D vůči WT IGF-1R ektodoméně vykazují varianty receptorových ektodomén stejné vazebné trendy jako jejich ekvivalenty celkových receptorů viz obr. 32 a obr. 33. Zkrácení IGF-1R na pouhé ektodomény a jejich fúze s mCherry proteinem tedy neovlivnila vazebné vlastnosti receptorových variant. Opět je pozorovatelné snížení B_{max} varianty H697A na polovinu hodnoty ($51 \pm 8 \%$) WT IGF-1R ektodomény. U R704A bylo B_{max} sníženo na přibližně 86 %. Zároveň hodnoty K_D jsou dle očekávání vyšší než u celkových receptorů. Nicméně relativní snížení K_D mutantních variant zůstalo srovnatelné s variantami celkových receptorů: na přibližně 23 % pro ektodoménu IGF-1R H697A a přibližně 25 % pro ektodoménu IGF-1R R704A. Výsledné hodnoty IGF-1R ektodomén jsou uvedeny v tab. 12.



Obr. 32: Reprezentativní výsledek saturační vazebné zkoušky jednotlivých ektodomén IGF-1R variant. Černými body a křivkami jsou označeny přímo naměřené hodnoty cpm. Černými kruhovými body jsou vyneseny naměřené celkové hodnoty; černými čtvercovými body jsou vyneseny hodnoty nespecificky navázaného ^{125}I -IGF-1. Červeně jsou vyznačeny body a křivky specifické vazby radioligandu určené odečtením hodnot nespecifické vazby od celkových naměřených cpm.

Vazebné vlastnosti variant ektodomén IGF-1R



Obr. 33: Výsledek saturačních vazebných zkoušek v porovnání všech variant ektodomén IGF-1R. Hodnoty B_{max} varianty ektodomény H697A IGF-1R (červeně) dosahují $51 \pm 8 \%$ hodnoty WT ektodomény IGF-1, varianta ektodomény R704A IGF-1R (zeleně) nabývá hodnot B_{max} $86 \pm 15 \%$ oproti hodnotě WT IGF-1R. Hodnoty relativní K_D se u ektodomény H697A IGF-1R snížily na $23 \pm 9 \%$ a u ektodomény R704 IGF-1R na $25 \pm 4 \%$ oproti hodnotám WT ektodomény IGF-1R.

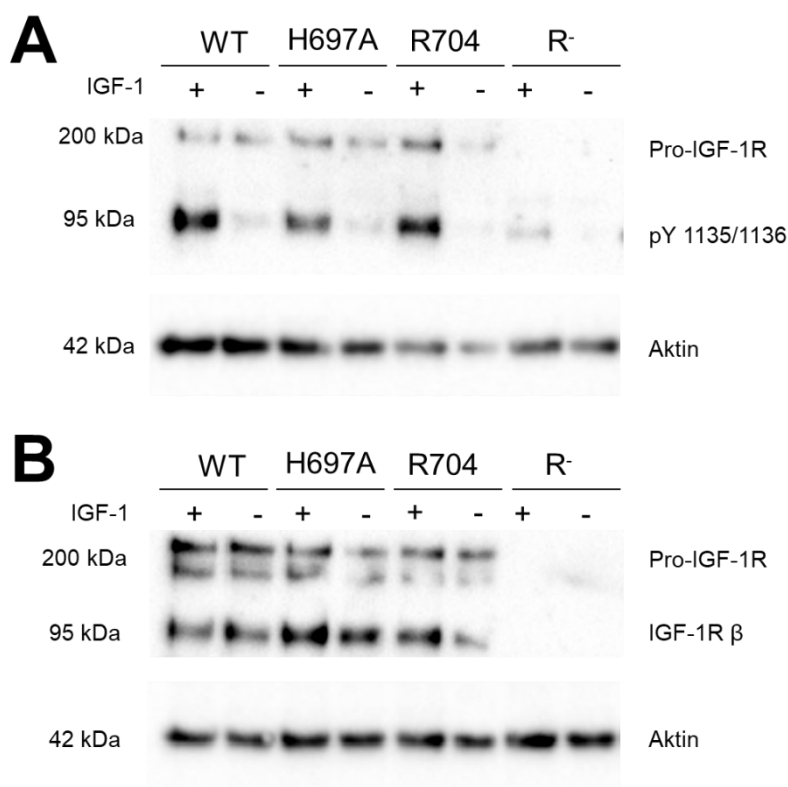
Lze tedy konstatovat, že His697 i R704 IGF-1R mají důležitou roli ve vazbě IGF-1. Aminokyselinová záměna histidinu za alanin na pozici 697 IGF-1R pravděpodobně snižuje počet vazebných míst na receptoru o polovinu. Zároveň aminokyselinová záměna argininu za alanin na pozici 704 způsobuje signifikantní snížení vazebné schopnosti receptoru z pohledu rovnovážné disociační konstanty.

Tab. 12: Výsledné hodnoty B_{max} a K_D ze saturačních vazebných zkoušek pro IGF-1R a jeho mutantní varianty. % B_{max} a % K_D označují relativní B_{max} respektive K_D mutantních variant vztahované na WT IGF-1R určené zvláště v každém opakování. (SD) označuje směrodatnou odchylku (z anglického „standard deviation“); (n) označuje počet opakování. Pro porovnání signifikance (p) změn vůči WT IGF-1R/ WT IGF-1R ektodoménám (ekto.) IGF-1R byla provedena statistická analýza ANOVA z hodnot B_{max} či K_D v intervalu spolehlivosti 95 % softwarem GraphPad Prism. Signifikantní rozdíly mutantních variant oproti WT IGF-1R/WT IGF-1R ektodoméně jsou vyznačeny červeně. Kompletní data viz kapitola Přílohy tab. 14.

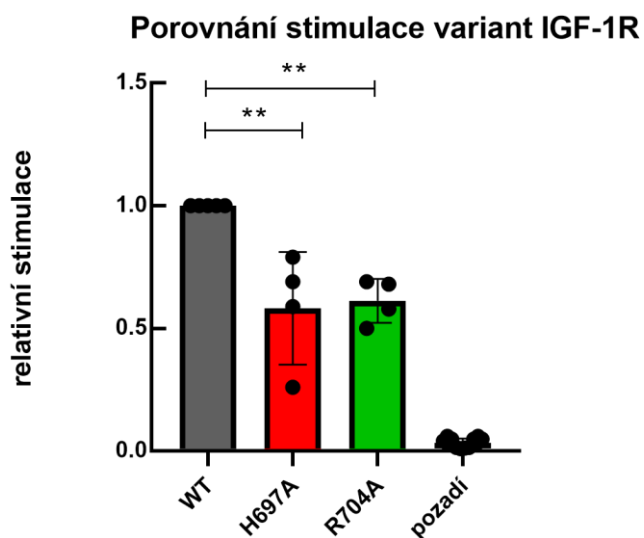
varianta IGF-1R	$B_{max} \pm SD$ cpm	% B_{max}	p	$K_D \pm SD$ [nM]	% K_D	p	n
WT	21329 ± 2025	100	-	0,09 ± 0,01	100	-	3
H697A	11087 ± 666	52	<0,001	0,38 ± 0,10	27	0,025	3
R704A	16974 ± 611	80	0,020	0,34 ± 0,10	30	0,050	3
R ⁻	2157 ± 225	10	-	0,55 ± 0,25	23	-	2
WT ekto.	39389 ± 4113	100	-	0,53 ± 0,19	100	-	3
H697A ekto.	19374 ± 1778	51	0,001	2,30 ± 0,33	23	0,011	3
R704A ekto.	33164 ± 2763	86	0,146	2,09 ± 0,64	25	0,019	3

Biologická aktivita IGF-1R a jeho mutantních variant byla ověřena stimulační zkouškou. Tranzientně transfekované R⁻ buňky expresním vektorem pCMV3 s genem kódujícím varianty IGF-1R byly stimulovány 10 nM IGF-1 po dobu 10 min. Po vazbě IGF-1 na receptor dochází k aktivaci receptoru jeho autofosforylací. Tato fosforylace byla vizualizována imunochemickou metodou Western blot za použití primárních protilátek proti fosforylovanému IGF-1R na pozicích Tyr1135 a Tyr1136 β podjednotky (přibližně 95 kDa) viz obr. 34 (A). Stejně vzorky byly podrobeny analýze exprese IGF-1R, aby bylo ověřeno, že došlo k rovnoměrné expresi receptorů z expresního vektoru pCMV3. Zde byly použity protilátky proti β podjednotce IGF-1R (přibližně 95 kDa) viz obr. 34 (B). Jako kontrola nanášky byla vizualizována exprese aktinu (přibližně 42 kDa). Míra stimulace byla určena podílem intenzity fosforylace k množství exprimovaného receptoru alespoň ze tří opakování. Tento podíl byl dále vztahován k hodnotě stimulovaného WT IGF-1R.

Všechny varianty byly po stimulaci IGF-1 aktivovány autofosforylací viz obr. 34. Avšak úroveň fosforylace nebyla u mutantních variant stejná jako u WT IGF-1R. Mutantní varianta H697A IGF-1R vykazovala signifikantně nižší intenzitu signálu fosforylace β podjednotky IGF-1R na přibližně 58 % oproti WT IGF-1R viz obr. 35. Stejně tak varianta R704A byla stimulována na pouhých 61 % oproti WT IGF-1R viz obr. 35.



Obr. 34: Reprezentativní výsledek stimulační zkoušky tranzientně transfekovaných R⁻ buněk expresním vektorem pCMV3 kódujícím receptorové varianty IGF-1R pomocí imunochemické metody Western blot. (A) vizualizace fosforylace IGF-1R a jeho mutantních variant po stimulaci 10 nM IGF-1 po dobu 10 minut (+) ve srovnání s nestimulovanými (-); (B) Exprese variant IGF-1R z expresního vektoru pCMV3 odpovídajících vzorků R⁻ buněk z obrázku A.



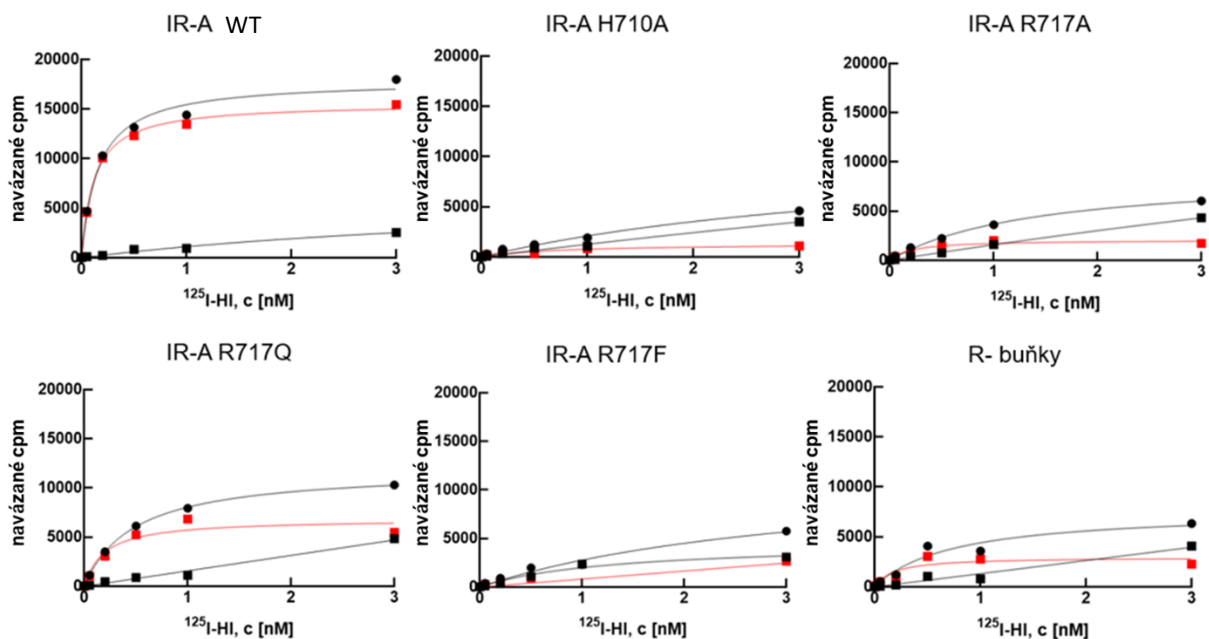
Obr. 35: Výsledek stimulačních zkoušek v porovnání všech variant IGF-1R vztažených na stimulovaný WT IGF-1R. Míra fosforylace β podjednotek IGF-1R byla u mutantní varianty H697A snížena na 58 %, u mutantní varianty R704A na 61 %. Poměry stimulace mutantních variant a WT IR-A byly určované zvlášť v každém opakování. Statistická analýza byla provedena ANOVA testem v intervalu spolehlivosti 95 % softwarem GraphPad Prism. Signifikantní výsledek je označen (*), kde **p < 0,01.

6.5.2 Varianty IR-A

Na tranzientně transfekovaných R⁻ buňkách vektorem pCMV3 kódujícím receptorové varianty IR-A WT, H710A, R717A, R717Q a R717F byly provedeny saturační vazebné zkoušky. Na základě zvyšující se koncentrace přidávaného radioligandu bylo možné sledovat i postupné zvyšování se obsazenosti vazebných míst na receptorech viz obr. 36 a obr. 37. Byly naměřeny celkové hodnoty *cpm* a od nich následně odečteny hodnoty *cpm* nespecifické vazby viz obr. 36. Z naměřených hodnot *cpm* navázaného radioligandu byly vypočteny hodnoty B_{max} a K_D . Hodnota K_D WT IR-A se byla určena jako $K_D = 0,20 \pm 0,08$ nM. Hodnoty B_{max} nabývaly v rámci opakování podobných hodnot, tedy exprese celkových receptorů probíhala srovnatelně.

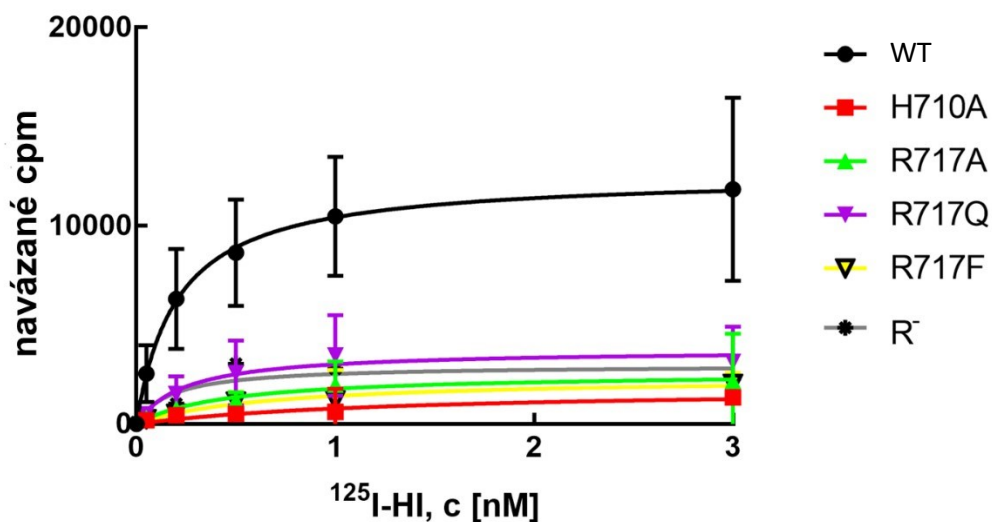
Aminokyselinová záměna histidinu za alanin na pozici 710 IR-A vedla k očekávanému dramatickému poklesu vazby 125I-inzulínu na receptor až na úroveň kontrolních netransfekovaných R⁻ buněk viz obr. 36 a obr. 37. Hodnoty B_{max} této mutantní varianty poklesly na 9 ± 7 % hodnot WT IR-A. Nicméně aminokyselinová záměna argininu 717 IR-A překvapivě vedla k podobně razantnímu signifikantnímu poklesu vazby. Konkrétně hodnoty B_{max} varianty IR-A R717A poklesly v na 24 ± 13 %, R717Q na 29 ± 8 % a R717F na 31 ± 18 % ve srovnání s hodnotami WT IR-A. Avšak kvůli nízkým hodnotám těchto mutantních variant často na úrovni nespecifické vazby viz obr. 36 je vypočtené hodnoty B_{max} a K_D nutné interpretovat obezřetně. Expresa mutantních variant receptorů byla v každém opakování srovnatelná s expresí WT IR-A viz obr. 25, tedy pokles nebyl způsoben nižším množstvím receptorů na povrchu buněk. Zároveň hodnoty B_{max} všech mutantních variant nejsou signifikantně vyšší než hodnoty maximální vazby na kontrolní netransfekované R⁻ buňky viz obr. 38.

Kromě hodnot B_{max} byly změněny také hodnoty K_D . Kvůli nízkým naměřeným hodnotám specifické vazby mutantní varianty H710A IR-A nebylo možné důvěryhodně vypočítat hodnotu K_D . U varianty IR-A R717A byla relativní K_D snížena na přibližně 36 ± 13 %, R717F na 42 ± 27 % vůči WT receptoru. Pouze IR-A R717Q vykazovala srovnatelnou hodnotu K_D (95 ± 25 %) s WT receptorem. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tab. 13.

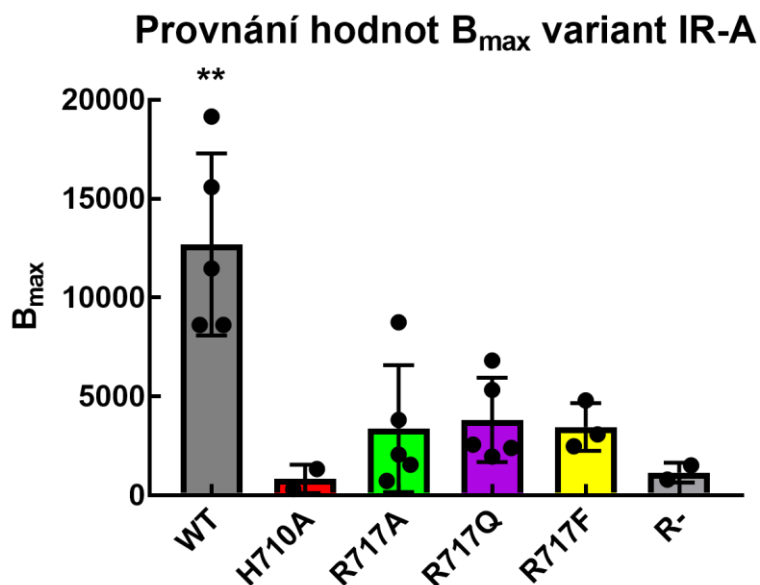


Obr. 36: Reprezentativní výsledek saturační vazebné zkoušky jednotlivých IR-A variant. Černými body a křivkami jsou označeny přímo naměřené hodnoty cpm. Černými kruhovými body jsou vyneseny naměřené celkové hodnoty (první řada buněk); černými čtvercovými body jsou vyneseny hodnoty nespecificky navázaného lidského $^{125}\text{I-HI}$ jako „human insulin“ (druhá řada buněk). Červeně jsou vyznačeny body a křivky specifické vazby radioligandu určené odečtením hodnot nespecifické vazby od celkových naměřených cpm.

Vazebné vlastnosti variant IR-A

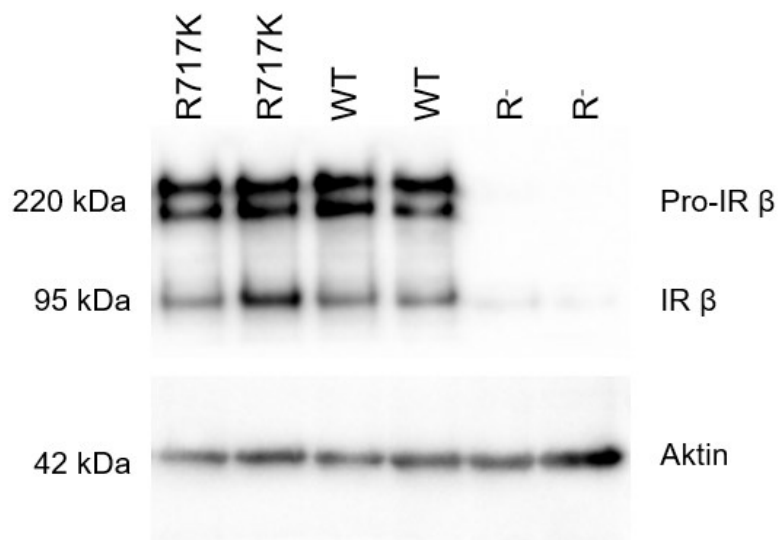


Obr. 37: Výsledek saturačních vazebných zkoušek ukazující porovnání všech měřených IR-A variant. $^{125}\text{I-HI}$ označuje značený lidský ^{125}I -inzulín.



Obr. 38: Porovnání hodnot B_{max} variant IR-A vůči kontrolním netransfekovaným R- buňkám. Signifikantní nárůst B_{max} byl pozorovatelný pouze u WT IR-A. (*) označuje signifikantní zvýšení B_{max} oproti kontrolním R- buňkám ** $p < 0,01$.

Na základě překvapivých výsledků saturačních vazebných zkoušek, byl v další sadě pokusů do R- buněk transfekován expresní vektor pCMV3 nesoucí gen pro IR-A R717K. Tato varianta byla zvolena pro ověření důležitosti pozitivního náboje neseného původním argininem ve vazbě inzulinu. Transfekce R- buněk a následná exprese mutantního receptoru byla opět srovnatelná s expresí WT IR-A z expresního vektoru pCMV3 jak je patrné z obr. 39.

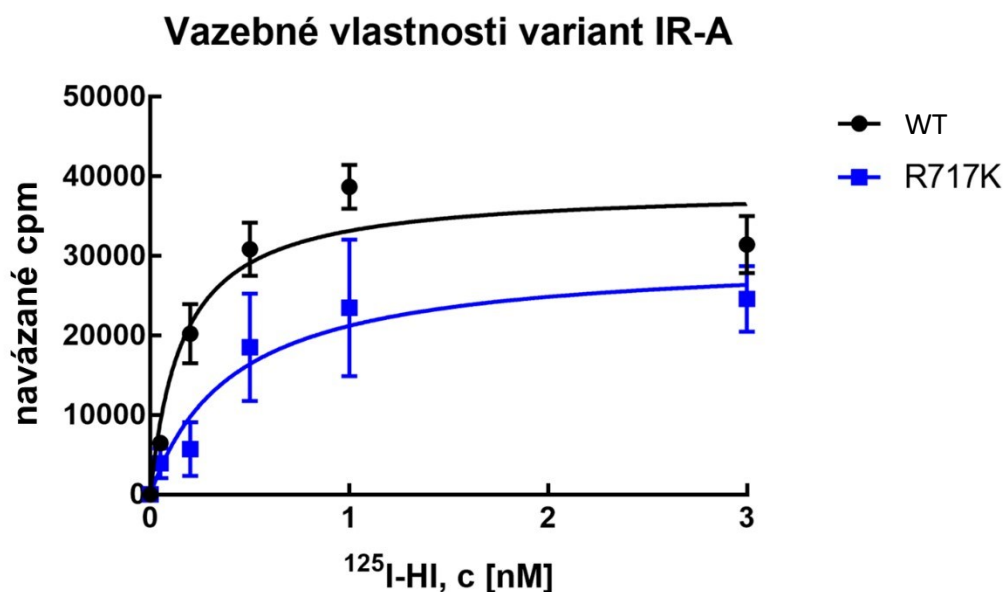


Obr. 39: Reprezentativní Western blotová analýza transfekce R⁻ buněk expresním vektorem pCMV3 nesoucím gen pro IR-A R717K a následně exprese těchto proteinů. Vrchní proužek o molekulové hmotnosti přibližně 220 kDa znázorňuje pro-IR-A, ze kterého poté vzniká maturovaný IR-A (přibližně 95 kDa). Jako negativní kontrola byly použity netransfekované R⁻ buňky. Nanášková kontrola byla provedena vizualizací aktinu (přibližně 42 kDa).

S touto mutantní variantou IR-A byly provedeny saturační vazebné zkoušky. V této sadě experimentů bylo však dosaženo vyšší míry exprese receptorů zřejmě díky vyšší účinnosti transfekce. To se také odrazilo na hodnotách B_{max} , které byly vyšší než v předchozí sadě pokusů s ostatními receptorovými variantami. Saturační zkoušky byly provedeny ve třech opakováních.

Mutantní varianta IR-A R717K dosahovala nižších hodnot B_{max} , ale tyto hodnoty byly nesignifikantní oproti hodnotám WT receptoru ($82 \pm 15 \%$). Avšak hodnoty relativní K_D byly signifikantně sníženy na $31 \pm 9 \%$ viz obr. 40. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tab. 13.

Tedy oproti ostatním mutantním variantám nebyla schopnost vazby lidského inzulinu na receptor narušena úplně. Ve srovnání s WT IR-A vykazuje mutantní varianta R717K o třetinu nižší afinitu k inzulinu. Lze tedy konstatovat, že pro vazbu inzulinu je důležitá přítomnost pozitivního náboje na aminokyselinovém zbytku na pozici 717 IR-A.



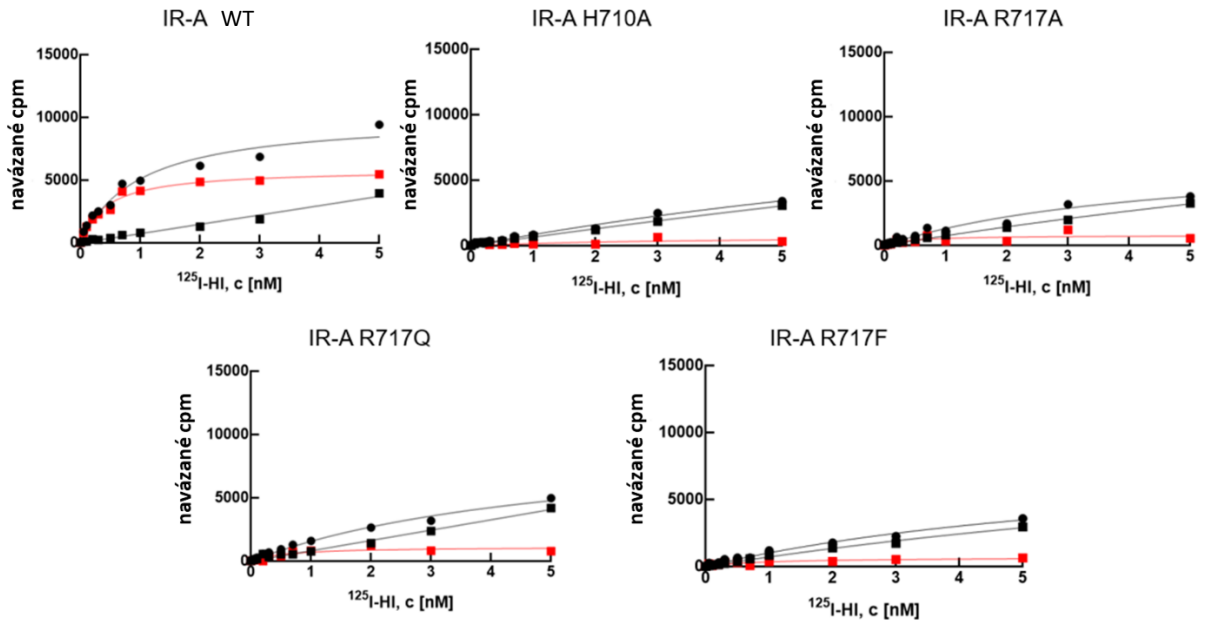
Obr. 40: Výsledek saturačních vazebných zkoušek receptorových variant IR-A WT a R717K. ^{125}I -HI označuje značený lidský ^{125}I -inzulín.

Saturační vazebné zkoušky byly opakovány s imobilizovanými purifikovanými receptorovými ektodomény. Přestože byly saturační vazebné zkoušky IR-A ektodomén provedeny za stejných podmínek jako zkoušky s IGF-1R ektodomény, jsou naměřené hodnoty *cpm* obecně nižší. Na obr. 41 a obr. 42 je zřejmé, že vazebné vlastnosti mutantních variant IR-A korespondují s vlastnostmi celkových receptorů. U všech mutantních variant IR-A je pozorovatelné, že naměřené hodnoty *cpm* nespecifické vazby jsou téměř na úrovni celkových naměřených *cpm*, tedy vazba na receptor je minimální. Z toho důvodu jsou tak vypočtené hodnoty B_{\max} a K_D spíše orientační. Tedy varianta ektodomény H710A nabývá pouhých 7 % hodnoty B_{\max} oproti WT IR-A ektodoméně. U varianty ektodomény R717A klesly hodnoty B_{\max} na 18 %, R717Q na 24 % a R717F na 12 % vůči WT IR-A ektodoménám.

Hodnota K_D WT IR-A ektodomény při vazbě inzulinu dosahuje $0,61 \pm 0,27$ nM. Tato hodnota je vyšší než u celkových receptorů, což je opět v souladu s dřívějším poznáním, že receptorové ektodomény vykazují nižší afinitu k ligandům (Schäffer, 1994). Stejně jako u celkových receptorů nebylo možné určit K_D mutantní varianty H710A IR-A ektodomény. Hodnoty relativní K_D ostatních ektodomén byly sníženy na 73 % (R717A), 39 % (R717F) a pouze u R717Q zůstala hodnota K_D srovnatelná s WT IR-A ektodoménou.

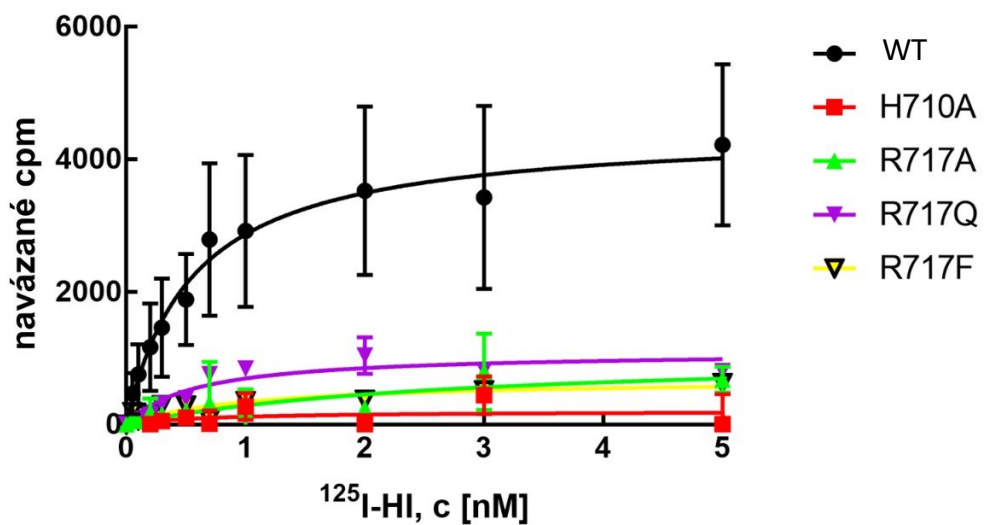
Saturační vazebné zkoušky IR-A ektodomén vykazovaly stejné vlastnosti jako celkové receptory. Proto nebyla u některých mutantních ektodomén (IR-A R717Q

a R717F) provedena všechna tři plánovaná opakování. Ze stejného důvodu nebyly připraveny ani ektodomény IR-A R717K. Tímto byla ušetřena další potenciálně nebezpečná manipulace s radioaktivně značeným inzulínem.



Obr. 41: Reprezentativní výsledek saturační vazebné zkoušky jednotlivých ektodomén IR-A variant. Černými body a křivkami jsou označeny přímo naměřené hodnoty cpm. Černými kruhovými body jsou vyneseny naměřené celkové hodnoty (první řada na destičce); černými čtvercovými body jsou vyneseny hodnoty nespecificky navázaného lidského $^{125}\text{I-HI}$ ($^{125}\text{I-HI}$ jako „human insulin“) (druhá řada na destičce). Červeně jsou vyznačeny body a křivky specifické vazby radioligandu určené odečtením hodnot nespecifické vazby od celkových naměřených cpm.

Vazebné vlastnosti variant ektodomén IR-A



Obr. 42: Výsledek saturační vazebné zkoušky ukazující porovnání všech měřených ektodomén IR-A variant. $^{125}\text{I-HI}$ označuje značený lidský ^{125}I -inzulín

Saturační vazebné zkoušky potvrdily předchozí zjištění (Mynarcik *et al.*, 1996, 1997b; Menting *et al.*, 2013), že histidin na pozici 710 IR-A je zásadní pro vazbu inzulinu. Aminokyselinová záměna histidinu za alanin vedla k disrupci vazby inzulinu na receptor. Kromě toho ukázaly, že stejně důležitý je také arginin na pozici 717 IR-A. Jeho záměna za aminokyseliny s odlišnými vlastnostmi způsobila drastický pokles ve vazbě inzulinu. Pouze mutantní varianta R717K IR-A navrátila receptoru vazebnou schopnost.

Tab. 13: Výsledné hodnoty B_{max} a K_D ze saturačních vazebných zkoušek pro IR-A a jeho mutantní varianty. % B_{max} a % K_D označují relativní B_{max} respektive K_D mutantních variant vztahované na WT IR-A určované zvlášť v každém opakování. (SD) označuje směrodatnou; (n) označuje počet opakování. Pro porovnání signifikance (p) změn vůči WT IR-A/ IR-A ektodoménám (ekto.) byla provedena statistická analýza ANOVA z hodnot B_{max} či K_D v intervalu spolehlivosti 95 % softwarem GraphPad Prism. Signifikantní rozdíly mutantních variant oproti WT IGF-1R/WT IGF-1R ektodoméně jsou vyznačeny červeně. (²) označuje druhou sadu experimentů, která se vyznačovala vyšší expresí receptorů. Pro statistické vyhodnocení signifikantních rozdílů v hodnotách B_{max} mezi těmito variantami byl použit nepárový t-test na intervalu spolehlivosti 95 %. Signifikance rozdílů K_D byla zkoumána pouze u této sady opakování, (***) označuje signifikantní rozdíl v % K_D kde $p = 0,0004$. Kompletní data viz kapitola Přílohy tab. 15.

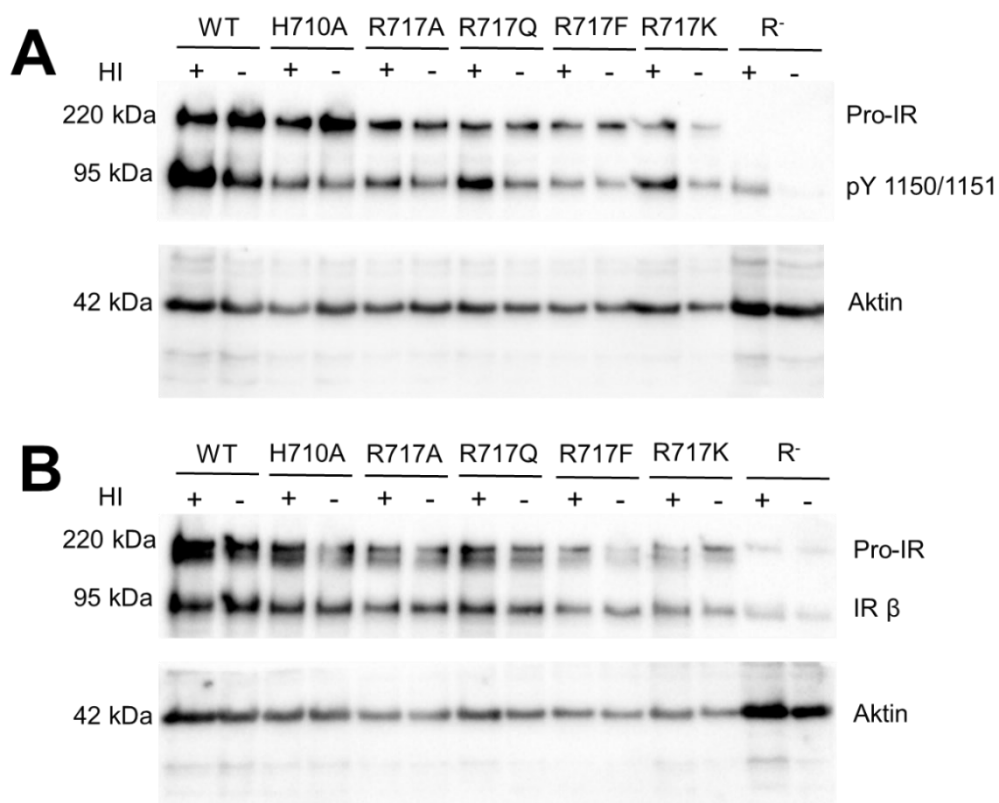
varianta IR-A	$B_{max} \pm SD$ cpm	% B_{max}	p	$K_D \pm SD$ [nM]	% K_D	n
WT	12693 ± 4115	100	-	0,20 ± 0,08	100	8
Wt ²	36629 ± 2263	100	-	-	-	
R717K ²	29748 ± 3532	82	0,081	0,55 ± 0,32	31***	3
H710A	839 ± 510	9	0,001	-	-	3
R717A	3391 ± 2869	24	<0,001	0,79 ± 0,48	36	5
R717Q.	3826 ± 1918	29	0,001	0,27 ± 0,10	95	5
R717F	3462 ± 986	31	0,003	0,72 ± 0,21	42	5
R ⁻	1164 ± 354	7,5	0,002	0,3 ± 0,12	190	2
WT ekto.	5234 ± 462	100	-	0,61 ± 0,27	100	3
H710A ekto.	416 ± 322	7	<0,001	-	-	3
R717A ekto.	912 ± 128	18	<0,001	1,23 ± 0,78	73	3
R717Q ekto.	1259 ± 134	24	<0,001	0,75 ± 0,16	91	2
R717F ekto.	685	12	<0,001	1,10	39	1

Na základě výsledků saturačních vazebných zkoušek s celkovými receptory byla prověřena také biologická aktivita všech variant IR-A v tranzientně transfekovaných

R- buňkách. Pomocí stimulační zkoušky byla testována míra autofosforylace celkových receptorů IR-A a jejich mutantních variant po stimulaci 10 nM inzulinem po dobu 10 min.

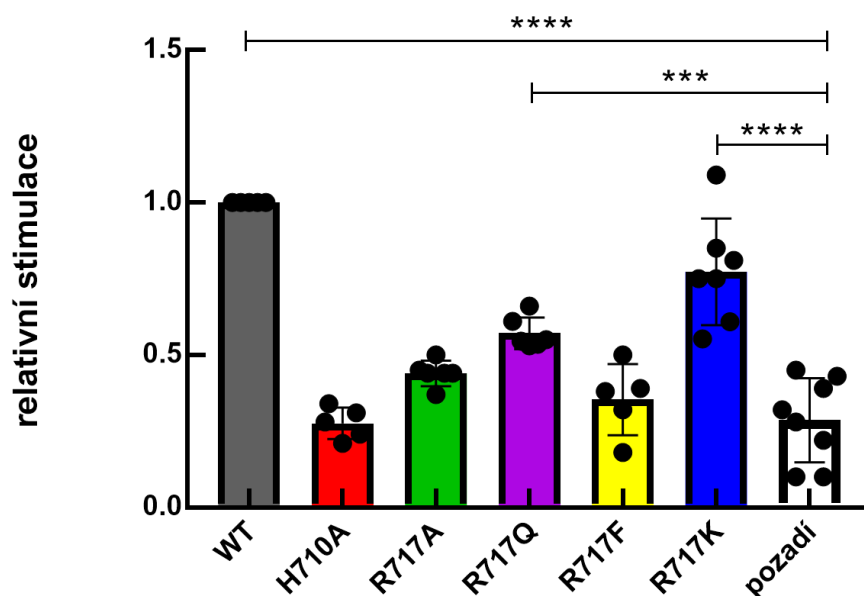
Analýza míry autofosforylace receptorů probíhala metodou Western blot za použití primárních protilátek proti fosforylovaným konzervativním tyrozinovým zbytkům Tyr1150 a Tyr1151 β -podjednotek IR-A (IR-A číslování) (oblast detekce 95 kDa) viz obr. 43 (A). Výsledky byly normalizovány na celkové množství receptorů (primární protilátka proti β -podjednotce IR - oblast detekce 95 kDa) viz obr. 43 (B). Nanáška vzorků byla u obou gelů kontrolována vizualizací aktinu (oblast detekce 42 kDa). Míra stimulace byla určena podílem intenzity signálu fosforylovaných β podjednotek IR-A k intenzitám celkových IR-A β podjednotek alespoň ze tří opakování.

Byl zkoumán rozdíl signálu fosforylace stimulovaných a nestimulovaných vzorků. Oproti stimulačním zkouškám s variantami IGF-1R zde byl pozorován vyšší signál pozadí viz obr. 43. Pouze varianty WT IR-A, R717Q a R717K signifikantně překročily míru fosforylace vůči pozadí viz obr. 44. Ostatní varianty vykazovaly po stimulaci signál srovnatelný s pozadím, lze tedy říci, že nedošlo k aktivaci receptorů.



Obr. 43: Reprezentativní výsledek stimulační zkoušky variant IR-A 10 nM inzulinem (HI) po dobu 10 min analyzované pomocí metody blot. (A) vizualizace fosforylace β podjednotek variant IR-A ve srovnání stimulovaných (+) a nestimulovaných (-) vzorků; (B) vizualizace exprese variant IR-A z expresního vektoru pCMV3 po tranzientní transfekci R- buněk.

Porovnání stimulace variant IR-A



Obr. 44: Výsledek stimulačních zkoušek v porovnání všech variant IR-A vztažených na stimulovaný WT IR-A. Míra fosforylace β podjednotek IR-A byla u mutantní varianty H710A snížena na 27 %, R717A na 44 %, R717Q na 57 %, R717F na 35 % a R717K na 77 %. Avšak průměr hodnot pozadí se pohyboval na přibližně 29 %. Tedy pouze varianty WT, R717Q a R717K překročily významně signál pozadí. Poměry stimulace mutantních variant a WT IR-A byly určované zvlášť v každém opakování. Statistická analýza byla provedena ANOVA testem v intervalu spolehlivosti 95 % softwarem GraphPad Prism. Signifikantní výsledek je označen (*), kde *** $p = 0,0001$ a **** $p < 0,0001$.

7 Diskuse

Receptory pro inzulín (IR) i IGF-1 (IGF-1R) jsou transmembránové glykoproteiny, které jsou známé již přes 40 let. Od té doby se vědci snaží rozluštit principy interakce inzulinu a IGF-1 s jejich receptory. V posledních letech byl učiněn velký pokrok v porozumění vazby těchto ligandů především díky využití kryoelektronové mikroskopie (Cryo-EM) a proteinové krystalografie zkoumajících struktury proteinů. Nicméně strukturní studium těchto receptorů je komplikováno jejich velikostí, transmembránovým charakterem a přítomností velkého množství glykosylací v extracelulární části, která je zodpovědná právě za vazbu hormonů. Kvůli tomu jsou některé aspekty interakcí ligandů s receptory stále nejasné. Zejména dynamické přechody mezi receptory bez ligandů a jejich aktivním stavem nejsou zcela objasněny. U obou receptorů se na vazbě ligandů podílí obzvláště domény L1 a α CT. Tato práce se zaměřuje na zkoumání interakcí aminokyselinových zbytků v α CT doménách IR-A a IGF-1R s inzulinem a IGF-1 pomocí místně specifické mutagenese způsobující aminokyselinové záměny v primárních strukturách receptorů.

Předchozí práce zabývající se lokalizováním a charakterizací vazby ligandů využívaly jako model především purifikované receptorové ektodomény (Mynarcik *et al.*, 1996, 1997b; Whittaker *et al.*, 2001). Proto byly v této práci použity dva modely pro zkoumání vlastností receptorových variant. Prvním použitým modelem byly celkové receptorové varianty exprimované v myších embryonálních fibroblastech s disrupcí genu pro IGF-1R (tzv. R- buňky) a relativně nízkou expresí IR (Sell *et al.*, 1993, 1994). Jako druhý model byly zvoleny purifikované ektodomény receptorových variant fúzované s fluorescenčním proteinem mCherry. Fluorescenční vlastnosti tohoto proteinu byly využity pro kvantifikaci purifikovaných receptorových ektodomén dle (Duellman *et al.*, 2015). Ektodomény byly imobilizovány na adsorbční destičce pomocí syntetických protilátek iBodies® (IOCB Tech, ČR) podle metodiky předchozí práce z naší laboratoře (Potalitsyn *et al.*, 2020).

7.1 Vlastnosti mutantních variant IGF-1R

Naše laboratoř se dlouhodobě zabývá studiem inzulinových a IGF 1 a 2 analogů. Na základě předchozí studie z naší laboratoře, která ukázala sníženou schopnost vazby analogů IGF-1 s aminokyselinovou záměnou na pozici Glu58, byl vysloven předpoklad, že

by se arginin 704 IGF-1 receptoru mohl účastnit vazby IGF-1 zrovna interakcí s glutaminem 58 (Macháčková *et al.*, 2019). Tato interakce byla navržena podle krystalografické strukturní studie komplexu IGF-1 s IGF-1R (Xu *et al.*, 2018). Pro ověření, zda je Arg704 IGF-1R důležitý pro vazbu IGF-1, byly v prvním kroku vytvořeny místně specifickou mutagenézí mutantní varianty IGF-1R R704A a kontrolní varianta IGF-1R H697A, která již byla ve vazbě IGF-1 charakterizována (Mynarcik *et al.*, 1997b; Whittaker *et al.*, 2001). Rolí Arg704 se dřívější mutagenní studie nezabývaly (Mynarcik *et al.*, 1997b; Whittaker *et al.*, 2001). Aminokyselinové záměny za alanin byly zvoleny z důvodu jeho odlišných vlastností oproti přirozeným aminokyselinovým zbytkům. Alanin je malá a chemicky inertní aminokyselina, což znamená, že pokud jsou původní aminokyselinové zbytky svými vlastnostmi důležité pro vazbu IGF-1, jejich náhrada se projeví negativně. Vlastnosti mutantních variant IGF-1 byly srovnávány s vlastnostmi WT receptoru.

Obě mutantní varianty společně s WT IGF-1R byly podrobeny saturačním vazebným zkouškám s radioaktivně značeným ^{125}I -IGF-1 na modelech celkových receptorů i purifikovaných ektodomén. Rovnovážná disociační konstanta (K_D) celkového WT receptoru IGF-1R dosahovala hodnoty $K_D = 0,09 \pm 0,01$ nM a K_D jeho ektodomény byla určena na $K_D = 0,53 \pm 0,19$ nM. Tyto hodnoty se shodují s dřívější literaturou, kde se K_D celkového receptoru pohybuje v rozmezí 0,02 – 0,3 nM a v rozmezí 0,3 – 0,9 nM pro receptorové ektodomény (Whittaker *et al.*, 2001; Surinya *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2020). Tedy námi prováděná měření poskytují relevantní výsledky a získané hodnoty potvrzují nižší afinitu IGF-1 ektodomén vůči celkovým receptorům.

Aminokyselinová záměna argininu na pozici 704 IGF-1R za alanin způsobila snížení relativní hodnoty K_D vůči WT receptoru na přibližně 30 %. Což znamená, že afinita varianty R704A je nižší oproti WT IGF-1R. Relativní hodnoty B_{\max} klesly signifikantně u celkového receptoru na přibližně 80 %, avšak u modelu receptorových ektodomén bylo snížení relativní B_{\max} na 86 % nesignifikantní oproti WT receptoru. Vazba na celkových receptorech byla měřena v menším rozsahu, přidání vyšších koncentrací ^{125}I -IGF-1 do měření by mohlo vést ke zvýšení hodnot B_{\max} , protože kvůli zvýšené K_D pravděpodobně nedosáhly receptory rovnovážného nasyceného stavu. Proto se domníváme, že obsazenost vazebných míst této mutantní varianty nebyla ovlivněna.

Překvapivější výsledky přinesly vazebné saturační zkoušky s mutantní variantou H697A. Hodnoty K_D této varianty se zvýšily přibližně čtyřnásobně oproti WT IGF-1R, což odpovídá předchozím mutagenním studiím, kde pozorovali zvýšení 5,6násobně

(Mynarcik *et al.*, 1997b; Whittaker *et al.*, 2001). Nicméně hodnoty K_D v těchto studiích byly vypočítávány z kompetitivních vazebných zkoušek, ve kterých bylo měřeno vytěsňování radioligandu neradioaktivním ligandem. V této práci byly naopak použity saturační vazebné zkoušky, díky kterým bylo možné jednodušeji určit také hodnoty maximální vazby. B_{max} H697A kleslo na 50 % oproti WT IGF-1R. Nejjednodušším vysvětlením by bylo snížení počtu vazebných míst na receptoru. Takové chování bylo pozorováno při mutaci sekundárního vazebného místa IR, kdy se na receptor vázaly 2 inzulíny do primárních vazebných míst namísto celkových čtyř molekul inzulínu (Uchikawa *et al.*, 2019). Cryo-EM studie ukazují, že na IGF-1R v aktivní konformaci je vázána pouze jedna molekula IGF-1R, a to i v případě nadbytku ligandu (Xu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Zhang, Wei, *et al.*, 2022). Plná aktivace IGF-1R je tedy pravděpodobně dostatečně stimulována pouze jednou molekulou IGF-1. Nicméně z kinetických studií vyplývá, že stejně jako u IR, je vlastností IGF-1R negativní kooperativita, tedy předpokládá vazbu více než jednoho ligandu (Christoffersen *et al.*, 1994). Princip negativní kooperace spočívá ve zrychlení disociace prvního navázaného ligandu vlivem kompetitivní vazby druhého ligandu do jiného vazebného místa. Alternativa vazby dvou IGF-1 na receptor v aktivní konformaci nebyla zachycena. Pravděpodobně se jedná o velice nestabilní strukturu, která tvoří přechodový stav mezi ligandem vázaným do vazebného místa na jedné polovině receptoru a ligandem vázaným do vazebného místa na druhé polovině. Nejnovější strukturní studie byly schopné vizualizovat IGF-1R s vazbou dvou ligandů, ale zdá se, že jsou tyto konformace IGF-1R spíše neaktivní a podstata vazby stále není zřejmá (Li, Wu, *et al.*, 2022; Moreau *et al.*, 2022).

Pozorované snížení počtu vazebných míst u mutantní varianty H697A IGF-1R jsme se pokusili vysvětlit pomocí studia publikovaných struktur v aktivní konformaci. Asymetrická struktura IGF-1R s jedním navázaným IGF-1 znázorňuje His697 α CT v blízkosti helixu B domény IGF-1 (Li *et al.*, 2019). Oproti tomu His697' druhé α CT', je nápadně vytrčený na okraji komplexu α CT' s L1 doménou (viz kapitola Přílohy obr. 45). Dle našeho názoru by se His697 IGF-1R mohl účastnit ve vazbě druhé molekuly IGF-1 na receptor. Aminokyselinová záměna by tak způsobila narušení této interakce a zabránění vazby druhé molekuly, což by snížilo počet vazebných míst, které by se projevilo snížením hodnoty B_{max} na polovinu.

Vzhledem k tomu, že je míra autofosforylace u obou mutantních variant téměř shodně nižší (přibližně na 60 %) oproti WT receptoru, domníváme se, že toto snížení je

způsobeno spíše nižší afinitou mutantních variant k IGF-1 než snížením počtu vazebných míst.

Tato práce potvrzuje zapojení His697 i Arg704 IGF-1R ve vazbě IGF-1.

7.2 Vlastnosti mutantních variant IR-A

Díky homologii IGF-1R a IR byly pro porovnání vytvořeny analogicky mutantní varianty IR-A R717A, R717Q, R717F a následně R717K. Jako kontrolní byla zvolena mutantní varianta IR H710A, která je ekvivalentní k H697A IGF-1R. Již dříve bylo ukázáno, že His710 IR je kruciólní pro vazbu inzulínu, a že mutantní varianta H710A nevykazuje žádnou vazbu inzulínu, ani aktivaci receptoru po jeho stimulaci inzulínem (Mynarcik *et al.*, 1996; Whittaker & Whittaker, 2005; Whittaker *et al.*, 2012; Menting *et al.*, 2013). Tento výsledek jsme prokázali rovněž v této práci.

Mynarcik *et al.* (1996) publikovali studii zabývající se mutagenezí C-terminální domény α -podjednotky inzulínového receptoru. Součástí byla i mutantní varianta R717A, u které neshledali žádné signifikantní změny ve vazbě inzulínu oproti WT receptoru. V této studii využívali vazebné zkoušky na receptorových ektodoménách přichycených na destičce monoklonálními protilátkami proti inzulínovému receptoru 18-44, které se váží na N-konec β podjednotky IR (konkrétně rozeznávají aminokyselinové zbytky 765-770) (Soos *et al.*, 1986; Prigent *et al.*, 1990). Monoklonální protilátky 18-44 se sice neváží v blízkosti vazebného místa, avšak bylo prokázáno, že ovlivňují vazbu inzulínu k jeho receptoru (Taylor *et al.*, 1987). Proto by mohly být původní výsledky mutantní varianty R717A IR zkreslené. Stejní autoři později publikovali práci, kde zkoumali vazebné vlastnosti mutantních variant α CT v IR také na modelu celkových receptorů, avšak varianta R717A již zahrnuta nebyla (Whittaker & Whittaker, 2005).

Arg717 celkového IR rovněž nebyl strukturními studii vizualizován v komplexu receptor-ligand pravděpodobně z důvodu, že se vyskytuje poblíž konce α CT, který je již značně pohyblivý. Arg717 byl pozorován v blízkosti inzulínových zbytků GluA17, ArgB22 a AsnA21 v krystalové struktuře minimalizovaného IR (tzv. μ IR) (Xiong *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 2022).

Stejně jako u IGF-1R byla zvolena záměna za alanin. Dále byla provedena záměna Arg717 za glutamin, který poskytuje polární amidovou skupinu jako arginin, ale nemá bazické vlastnosti. Následně byl zvolen fenylalanin, který má aromatické jádro a mohl by se účastnit hydrofobních interakcí. Konečně byla přidána záměna za lysin, který má

obdobné vlastnosti jako arginin, poskytuje bazické vlastnosti a jeho uhlíkový řetězec je srovnatelně dlouhý s argininovým.

Pro vyhodnocení saturačních vazebných zkoušek byl použit matematický model nelineární regrese pro jedno vazebné místo. Jsme si vědomi toho, že tento model neodpovídá skutečnému chování vazby ligandů na receptory. Avšak komplexnější matematický model, který byl založený na principu harmonického oscilátoru, očekával existenci dvou vazebných míst na každém monomeru IR s podmínkou, že může docházet k obsazenosti tří vazebných míst (ze čtyř celkem) a čtvrté je blokováno spřažením primárního a sekundárního vazebného místa (Kiselyov *et al.*, 2009). Nicméně pravděpodobně ani tento model nepopisuje správně reálnou kinetiku IR, protože byly představeny struktury s čtyřmi nezávisle navázanými inzulinými (Gutmann *et al.*, 2020). Proto byl pro určení základních vlastností receptorů zvolený velice zjednodušený model, hodnoty B_{\max} a K_D byly popisovány v saturevaném stavu receptorů bez ohledu na komplexitu vazebných přechodů. Zjednodušeně byly uvažovány dva stavy: neváže ligand/je plně satureován.

U WT IR-A byly určeny hodnoty $K_D = 0,2 \pm 0,08$ nM pro celkový IR-A, což je v souladu s literaturou, kde se K_D IR-A pohybuje v rozmezí 0,09 – 0,5 nM. Současně byla dle předpokladů snížena afinita receptorových ektodomén na $K_D = 0,61 \pm 0,27$ nM (obvykle 2-6 nM) (Schäffer, 1994; Whittaker & Whittaker, 2005; Knudsen *et al.*, 2011; Weis *et al.*, 2018). Avšak námi purifikované ektodomény se pravděpodobně kvůli přítomnosti mCherry a imobilizaci chovají více jako celkové receptory.

Podle očekávání vedla aminokyselinová záměna histidinu na pozici 710 IR-A k razantnímu poklesu vazby inzulinu na receptor, přestože jeho exprese byla srovnatelná s WT IR-A. Hodnota B_{\max} poklesla na necelých 10 % vůči WT variantě u obou použitých modelů a vazebná křivka kopírovala hodnoty nespecifické vazby. Zároveň po stimulaci inzulinu nedocházelo u této mutantní varianty k aktivaci. Potvrzujeme tak, že mutantní varianta H710A IR-A má kompletně porušenou schopnost vazby inzulinu shodně jak bylo pozorováno dříve (Mynarcik *et al.*, 1996, 1997b; Whittaker & Whittaker, 2005).

Velice nečekaný výsledek přinesly saturační vazebné zkoušky s mutantními variantami IR-A na pozici Arg717, protože dříve byl tento aminokyselinový zbytek považován za nedůležitý pro vazbu inzulinu (Mynarcik *et al.*, 1996). Varianty R717A, R717Q a R717F vykazovaly stejně dramatický pokles hodnoty B_{\max} po vazbě inzulinu jako

varianta H710A. Žádná z těchto mutantních variant nepřesáhla signifikantně vazbu naměřenou na kontrolních netransfekovaných R- buňkách. Naměřené hodnoty vazby radiooligandu těchto mutantních variant byly velice blízko hodnotám nespecifické vazby, proto je vypočtené hodnoty B_{max} a K_D potřeba interpretovat obezřetně a pokládat je spíše jako orientační. Mutantní varianta R717Q, ač nesignifikantně oproti kontrole, vykazovala vyšší naměřené hodnoty u celkových receptorů, a zároveň se hodnoty K_D přibližovaly WT receptoru. Tato mutantní varianta, na rozdíl od R717A a R717F, také signifikantně podléhala autofosforylaci β podjednotek po stimulaci inzulínem, přestože je míra fosforylace nižší než u WT receptoru. Proto by polární vlastnosti či přítomnost amidové skupiny této aminokyseliny mohly hrát roli ve vazbě inzulínu.

Pouze mutantní varianta R717K, která byla dodatečně připravena na základě překvapivých výsledků, navrátila IR-A schopnost vázat inzulín. Afinita této mutantní varianty byla přibližně třikrát nižší ve srovnání s WT IR-A. Díky tomu, dochází po stimulaci inzulínem u této mutantní varianty k aktivaci a autofosforylaci β podjednotek, leč je míra fosforylace o přibližně 20 % nižší než u WT receptoru. Z toho je možné usuzovat, že je Arg717 IR-A zásadní pro vazbu inzulínu a tato interakce je pravděpodobně založena na bazické podstatě argininu.

Aktivace IR se pravděpodobně liší od aktivace IGF-1R. Pro aktivaci IGF-1R je dostačující vazba jedné molekuly IGF-1, oproti tomu IR může vázat až čtyři molekuly inzulínu (Li *et al.*, 2019; Gutmann *et al.*, 2020). Přesný počet molekul inzulínu a jejich uspořádání na receptoru důležité pro aktivaci stále nejsou zcela objasněny. Dosud nebyla role Arg717 IR ve vazbě inzulínu považována za důležitou. Ve strukturách primárního vazebného místa často není možno tento arginin zobrazit, protože je volně pohyblivý. Nicméně při zkoumání struktury IR s navázanými inzulíny v sub-saturační koncentraci inzulínu byla nalezena asymetrická struktura IR ve tvaru T, kdy jeden z inzulínů, který je navázaný v sekundárním vazebném místě, kontaktuje také primární vazebné místo interakcí s α CT doménou (Li, Park, *et al.*, 2022) (viz kapitola Přílohy obr. 46). Této interakce se pravděpodobně účastní aminokyselinové zbytky Tyr704, Asp707, His710, Phe714 a Arg717 α CT domény. Právě Arg717 byl popsán v nápadné blízkosti AsnA21 inzulínu, který je tak vázán kombinací obou vazebných míst (Li, Park, *et al.*, 2022). Předpokládá se, že prvním místem kontaktu inzulínu je sekundární vazebné místo, protože je prostorově přístupnější (Weis *et al.*, 2018; Nielsen *et al.*, 2022). Usuzuje se, že je inzulín ze sekundárního vazebného místa díky dynamickým fluktuacím receptorových

domén zachycen α CT doménou druhého monomeru a rotací translokován tak do primárního vazebného místa (Nielsen *et al.*, 2022). Což podporují práce zkoumající analogy inzulínů jako je například GluA17, který se účastní vazby inzulínu do sekundárního vazebného místa (Gutmann *et al.*, 2020). Aminokyselinová záměna glutaminu A17 za alanin způsobuje sníženou afinitu k sekundárnímu vazebnému místu, ale nenarušenou k primárnímu vazebnému místu (Nielsen *et al.*, 2022). Záměna za glutaminu A17 za histidin zapříčiňuje dokonce úplné narušení vazby tohoto inzulínového analogu k IR-A, tudíž ani nedochází k aktivaci receptoru (Macháčková *et al.*, 2019). Je zajímavé, že podle vazby inzulínu v hybridním vazebném místě asymetrických T struktur IR je možné pozorovat zmiňovanou rotaci inzulínu kolem α CT domény, protože poloha glutaminu A17 inzulínu v primárním vazebném místě je přibližně o 60° natočená oproti inzulínu v sekundárním vazebném místě (Li, Park, *et al.*, 2022).

Vzhledem k tomu, že mutantní varianty R717A, R717Q i R717F způsobují kompletní porušení vazby inzulínu k IR-A, domníváme se, že by se arginin 717 mohl účastnit iniciačního procesu zachycení molekuly inzulínu ze sekundárního vazebného místa a jeho přesunu do primárního vazebného místa. Tento proces je pravděpodobně poháněn iontovými interakcemi, které arginin nabízí. Z toho důvodu má mutantní varianta R717K navracenou schopnost vazby i aktivace receptoru.

8 Závěr

Cílem této práce bylo ověřit roli argininu 704 IGF-1R a ekvivalentně argininu 717 IR-A ve vazbě ligandů. Pro dosažení tohoto cíle byly vytvořeny mutantní varianty H697A a R704 IGF-1R, ekvivalentně H710A, R717A, R717Q, R717F a nakonec R717K IR-A, které byly dále exprimovány v buněčné linii myších embryonálních fibroblastů s disrupcí genu *IGF-1R*. Jako druhý model byly exprimovány a purifikovány receptorové ektodomény těchto mutantních variant receptorů z buněčné linie Hek293-6E.

Pomocí saturačních vazebných zkoušek s radioaktivně značenými ligandy bylo zjištěno, že mutace argininu 704 IGF-1R způsobuje snížení afinity k IGF-1 oproti WT receptoru. Zároveň je také u této mutantní varianty snižena míra autofosforylace po stimulaci přirozeným IGF-1. Z toho usuzujeme, že se arginin 704 IGF-1R účastní vazby IGF-1. Kromě toho tato práce přinesla nové poznatky role histidinu 697 IGF-1R. Mutantní varianta H697A IGF-1R vykazuje snížení maximální vazby o polovinu v porovnání s WT IGF-1R, tedy byl u této mutantní varianty pravděpodobně snížen počet vazebných míst. To potvrzuje přítomnost dvou vazebných míst na IGF-1R.

Analogicky k IGF-1R byly zkoumány vlastnosti mutantních variant IRA. Překvapivý výsledek přinesly saturační vazebné zkoušky právě mutantních variant s aminokyselinovými záměnami argininu 717. Záměna argininu za alanin, glutamin či fenylalanin způsobila dramatický pokles vazby inzulínu k těmto mutantním variantám na roveň kontrolních netransfekovaných R⁻ buněk. Pouze mutantní variantě R717K IR-A byla navracena schopnost vazby a aktivace receptoru. Předpokládáme tedy, že bazické vlastnosti argininu 717 IR-A mají krucální úlohu ve vazbě inzulínu.

9 Seznam literatury

Abbott, A.M., Bueno, R., Pedrini, M.T., Murray, J.M., et al. (1992) Insulin-like growth factor I receptor gene structure, *Journal of Biological Chemistry*, 267(15), pp. 10759–10763. doi:10.1016/s0021-9258(19)50083-7.

Abuzzahab, M.J., Schneider, A., Goddard, A., Grigorescu, F., et al. (2003) IGF-I Receptor Mutations Resulting in Intrauterine and Postnatal Growth Retardation, *The New England journal of medicine*, 349(23), pp. 2211–2222. doi:10.1056/NEJMoa010107.

***Adams, T.E., Epa, V.C., Garrett, T.P.J. & Ward, C.W.** (2000) Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(7), pp. 1050–1093. doi:10.1007/PL00000744.

Al-Hasani, H., Eisermann, B., Tennagels, N., Magg, C., et al. (1997) Identification of Ser-1275 and Ser-1309 as autophosphorylation sites of the insulin receptor, *FEBS Letters*, 400(1), pp. 65–70. doi:10.1016/S0014-5793(96)01342-7.

Ardon, O., Procter, M., Tvrđik, T., Longo, N., et al. (2014) Sequencing analysis of insulin receptor defects and detection of two novel mutations in INSR gene, *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 1(1), pp. 71–84. doi:10.1016/j.ymgmr.2013.12.006.

Asai, S., Žáková, L., Selicharová, I., Marek, A., et al. (2021) A radioligand receptor binding assay for measuring of insulin secreted by MIN6 cells after stimulation with glucose, arginine, ornithine, dopamine, and serotonin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2021 413:17, 413(17), pp. 4531–4543. doi:10.1007/S00216-021-03423-3.

***Aviles-Olmos, I., Limousin, P., Lees, A. & Foltynie, T.** (2013) Parkinson's disease, insulin resistance and novel agents of neuroprotection, *Brain: A journal of Neurology*, 136(Pt 2), pp. 374–384. doi:10.1093/brain/aws009.

Backer, J.M., Myers Jnr., M.G., Shoelson, S.E., Chin, D.J., et al. (1992) Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation, *EMBO Journal*, 11(9), pp. 3469–3479. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05426.x.

Bailyes, E.M., Nave, B.T., Soos, M.A., Orr, S.R., et al. (1997) Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: Quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting, *Biochemical Journal*, 327(1), pp. 209–215. doi:10.1042/bj3270209.

Baltensperger, K., Kozma, L.M., Cherniack, A.D., Klarlund, J.K., et al. (1993) Binding of the Ras activator son of sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes, *Science*, 260(5116), pp. 1950–1952. doi:10.1126/science.8391166.

Banks, W.A., Jaspan, J.B., Huang, W. & Kastin, A.J. (1997) Transport of Insulin Across the Blood-Brain Barrier: Saturability at Euglycemic Doses of Insulin, *Peptides*, 18(9), pp. 1423–1429. doi:10.1016/s0196-9781(97)00231-3.

Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., et al. (1922) Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus., *Canadian Medical Association journal*, 12(3), pp. 141–6.

Bayne, M.L., Applebaum, J., Underwood, D., Chicchi, G.G., et al. (1989) The C region of human insulin-like growth factor (IGF) I is required for high affinity binding to the type 1 IGF receptor, *Journal of Biological Chemistry*, 264(19), pp. 11004–11008. doi:10.1016/s0021-9258(18)60418-1.

Beck, K.D., Powell-Braxton, L., Widmer, H.R., Valverde, J., et al. (1995) Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons, *Neuron*, 14(4), pp. 717–730. doi:10.1016/0896-6273(95)90216-3.

Benecke, H., Flier, J.S. & Moller, D.E. (1992) Alternatively spliced variants of the insulin receptor protein. Expression in normal and diabetic human tissues, *Journal of Clinical Investigation*, 89(6), pp. 2066–2070. doi:10.1172/JCI115819.

Benedict, C., Hallschmid, M., Hatke, A., Schultes, B., et al. (2004) Intranasal insulin improves memory in humans, *Psychoneuroendocrinology*, 29(10), pp. 1326–1334. doi:10.1016/j.psyneuen.2004.04.003.

Blanquart, C., Achi, J. & Issad, T. (2008) Characterization of IRA/IRB hybrid insulin receptors using bioluminescence resonance energy transfer, *Biochemical Pharmacology*, 76(7), pp. 873–883. doi:10.1016/j.bcp.2008.07.027.

Blundell, T.L., Phil, D., Cutfield, J.F., Cutfield, S.M., et al. (1972) Three-Dimensional Atomic Structure of Insulin and Its Relationship to Activity, *Diabetes*, 72(2 Suppl), pp. 492–505. doi:10.2337/diab.21.2.s492.

Blundell, T.L., Bedarkar, S., Rinderknecht, E. & Humbelt, R.E. (1978) Insulin-like growth factor: A model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(1), pp. 180–184. doi:10.1073/pnas.75.1.180.

Brissenden, J., Ullrich, A. & Francke, U. (1984) Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor, *Nature*, 310(5980), pp. 781–784. doi:10.1038/310781a0.

***Brisson, B.K. & Barton, E.R.** (2013) New modulators for IGF-I activity within IGF-I processing products, *Frontiers in Endocrinology*. doi:10.3389/fendo.2013.00042.

Brüning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., et al. (2000) Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction, *Science*, 289(5487), pp. 2122–2125. doi:10.1126/science.289.5487.2122.

***Buscà, R., Pouysségur, J. & Lenormand, P.** (2016) ERK1 and ERK2 map kinases: Specific roles or functional redundancy?, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(JUN), pp. 1–23. doi:10.3389/fcell.2016.00053.

Cabail, M.Z., Li, S., Lemmon, E., Bowen, M.E., et al. (2015) The insulin and IGF1 receptor kinase domains are functional dimers in the activated state, *Nature Communications*, 6, p. 6406. doi:10.1038/ncomms7406.

Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., et al. (2002) Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid- β levels, *Nature Medicine*, 8(12), pp. 1390–1397. doi:10.1038/nm793.

Cascieri, M.A., Chicchi, G.G., Applebaum, J., Haves, N.S., et al. (1988) Mutants of Human Insulin-like Growth Factor I with Reduced Affinity for the Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor, *Biochemistry*, 27(9), pp. 3229–3233. doi:10.1021/bi00409a016.

Chan, J.M., Stampfer, M.J., Giovannucci, E., Gann, P.H., et al. (1998) Plasma Insulin-Like Growth Factor-I and Prostate Cancer Risk: A Prospective Study, *Science*, 279(January), pp. 563–566. doi:10.1126/science.279.5350.563.

***Chan, S.J., Nagamatsu, S., Cao, Q.-P. & Steiner, D.F.** (1992) Structure and evolution of insulin and insulin-like growth factors in chordates, *Progress in Brain Research*, 92, pp. 15–24. doi:10.1016/s0079-6123(08)61161-9.

Cheng, C.M., Tseng, V., Wang, J., Wang, D., et al. (2005) Tau is hyperphosphorylated in the insulin-like growth factor-I null brain, *Endocrinology*, 146(12), pp. 5086–5091. doi:10.1210/EN.2005-0063.

Chernausek, S.D., Jacobs, S. & Van Wyk, J.J. (1981) Structural Similarities between Human Receptors for Somatomedin C and Insulin: Analysis by Affinity Labeling, *Biochemistry*, 20(26), pp. 7345–7350. doi:10.1021/bi00529a004.

Christoffersen, C.T., Bornfeldt, K.E., Rotella, C.M., Gonzales, N., et al. (1994) Negative cooperativity in the insulin-like growth factor-I receptor and a chimeric IGF-1/insulin receptor, *Endocrinology*, 135(1), pp. 472–475. doi:10.1210/endo.135.1.8013387.

Craft, S., Peskind, E., Schwartz, M.W., Schellenberg, G.D., et al. (1998) Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease Relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype, *Neurology*, 50(1), pp. 164–168. doi:0.1212/wnl.50.1.164.

Croll, T.I., Smith, B.J., Margetts, M.B., Whittaker, J., et al. (2016) Higher-Resolution Structure of the Human Insulin Receptor Ectodomain: Multi-Modal Inclusion of the Insert Domain, *Structure*, 24(3), pp. 469–476. doi:10.1016/j.str.2015.12.014.

Cross, D.A.E., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., et al. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B, *Nature*, 378(6559), pp. 758–789. doi:10.1038/378785a0.

Cuatrecasas, P. (1972) Properties of the insulin receptor isolated from liver and fat cell membranes., *Journal of Biological Chemistry*, 247(7), pp. 1980–1991. doi:10.1016/s0021-9258(19)45480-x.

Datta, S.R., Dudek, H., Xu, T., Masters, S., et al. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery, *Cell*, 91(2), pp. 231–241. doi:10.1016/S0092-8674(00)80405-5.

***Daughaday, W.H., Hall, K., Salmon, W.D., van den Brande, J.L., et al.** (1987) Letter to the Editor: On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors, *Endocrinology*, 121(5), pp. 1911–1912. doi:10.1210/endo-121-5-1911.

***Daughaday, W.H.** (2000) Growth hormone axis overview - somatomedin hypothesis, *Pediatric Nephrology*, 14(4), pp. 537–540. doi:10.1007/s004670000334.

Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D.R., Hue, L., et al. (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades, *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), pp. 17269–17275. doi:10.1074/jbc.272.28.17269.

***Dodson, G. & Steiner, D.** (1998) The role of assembly in insulin's biosynthesis, *Current Opinion in Structural Biology*, 8(2), pp. 189–194. doi:10.1016/S0959-440X(98)80037-7.

Duellman, T., Burnett, J. & Yang, J. (2015) Quantitation of secreted proteins using mCherry fusion constructs and a fluorescent microplate read, *Analytical biochemistry*, 473, pp. 34–40. doi:10.1016/j.ab.2014.12.010.

Duguay, S.J., Lai-Zhang, J. & Steiner, D.F. (1995) Mutational analysis of the insulin-like growth factor I prohormone processing site, *The Journal of biological chemistry*, 270(29), pp. 17566–17574. doi:10.1074/JBC.270.29.17566.

Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., et al. (1985) The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone-activated transmembrane signalling, *Cell*, 40(4), pp. 747–758. doi:10.1016/0092-8674(85)90334-4.

Elleman, T.C., Frenkel, M.J., Hoyne, P.A., McKern, N.M., et al. (2000) Mutational analysis of the N-linked glycosylation sites of the human insulin receptor, *Biochemical Journal*, 347(Pt 3), p. 771.

Ellis, L., Clauser, E., Morgan, D.O., Edery, M., et al. (1986) Replacement of insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 compromises insulin-stimulated kinase activity and uptake of 2-deoxyglucose, *Cell*, 45(5), pp. 721–732. doi:10.1016/0092-8674(86)90786-5.

Eskridge, E.M. & Shields, D. (1983) Cell-free processing and segregation of insulin precursors, *Journal of Biological Chemistry*, 258(19), pp. 11487–11491. doi:10.1016/s0021-9258(17)44253-0.

Fang, P., Cho, Y.H., Derr, M.A., Rosenfeld, R.G., et al. (2012) Severe short stature caused by novel compound heterozygous mutations of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(2), pp. 243–247. doi:10.1210/jc.2011-2142.

Favelyukis, S., Till, J.H., Hubbard, S.R. & Miller, W.T. (2001) Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase, *Nature Structural Biology*, 8(12), pp. 1058–1063. doi:10.1038/nsb721.

Federici, M., Porzio, O., Zucaro, L., Fusco, A., et al. (1997) Distribution of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in human tissues, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 129(2), pp. 121–126. doi:10.1016/S0303-7207(97)04050-1.

Fernández de Sevilla, M.E., Pignatelli, J., Zegarra-Valdivia, J.A., Mendez, P., et al. (2022) Insulin-like growth factor I mitigates post-traumatic stress by inhibiting AMP-kinase in orexin neurons, *Molecular psychiatry* [Preprint]. doi:10.1038/S41380-022-01442-9.

Fisher, W.E., Boros, L.G. & Schirmer, W.J. (1996) Insulin promotes pancreatic cancer: evidence for endocrine influence on exocrine pancreatic tumors, *Journal of surgical research*, 63, pp. 310–313. doi:10.1006/jsre.1996.0266.

Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., et al. (1999) Insulin Receptor Isoform A, a Newly Recognized, High-Affinity Insulin-Like Growth Factor II Receptor in Fetal and Cancer Cells, *Molecular and Cellular Biology*, 19(5), pp. 3278–3288. doi:10.1128/mcb.19.5.3278.

Freychet, P., Roth, J. & Neville, D.M. (1971) Insulin receptors in the liver: specific binding of (¹²⁵ I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(8), pp. 1833–1837. doi:10.1073/pnas.68.8.1833.

Froesch, E.R., Burgi, H., Ramseier, E.B., Bally, P., et al. (1963) Antibody-Suppressible and Nonsuppressible Insulin-like Activities in Human Serum and their Physiologic Significance, *Journal of Clinical Investigation*, 42(11), pp. 1816–1834. doi:10.1172/JCI104866.

Fukushima, T., Nedachi, T., Akizawa, H., Akahori, M., et al. (2008) Distinct modes of activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate or insulin-like growth factor I play different roles in regulation of cyclin D1 and p27Kip1 in FRTL-5 cells, *Endocrinology*, 149(7), pp. 3729–3742. doi:10.1210/en.2007-1443.

Fukushima, T., Nakamura, Y., Yamanaka, D., Shibano, T., et al. (2012) Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Activity Bound to Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Receptor, which Is Continuously Sustained by IGF-I Stimulation, Is Required for IGF-I-induced Cell

Proliferation, *The Journal of Biological Chemistry*, 287(35), pp. 29713–29721. doi:10.1074/jbc.M112.393074.

Furlanetto, R.W., Dey, B.R., Lopaczynski, W. & Nissley, S.P. (1997) 14-3-3 Proteins interact with the insulin-like growth factor receptor but not the insulin receptor, *Biochemical Journal*, 327(3), pp. 765–771. doi:10.1042/bj3270765.

Gannagé-Yared, M.H., Klammt, J., Chouery, E., Corbani, S., et al. (2013) Homozygous mutation of the IGF1 receptor gene in a patient with severe pre- and postnatal growth failure and congenital malformations, *European Journal of Endocrinology*, 168(1), pp. 1–7. doi:10.1530/EJE-12-0701.

Gauguin, L., Delaine, C., Alvino, C.L., McNeil, K.A., et al. (2008) Alanine scanning of a putative receptor binding surface of insulin-like growth factor-I, *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), pp. 20821–20829. doi:10.1074/jbc.M802620200.

de Geest, N., Bonten, E., Mann, L., de Sousa-Hitzler, J., et al. (2002) Genotype-phenotype correlation in inherited severe insulin resistance, *Human Molecular Genetics*, 11(12), pp. 1465–1475. doi:10.1093/hmg/11.12.1465.

***Gorden, P., Arakaki, R., Collier, E. & Carpentier, J.L.** (1989) Biosynthesis and regulation of the insulin receptor, *Yale Journal of Biology and Medicine*, 62(5), pp. 521–531.

Grant, P.T., Coombs, T.L. & Frank, B.H. (1972) Differences in the nature of the interaction of insulin and proinsulin with zinc., *The Biochemical journal*, 126(2), pp. 433–440. doi:10.1042/bj1260433.

Growth, C., Carlberg, M., Dricu, A., Blegen, H., et al. (1996) Mevalonic Acid Is Limiting for N -Linked Glycosylation and Translocation of the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor to the Cell Surface, *The Journal of Biological Chemistry*, 271(29), pp. 17453–17462. doi:10.1074/jbc.271.29.17453.

Guthoff, M., Grichisch, Y., Canova, C., Tschritter, O., et al. (2010) Insulin modulates food-related activity in the central nervous system, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95(2), pp. 748–755. doi:10.1210/jc.2009-1677.

Gutmann, T., Kim, K.H., Grzybek, M., Walz, T., et al. (2018) Visualization of ligand-induced transmembrane signaling in the full-length human insulin receptor, *J. Cell Biol*, 217(5), pp. 1643–1649. doi:10.1083/jcb.201711047.

Gutmann, T., Schäfer, I.B., Poojari, C., Brankatschk, B., et al. (2020) Cryo-EM structure of the complete and ligand-saturated insulin receptor ectodomain, *Journal of Cell Biology*, 219(1). doi:10.1083/jcb.201907210.

***Hakuno, F. & Takahashi, S.I.** (2018) 40 years of IGF1: IGF1 receptor signaling pathways, *Journal of Molecular Endocrinology*, 61(1), pp. T69–T86. doi:10.1530/JME-17-0311.

Hammarsten, J. & Högestedt, B. (2005) Hyperinsulinaemia: A prospective risk factor for lethal clinical prostate cancer, *European Journal of Cancer*, 41(18), pp. 2887–2895. doi:10.1016/j.ejca.2005.09.003.

Harper, M.E., Ullrich, A. & Saunders, G.F. (1981) Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(7), pp. 4458–4460. doi:10.1073/PNAS.78.7.4458.

***Hendler, S., Bourgaux, P., Bourgaux-Ramoisy, D., Seiler, P., et al.** (1972) Somatomedin: Proposed Designation for Sulphation Factor, *Proc. US Nat. Acad. Sci*, 235(2), p. 761. doi:10.1038/235107a0.

Hintz, R.L., Clemmons, D.R., Underwood, L.E. & Van Wyk, J.J. (1972) Competitive binding of somatomedin to the insulin receptors of adipocytes, chondrocytes, and liver membranes., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), pp. 2351–2353. doi:10.1073/pnas.69.8.2351.

***Hoeflich, A., Iguchi, T., Nilsen, T.O., Duan, C., et al.** (2018) IGF-Binding Proteins: Why Do They exist and why Are There So Many?, *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00117.

Honegger, A. & Humbel, R.E. (1986) Insulin-like growth factors I and II in fetal and adult bovine serum., *Journal of Biological Chemistry*, 261(2), pp. 569–575. doi:10.1016/s0021-9258(17)36130-6.

Huang, X.F. & Arvan, P. (1994) Formation of the insulin-containing secretory granule core occurs within immature β -granules, *Journal of Biological Chemistry*, 269(33), pp. 20838–20844. doi:10.1016/s0021-9258(17)31898-7.

Huang, X.F. & Arvan, P. (1995) Intracellular Transport of Proinsulin in Pancreatic Beta-Cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility, *The Journal of biological chemistry*, 270(35), pp. 20417–20423. doi:10.1074/jbc.270.35.20417.

Huat, T.J., Ali Khan, A., Pati, S., Mustafa, Z., et al. (2014) IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells, *BMC Neuroscience*, 15(1), pp. 1–13. doi:10.1186/1471-2202-15-91.

Hubbard, S.R. (1997) Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog, *EMBO Journal*, 16(18), pp. 5572–5581. doi:10.1093/emboj/16.18.5572.

Hubbard, S.R., Wei, L. & Hendrickson, W.A. (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor, *Nature*, pp. 746–754. doi:10.1038/372746a0.

Jacobs, S., Kull, F.C. & Cuatrecasas, P. (1983) Monensin blocks the maturation of receptors for insulin and somatomedin C: Identification of receptor precursors, *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 80(5 I), pp. 1228–1231. doi:10.1073/pnas.80.5.1228.

Jansen, M., van Schiak, F.M.A., Ricker, A.T., Bullock, B., et al. (1983) Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor, *Nature*, 306(5943), pp. 609–611. doi:10.1038/306609a0.

Jauch-Chara, K., Friedrich, A., Rezmer, M., Melchert, U.H., et al. (2012) Intranasal Insulin Suppresses Food Intake via Enhancement of Brain Energy Levels in Humans, *Diabetes*, 61(9), p. 2261. doi:10.2337/DB12-0025.

Juul, A., Bang, P., Hertel, N.T., Main, K., et al. (1994) Serum IGF1 in 1030 healthy children, adolescents and adults, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 78(3), pp. 744–752. doi:10.1210/jcem.78.3.8126152.

Kanbur, N.Ö., Derman, O. & Kinik, E. (2005) The relationships between pubertal development, IGF-1 axis, and bone formation in healthy adolescents, *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 23(1), pp. 76–83. doi:10.1007/s00774-004-0544-9.

Kasuga, M., Hedo, J.A., Yamada, K.M. & Kahn, C.R. (1982) The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and a 210,000 possible proreceptor, *Journal of Biological Chemistry*, 257(17), pp. 10392–10399. doi:10.1016/s0021-9258(18)34032-8.

Kasuga, M., Karlsson, A.F. & Khan, R.C. (1982) Insulin Stimulates the Phosphorylation of the 95,000-Dalton Subunit of Its Own Receptor, *Science*, 215(4529), pp. 185–187. doi:10.1126/science.7031900.

Kavran, J.M., McCabe, J.M., Byrne, P.O., Connacher, M.K., et al. (2014) How IGF-1 activates its receptor, *eLife*, 3. doi:10.7554/eLife.03772.

Kern, W., Peters, A., Fruehwald-Schultes, B., Deininger, E., et al. (2001) Improving Influence of Insulin on Cognitive Functions in Humans, *Neuroendocrinology*, 74(4), pp. 270–280. doi:10.1159/000054694.

***Kim, S. & Kahn, C.R.** (1997) Insulin regulation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), mitogen-activated protein kinase and casein kinase in the cell nucleus: a possible role in the regulation of gene expression, *Biochemical Journal*, 323(1), pp. 621–627. doi:10.1042/bj3230621.

Kiselyov, V. V., Versteyhe, S., Gauguin, L. & De Meyts, P. (2009) Harmonic oscillator model of the insulin and IGF1 receptors' allosteric binding and activation, *Molecular Systems Biology*, 5(February 2009). doi:10.1038/msb.2008.78.

Klapper, D.G., Svoboda, M.E. & van Wyk, J.J. (1983) Sequence analysis of somatomedin-C: Confirmation of identity with insulin-like growth factor 1, *Endocrinology*, 112(6), pp. 2215–2217. doi:10.1210/endo-112-6-2215.

Knudsen, L., De Meyts, P. & Kiselyov, V. V. (2011) Insight into the molecular basis for the kinetic differences between the two insulin receptor isoforms, *Biochemical Journal*, 440(3), pp. 397–403. doi:10.1042/BJ20110550.

Knuppel, A., Fensom, G.K., Watts, E.L., Gunter, M.J., et al. (2021) Circulating insulin-like growth factor-I concentrations and risk of 30 cancers: Prospective analyses in UK biobank, *Cancer Research*, 80(18), pp. 4014–4021. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-1281.

Kovacina, K.S., Yonezawa, K., Brautigam, D.L., Tonks, N.K., et al. (1990) Insulin activates the kinase activity of the Raf-1 proto-oncogene by increasing its serine phosphorylation, *Journal of Biological Chemistry*, 265(21), pp. 12115–12118. doi:10.1016/s0021-9258(19)38315-2.

Kulik, G., Klippel, A. & Weber, M.J. (1997) Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt, *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), pp. 1595–1606. doi:10.1128/mcb.17.3.1595.

Lalić, N.M., Marić, J., Svetel, M., Jotić, A., et al. (2008) Glucose Homeostasis in Huntington Disease Abnormalities in Insulin Sensitivity and Early-Phase Insulin Secretion, *Archives of Neurology*, 65(4), pp. 476–480. doi:10.1001/archneur.65.4.476.

***Laron, Z.** (1999) The Essential Role of IGF-I: Lessons from the Long-Term Study and Treatment of Children and Adults with Laron Syndrome, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(12), pp. 4397–4404. doi:10.1210/jcem.84.12.6255.

***Lawrence, M.C.** (2021) Understanding insulin and its receptor from their three-dimensional structures, *Molecular Metabolism*, 52. doi:10.1016/j.molmet.2021.101255.

Li, J., Choi, E., Yu, H. & Bai, X. chen (2019) Structural basis of the activation of type 1 insulin-like growth factor receptor, *Nature Communications*, 10(1). doi:10.1038/s41467-019-12564-0.

Li, J., Wu, J., Hall, C., Bai, X.C., et al. (2022) Molecular basis for the role of disulfide-linked α CTs in the activation of insulin-like growth factor 1 receptor and insulin receptor, *eLife*, 11, pp. 1–27. doi:10.7554/eLife.81286.

Li, J., Park, J., Mayer, J.P., Webb, K.J., et al. (2022) Synergistic activation of the insulin receptor via two distinct sites, *Nature Structural and Molecular Biology*, 29(4), pp. 357–368. doi:10.1038/s41594-022-00750-6.

Li, Q., Wong, Y.L. & Kang, C. (2014) Solution structure of the transmembrane domain of the insulin receptor in detergent micelles, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(5), pp. 1313–1321. doi:10.1016/j.bbamem.2014.01.005.

Liu, J.M., Zhao, H.Y., Ning, G., Chen, Y., et al. (2008) IGF-1 as an early marker for low bone mass or osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women, *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 26(2), pp. 159–164. doi:10.1007/s00774-007-0799-z.

Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., et al. (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (IGF-1) and type 1 IGF receptor (IGF-1R), *Cell*, 75(1), pp. 59–72. doi:10.1016/S0092-8674(05)80084-4.

***Liu, M., Hodish, I., Haataja, L., Lara-Lemus, R., et al.** (2010) Proinsulin misfolding and diabetes: Mutant INS gene-induced Diabetes of Youth, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21(11), pp. 652–9. doi:10.1016/j.tem.2010.07.001.

Liu, M., Lara-Lemus, R., Shan, S.O., Wright, J., et al. (2012) Impaired Cleavage of Preproinsulin Signal Peptide Linked to Autosomal-Dominant Diabetes, *Diabetes*, 61(4), p. 828. doi:10.2337/DB11-0878.

Loftfield, E., Freedman, N.D., Lai, G.Y., Weinstein, S.J., et al. (2016) Higher glucose and insulin levels are associated with risk of liver cancer and chronic liver disease mortality among men with out a history of diabetes, *Cancer Prevention Research*, 9(11), pp. 866–874. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-16-0141.

Lou, M., Garrett, T.P.J., McKern, N.M., Hoyne, P.A., et al. (2006) The first three domains of the insulin receptor differ structurally from the insulin-like growth factor 1 receptor in the regions governing ligand specificity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), pp. 12429–12434. doi:10.1073/pnas.0605395103.

Ma, J., Giovannucci, E., Pollak, M., Leavitt, A., et al. (2004) A Prospective Study of Plasma C-Peptide and Colorectal Cancer Risk in Men, *Journal of the National Cancer Institute*, 96(7), pp. 546–553. doi:10.1093/jnci/djh082.

Macháčková, K., Mlčochová, K., Potalitsyn, P., Hanková, K., et al. (2019) Mutations at hypothetical binding site 2 in insulin and insulin-like growth factors 1 and 2 result in receptor-And hormone-specific responses, *Journal of Biological Chemistry*, 294(46), pp. 17371–17382. doi:10.1074/jbc.RA119.010072.

Mairet-Coello, G., Tury, A. & DiCicco-Bloom, E. (2009) Insulin-like growth factor-1 promotes G1/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex, *Journal of Neuroscience*, 29(3), pp. 775–788. doi:10.1523/JNEUROSCI.1700-08.2009.

Marshall, R.N., Underwood, L.E., Voina, S.J., Foushee, D.B., et al. (1974) Characterization of the insulin and somatomedin-c receptors in human placental cell membranes, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 39(2), pp. 283–292. doi:10.1210/jcem-39-2-283.

Massague, J. & Czech, M.P. (1982) The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor, *Journal of Biological Chemistry*, 257(9), pp. 5038–5045. doi:10.1016/s0021-9258(18)34631-3.

Massague, J., Pilch, P.F. & Czech, M.P. (1980) Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometries, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12 II), pp. 7137–7141. doi:10.1073/pnas.77.12.7137.

Massimino, M., Sciacca, L., Parrinello, N.L., Scalisi, N.M., et al. (2021) Insulin Receptor Isoforms Differently Regulate Cell Proliferation and Apoptosis in the Ligand-Occupied and Unoccupied State, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). doi:10.3390/IJMS22168729.

McKern, N.M., Lawrence, M.C., Streltsov, V.A., Lou, M.Z., et al. (2006) Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation, *Nature*, 443(7108), pp. 218–221. doi:10.1038/nature05106.

Medema, R.H., de Vries-Smits, A.M., van der Zon, G.C., Maassen, J.A., et al. (1993) Ras activation by insulin and epidermal growth factor through enhanced exchange of guanine nucleotides on p21ras, *Molecular and Cellular Biology*, 13(1), pp. 155–162. doi:10.1128/mcb.13.1.155.

Menting, J., Yang, Y., Chan, S.J., Phillips, N.B., et al. (2014) Protective hinge in insulin opens to enable its receptor engagement, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), pp. E3395–404. doi:10.1073/pnas.1412897111.

Menting, J.G., Whittaker, J., Margetts, M.B., Whittaker, L.J., et al. (2013) How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor, *Nature*, 493(7431), pp. 241–245. doi:10.1038/nature11781.

de Meyts, P., Roth, J., Neville, D.M., Gavin, J.R., et al. (1973) Insulin interactions with its receptors: Experimental evidence for negative cooperativity, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 55(1), pp. 154–161. doi:10.1016/S0006-291X(73)80072-5.

***de Meyts, P.** (2015) Insulin/receptor binding: The last piece of the puzzle?: What recent progress on the structure of the insulin/ receptor complex tells us (or not) about negative cooperativity and activation P. D. Meyts, *BioEssays*, 37(4), pp. 389–397. doi:10.1002/bies.201400190.

de Meyts, P., Bianco, A.R. & Roth, J. (1976) Site-site interactions among insulin receptors. Characterization of the negative cooperativity, *Journal of Biological Chemistry*, 251(7), pp. 1877–1888. doi:10.1016/s0021-9258(17)33630-x.

Moller, D.E., Yokota, A., Caro, J.F. & Flier, J.S. (1989) Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man, *Molecular Endocrinology*, 3(8), pp. 1263–1269. doi:10.1210/mend-3-8-1263.

Molnár, G., Faragó, N., Kocsis, Á.K., Rózsa, M., et al. (2014) GABAergic neurogliaform cells represent local sources of insulin in the cerebral cortex, *The Journal of neuroscience: the*

official journal of the Society for Neuroscience, 34(4), pp. 1133–1137.
doi:10.1523/JNEUROSCI.4082-13.2014.

Moreau, F., Kirk, N.S., Zhang, F., Gelfanov, V., et al. (2022) Interaction of a viral insulin-like peptide with the IGF-1 receptor produces a natural antagonist, *Nature Communications*, 13(1), pp. 1–14. doi:10.1038/s41467-022-34391-6.

Moxham, C.P., Duronio, V. & Jacobs, S. (1989) Insulin-like Growth Factor I Receptor β -Subunit Heterogeneity, *Journal of Biological Chemistry*, 264(22), pp. 13238–13244. doi:10.1016/s0021-9258(18)51620-3.

Murphy, N., Carreras-Torres, R., Song, M., Chan, A.T., et al. (2020) Circulating Levels of Insulin-like Growth Factor 1 and Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 Associate With Risk of Colorectal Cancer Based on Serologic and Mendelian Randomization Analyses, *Gastroenterology*, 158(5), pp. 1300-1312.e20. doi:10.1053/j.gastro.2019.12.020.

Murphy, L.J., Bell, G.I. & Friesen, H.G. (1987) Tissue Distribution of Insulin-Like Growth Factor I and II Messenger Ribonucleic Acid in the Adult Rat, *Endocrinology*, 120(4), pp. 1279–1282. doi:10.1210/endo-120-4-1279.

Myers, M.G., Backer, J.M., Xiao Jian Sun, Shoelson, S., et al. (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), pp. 10350–10354. doi:10.1073/pnas.89.21.10350.

Mynarcik, D.C., Williams, P.F., Schaffer, L., Yu, G.Q., et al. (1997a) Analog binding properties of insulin receptor mutants. Identification of amino acids interacting with the COOH terminus of the B-chain of the insulin molecule, *Journal of Biological Chemistry*, 272(4), pp. 2077–2081. doi:10.1074/jbc.272.4.2077.

Mynarcik, D.C., Williams, P.F., Schaffer, L., Yu, G.Q., et al. (1997b) Identification of common ligand binding determinants of the insulin and insulin-like growth factor 1 receptors. Insights into mechanisms of ligand binding, *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), pp. 18650–18655. doi:10.1074/jbc.272.30.18650.

Mynarcik, D.C., Yu, G.Q. & Whittaker, J. (1996) Alanine-scanning mutagenesis of a C-terminal ligand binding domain of the insulin receptor α subunit, *Journal of Biological Chemistry*, 271(5), pp. 2439–2442. doi:10.1074/jbc.271.5.2439.

Nagao, H., Cai, W., Wewer Albrechtsen, N.J., Steger, M., et al. (2021) Distinct signaling by insulin and IGF-1 receptors and their extra- And intracellular domains, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(17), pp. 1–12. doi:10.1073/pnas.2019474118.

Nagao, H., Cai, W., Brasil Brandão, B., Wewer Albrechtsen, N.J., et al. (2022) Leucine-973 is a crucial residue differentiating insulin and IGF-1 receptor signaling, *Journal of Clinical Investigation*, (18), pp. 1–17. doi:10.1172/jci161472.

Nicol, D.S. & Smith, L.F. (1960) Amino-acid sequence of human insulin, *Nature*, 187(4736), pp. 483–485. doi:10.1038/187483a0.

Nielsen, J., Brandt, J., Boesen, T., Hummelshøj, T., et al. (2022) Structural Investigations of Full-Length Insulin Receptor Dynamics and Signalling, *Journal of molecular biology*, 434(5). doi:10.1016/J.JMB.2022.167458.

Nishijima, T., Piriz, J., Duflot, S., Fernandez, A.M., et al. (2010) Neuronal Activity Drives Localized Blood-Brain-Barrier Transport of Serum Insulin-like Growth Factor-I into the CNS, *Neuron*, 67(5), pp. 834–846. doi:10.1016/j.neuron.2010.08.007.

Oyer, P.E., Cho, S., Peterson, J.D. & Steiner, D.F. (1971) Studies on human proinsulin. Isolation and amino acid sequence of the human pancreatic C-peptide., *Journal of Biological Chemistry*, 246(5), pp. 1375–1386. doi:10.1016/S0021-9258(19)76984-1.

Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., et al. (2002) Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved, *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), pp. 39684–39695. doi:10.1074/jbc.M202766200.

Pandini, G., Pace, V., Copani, A., Squatrito, S., et al. (2013) Insulin has multiple anti-amyloidogenic effects on human neuronal cells, *Endocrinology*, 154(1), pp. 375–387. doi:10.1210/EN.2012-1661.

Patzelt, C., Labrecque, A.D., Duguid, J.R., Carroll, R.J., et al. (1978) Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(3), p. 1260. doi:10.1073/PNAS.75.3.1260.

Peruzzi, F., Prisco, M., Dews, M., Salomoni, P., et al. (1999) Multiple Signaling Pathways of the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor in Protection from Apoptosis, *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), pp. 7203–7215. doi:10.1128/mcb.19.10.7203.

Peyrat, J.P., Louchez, M.M., Lefebvre, J., Bonnetterre, J., et al. (1993) Plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations in human breast cancer, *European Journal of Cancer*, 29(4), pp. 492–497. doi:10.1016/S0959-8049(05)80137-6.

Polak, M., Bouchareb-Banaei, L., Scharfmann, R. & Czernichow, P. (2000) Early pattern of differentiation in the human pancreas, *Diabetes*, 49(2), pp. 225–232. doi:10.2337/DIABETES.49.2.225.

Potalitsyn, P., Selicharová, I., Sršeň, K., Radosavljević, J., et al. (2020) A radioligand binding assay for the insulin-like growth factor 2 receptor, *PLoS ONE*, 15(9), p. e0238393. doi:10.1371/journal.pone.0238393.

Prigent, S.A., Stanley, K.K. & Siddle, K. (1990) Identification of epitopes on the human insulin receptor reacting with rabbit polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies, *Journal of Biological Chemistry*, 265(17), pp. 9970–9977. doi:10.1016/s0021-9258(19)38765-4.

Rajpal, G., Schuiki, I., Liu, M., Volchuk, A., et al. (2012) Action of protein disulfide isomerase on proinsulin exit from endoplasmic reticulum of pancreatic β -cells, *Journal of Biological Chemistry*, 287(1), pp. 43–47. doi:10.1074/jbc.C111.279927.

Rinderknecht, E. & Humbel, R.E. (1978) The Amino Acid Sequence of Human Insulin-like Growth Factor I and Its Structural Homology with Proinsulin, *The Journal of biological chemistry*, 253(8), pp. 2169–2116. doi:10.1016/S0021-9258(17)40889-1.

Rinderknecht, E., Humbel, R.E. & Steiner, D.F. (1976) Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: Isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II, *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), pp. 2365–2369. doi:10.1073/pnas.73.7.2365.

Rosen, O.M., Herrera, R., Olowe, Y., Petruzzelli, L.M., et al. (1983) Phosphorylation activates the insulin receptor tyrosine protein kinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(11 I), pp. 3237–3240. doi:10.1073/pnas.80.11.3237.

Rotwein, P., Folz, R.J. & Gordon, J.I. (1987) Biosynthesis of human insulin-like growth factor I (IGF-I). The primary translation product of IGF-I mRNA contains an unusual 48-amino acid signal peptide, *Journal of Biological Chemistry*, 262(24), pp. 11807–11812. doi:10.1016/s0021-9258(18)60885-3.

Ryle, A.P., Sanger, F., Smith, L.F. & Kitai, R. (1955) The Disulphide Bonds of Insulin, *Biochemical Journal*, 60(4), pp. 541–556. doi:10.1042/bj0600541.

Šácha, P., Knedlík, T., Schimer, J., Tykvart, J., et al. (2016) IBodies: Modular synthetic antibody mimetics based on hydrophilic polymers decorated with functional moieties, *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(7), pp. 2356–2360. doi:10.1002/anie.201508642.

Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., et al. (2019) Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157. doi:10.1016/j.diabres.2019.107843.

Saikali, Z., Setya, H., Singh, G. & Persad, S. (2008) Role of IGF-1/IGF-1R in regulation of invasion in DU145 prostate cancer cells, *Cancer Cell International*, 8, pp. 1–8. doi:10.1186/1475-2867-8-10.

***Saltiel, A.R. & Kahn, R.C.** (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, 414(6865), pp. 799–806. doi:10.1038/414799a.

Sanger, F. & Thompson, E.O. (1953a) The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates, *The Biochemical journal*, 53(3), pp. 353–366. doi:10.1042/BJ0530353.

Sanger, F. & Thompson, E.O. (1953b) The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates, *The Biochemical journal*, 53(3), pp. 366–374. doi:10.1042/BJ0530366.

Sanger, F. & Tuppy, H. (1951a) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates, *The Biochemical journal*, 49(4), pp. 463–481. doi:10.1042/BJ0490463.

Sanger, F. & Tuppy, H. (1951b) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates, *The Biochemical journal*, 49(4), pp. 481–490. doi:10.1042/BJ0490481.

Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C.P., et al. (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation, *Journal of Biological Chemistry*, 278(17), pp. 14599–14602. doi:10.1074/jbc.C300063200.

Santi, A., Bot, M., Aleman, A., Penninx, B.W.J.H., et al. (2018) Circulating insulin-like growth factor I modulates mood and is a biomarker of vulnerability to stress: from mouse to man, *Translational psychiatry*, 8(1). doi:10.1038/S41398-018-0196-5.

Sato, A., Nishimura, S., Ohkubo, T., Kyogoku, Y., et al. (1993) Three-dimensional structure of human insulin-like growth factor-I (IGF-I) determined by 1H-NMR and distance geometry, *International journal of peptide and protein research*, 41(5), pp. 433–440. doi:10.1111/j.1399-3011.1993.tb00462.x.

Sattar, A.A., Berhanu, C., Gebreselassie, S. & Berhanu, P. (2007) Human insulin receptor juxtamembrane domain independent insulin signaling, *Cell Biology International*, 31(8), pp. 815–824. doi:10.1016/j.cellbi.2007.01.033.

Scapin, G., Dandey, V.P., Zhang, Z., Prosise, W., et al. (2018) Structure of the Insulin Receptor-Insulin Complex by Single Particle CryoEM analysis, *Nature*, 556(7699), pp. 122–125. doi:10.1038/nature26153.

Schäffer, L. (1994) A model for insulin binding to the insulin receptor, *European Journal of Biochemistry*, 221(3), pp. 1127–1132. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18833.x.

Schäffer, L. & Ljungqvist, L. (1992) Identification of a disulfide bridge connecting the α -subunits of the extracellular domain of the insulin receptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189(2), pp. 650–653. doi:10.1016/0006-291X(92)92250-2.

Sciaccia, L., Cassarino, M.F., Genua, M., Pandini, G., et al. (2010) Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling, *Diabetologia*, 53(8), pp. 1743–1753. doi:10.1007/s00125-010-1760-6.

Scott, P.H., Brunn, G.J., Kohn, A.D., Roth, R.A., et al. (1998) Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), pp. 7772–7777. doi:10.1073/pnas.95.13.7772.

Seck, T., Scheidt-Nave, C., Leidig-Bruckner, G., Ziegler, R., et al. (2001) Low serum concentrations of insulin-like growth factor I are associated with femoral bone loss in a population-based sample of postmenopausal women, *Clinical Endocrinology*, 55(1), pp. 101–106. doi:10.1046/j.1365-2265.2001.01278.x.

Seino, S., Seino, M., Nishi, S. & Bell, G.I. (1989) Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(1), pp. 114–118. doi:10.1073/pnas.86.1.114.

Seino, S. & Bell, G.I. (1989) Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159(1), pp. 312–316. doi:10.1016/0006-291X(89)92439-X.

Sell, C., Rubini, M., Rubin, R., Liut, J.-P., et al. (1993) Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), pp. 11217–11221. doi:10.1073/pnas.90.23.11217.

Sell, C., Dumenil, G., Deveaud, C., Miura, M., et al. (1994) Effect of a Null Mutation of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor Gene on Growth and Transformation of Mouse Embryo Fibroblasts, *Molecular and cellular biology*, 14(6), pp. 3604–3612. doi:10.1128/mcb.14.6.3604-3612.1994.

Sesti, G., Tullio, A.N., D'Alfonso, R., Napolitano, M.L., et al. (1994) Tissue-specific expression of two alternatively spliced isoforms of the human insulin receptor protein, *Acta Diabetologica*, 31(2), pp. 59–65. doi:10.1007/BF00570536.

***Shabanpoor, F., Separovic, F. & Wade, J.D.** (2009) The Human Insulin Superfamily of Polypeptide Hormones, *Vitamins and Hormones*, 80(C), pp. 1–31. doi:10.1016/S0083-6729(08)00601-8.

Shan, Y., Lu, C., Wang, J., Li, M., et al. (2022) IGF-1 contributes to liver cancer development in diabetes patients by promoting autophagy, *Annals of Hepatology*, 27(4), p. 100697. doi:10.1016/j.aohep.2022.100697.

Shooter, G.K., Magee, B., Soos, M.A., Francis, G.L., et al. (1996) Insulin-like growth factor (IGF)-I A- and B-domain analogues with altered type 1 IGF and insulin receptor binding specificities, *Journal of Molecular Endocrinology*, 17(3), pp. 237–246. doi:10.1677/jme.0.0170237.

Shu, J.C., Nakagawa, S. & Steiner, D.F. (2007) Complementation analysis demonstrates that insulin cross-links both α subunits in a truncated insulin receptor dimer, *Journal of Biological Chemistry*, 282(18), pp. 13754–13758. doi:10.1074/jbc.M700724200.

Skolnik, E.Y., Lee, C.H., Batzer, A., Vicentini, L.M., et al. (1993) The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: Implications for insulin control of ras signalling, *EMBO Journal*, 12(5), pp. 1929–1936. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05842.x.

de Smedt, A., Brouns, R., Uyttenboogaart, M., de Raedt, S., et al. (2011) Insulin-like growth factor I serum levels influence ischemic stroke outcome, *Stroke*, 42(8), pp. 2180–2185. doi:10.1161/STROKEAHA.110.600783.

Smeeckens, S.P., Avruch, A.S., LaMendola, J., Chan, S.J., et al. (1991) Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(2), pp. 340–344. doi:10.1073/PNAS.88.2.340.

Smith, B.J., Huang, K., Kong, G., Chan, S.J., et al. (2010) Structural resolution of a tandem hormone-binding element in the insulin receptor and its implications for design of peptide agonists, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), pp. 6771–6776. doi:10.1073/pnas.1001813107.

Smith, N.A., Menting, J.G., Weiss, M.A., Lawrence, M.C., et al. (2022) Single-chain insulin analogs threaded by the insulin receptor α CT domain, *Biophysical Journal*, 121(21), pp. 4063–4077. doi:10.1016/j.bpj.2022.09.038.

Soos, M.A., Siddle, K., Baron, M.D., Heward, J.M., et al. (1986) Monoclonal antibodies reacting with multiple epitopes on the human insulin receptor, *Biochemical Journal*, 235(1), pp. 199–208. doi:10.1042/bj2350199.

Soos, M.A., Field, C.E. & Siddle, K. (1993) Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity, *Biochemical Journal*, 290(2), pp. 419–426. doi:10.1042/bj2900419.

Sparrow, L.G., McKern, N.M., Gorman, J.J., Strike, P.M., et al. (1997) The disulfide bonds in the C-terminal domains of the human insulin receptor ectodomain, *Journal of Biological Chemistry*, 272(47), pp. 29460–29467. doi:10.1074/jbc.272.47.29460.

Sparrow, L.G., Gorman, J.J., Strike, P.M., Robinson, C.P., et al. (2007) The Location and Characterisation of the O-Linked Glycans of the Human Insulin Receptor, *Proteins*, 66(2), pp. 261–265. doi:10.1002/prot.21261.

Sparrow, L.G., Lawrence, M.C., Gorman, J.J., Strike, P.M., et al. (2008) N-linked glycans of the human insulin receptor and their distribution over the crystal structure, *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 71(1), pp. 426–439. doi:10.1002/prot.21768.

Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L. & Aten, B. (1967) Insulin biosynthesis: Evidence for a precursor, *Science*, 157(3789), pp. 697–700. doi:10.1126/science.157.3789.697.

Sun, W., Lu, J., Wu, S., Bi, Y., et al. (2016) Association of insulin resistance with breast, ovarian, endometrial and cervical cancers in non-diabetic women, *American journal of cancer research*, 6(10), pp. 2334–2344.

Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, R.C., Becker, J.M., et al. (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein, *Nature*, 354(6330), pp. 73–77. doi:10.1038/352073a0.

Surinya, K.H., Forbes, B.E., Occhiodoro, F., Booker, G.W., et al. (2008) An investigation of the ligand binding properties and negative cooperativity of soluble insulin-like growth factor receptors, *Journal of Biological Chemistry*, 283(9), pp. 5355–5363. doi:10.1074/jbc.M707054200.

***Tan, S.Y., Mei Wong, J.L., Sim, Y.J., Wong, S.S., et al.** (2019) Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention, *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 13(1), pp. 364–372. doi:10.1016/j.dsx.2018.10.008.

***Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. & Kahn, C.R.** (2006) Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), pp. 85–96. doi:10.1038/nrm1837.

***Tatulian, S.A.** (2015) Structural Dynamics of Insulin Receptor and Transmembrane Signaling, *Biochemistry*, 54(36), pp. 5523–5532. doi:10.1021/acs.biochem.5b00805.

Taylor, R., Soos, M.A., Wells, A., Argyraki, M., et al. (1987) Insulin-like and insulin-inhibitory effects of monoclonal antibodies for different epitopes on the human insulin receptor, *Biochemical Journal*, 242(1), pp. 123–129. doi:10.1042/bj2420123.

Tornqvist, H.E., Pierce, M.W., Frackelton, A.R., Nemenoff, R.A., et al. (1987) Identification of insulin receptor tyrosine residues autophosphorylated in vitro, *Journal of Biological Chemistry*, 262(21), pp. 10212–10219. doi:10.1016/s0021-9258(18)61100-7.

Treadway, J.L., Morrison, B.D., Goldfine, I.D. & Pessin, J.E. (1989) Assembly of insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors in vitro, *Journal of Biological Chemistry*, 264(36), pp. 21450–21453. doi:10.1016/s0021-9258(20)88201-5.

Tsujimoto, T., Kajio, H. & Sugiyama, T. (2017) Association between hyperinsulinemia and increased risk of cancer death in nonobese and obese people: A population-based observational study, *International journal of cancer*, 141(1), pp. 102–111. doi:10.1002/IJC.30729.

Uchikawa, E., Choi, E., Shang, G., Yu, H., et al. (2019) Activation mechanism of the insulin receptor revealed by cryo-EM structure of the fully liganded receptor-ligand complex, *eLife*, 8, p. e48630. doi:10.7554/eLife.48630.001.

Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., et al. (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes, *Nature*, 313(6005), pp. 756–761. doi:10.1038/313756a0.

Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., et al. (1986) Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity, *The EMBO Journal*, 5(10), pp. 2503–2512. doi:10.1002/j.1460-2075.1986.tb04528.x.

***Vakilian, M., Tahamtani, Y. & Ghaedi, K.** (2019) A review on insulin trafficking and exocytosis, *Gene*. Elsevier B.V., pp. 52–61. doi:10.1016/j.gene.2019.04.063.

Wallis, M. (2009) New insulin-like growth factor (IGF)-precursor sequences from mammalian genomes: the molecular evolution of IGFs and associated peptides in primates, *Growth Hormone and IGF Research*, 19(1), pp. 12–23. doi:10.1016/j.ghir.2008.05.001.

Weis, F., Menting, J.G., Margetts, M.B., Chan, S.J., et al. (2018) The signalling conformation of the insulin receptor ectodomain, *Nature Communication*, 9(1), p. 4420. doi:10.1038/s41467-018-06826-6.

White, M.F. & Kahn, C.R. (1985) Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells, *Nature*, 318(6042), pp. 183–186. doi:10.1038/318183a0.

Whittaker, J., Groth, A. V., Mynarcik, D.C., Pluzek, L., et al. (2001) Alanine Scanning Mutagenesis of a Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor Ligand Binding Site, *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), pp. 43980–43986. doi:10.1074/jbc.M102863200.

Whittaker, J., Whittaker, L.J., Roberts, C.T., Phillips, N.B., et al. (2012) α -Helical element at the hormone-binding surface of the insulin receptor functions as a signaling element to activate its tyrosine kinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(28), pp. 11166–11171. doi:10.1073/pnas.1205681109.

Whittaker, J. & Whittaker, L. (2005) Characterization of the functional insulin binding epitopes of the full-length insulin receptor, *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), pp. 20932–20936. doi:10.1074/jbc.M411320200.

Whittaker, L., Hao, C., Fu, W. & Whittaker, J. (2008) High-affinity insulin binding: Insulin interacts with two receptor ligand binding sites, *Biochemistry*, 47(48), pp. 12900–12909. doi:10.1021/bi801693h.

Woods, K.A., Camacho-Hübner, C., Savage, M.O. & Clark, A.J.L. (1996) Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the Insulin-like growth factor 1 gene, *The New England journal of medicine*, 335(18), pp. 1363–1367. doi:10.1056/NEJM199610313351805.

Wu, C., Huang, X., Dong, F., Tang, W., et al. (2022) Cryo-EM structure shows how two IGF1 hormones bind to the human IGF1R receptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 636, pp. 121–124. doi:10.1016/j.bbrc.2022.10.056.

Xiong, X., Menting, J.G., Disotuar, M.M., Smith, N.A., et al. (2020) A structurally minimized yet fully active insulin based on cone-snail venom insulin principles, *Nature Structural and Molecular Biology*, 27(7), pp. 615–624. doi:10.1038/s41594-020-0430-8.A.

Xu, Y., Kong, G.K.W., Menting, J.G., Margetts, M.B., et al. (2018) How ligand binds to the type 1 insulin-like growth factor receptor, *Nature Communications*, 9(1). doi:10.1038/s41467-018-03219-7.

Xu, Y., Kirk, N.S., Venugopal, H., Margetts, M.B., et al. (2020) How IGF-II Binds to the Human Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor, *Structure*, 28(7), pp. 786-798.e6. doi:10.1016/j.str.2020.05.002.

Yakar, S., Rosen, C.J., Beamer, W.G., Ackert-Bicknell, C.L., et al. (2002) Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density, *The Journal of clinical investigation*, 110(6), pp. 771–781. doi:10.1172/JCI15463.

Yamada, T., Katagiri, H., Asano, T., Tsuru, M., et al. (2002) Role of PDK1 in insulin-signaling pathway for glucose metabolism in 3T3-L1 adipocytes, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 282(6 45-6). doi:10.1152/ajpendo.00486.2001.

Yang-Feng, T., Francke, U. & Ullrich, A. (1985) Gene for human insulin receptor: localization to site on chromosome 19 involved in pre-B-cell leukemia, *Science*, 228(4700), pp. 728–731. doi:10.1126/science.3873110.

***Ye, L., Maji, S., Sanghera, N., Gopalasingam, P., et al.** (2017) Structure and dynamics of the insulin receptor: implications for receptor activation and drug discovery, *Drug Discovery Today*, 22(7), pp. 1092–1102. doi:10.1016/j.drudis.2017.04.011.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., et al. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L), *Cell*, 87(4), pp. 619–628. doi:10.1016/S0092-8674(00)81382-3.

Zhang, W., Gustafson, T.A., Rutter, W.J. & Johnson, J.D. (1994) Positively charged side chains in the insulin-like growth factor-1 C- and D-regions determine receptor binding specificity, *Journal of Biological Chemistry*, 269(14), pp. 10609–10613. doi:10.1016/s0021-9258(17)34103-0.

Zhang, X., Yu, D., Sun, J., Wu, Yujie, et al. (2020) Visualization of Ligand-Bound Ectodomain Assembly in the Full-Length Human IGF-1 Receptor by Cryo-EM Single-Particle Analysis, *Structure*, 28(5), pp. 555-561.e4. doi:10.1016/j.str.2020.03.007.

Zhang, X., Wei, T., Wu, C., Jiang, J., et al. (2022) Cryo-EM Structure Reveals Polymorphic Ligand-bound States of IGF1R, *Journal of Molecular Biology*, 434(9), p. 167536. doi:10.1016/J.JMB.2022.167536.

Zhang, X., Wu, C., Wei, T., Lu, Y., et al. (2022) Cryo-EM studies of the apo states of human IGF1R, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 618, pp. 148–152. doi:10.1016/j.bbrc.2022.05.063.

Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., et al. (1999) Brain insulin receptors and spatial memory, *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), pp. 34893–34902. doi:10.1074/JBC.274.49.34893.

Zito, E., Chin, K.T., Blais, J., Harding, H.P., et al. (2010) ERO1- β , a pancreas-specific disulfide oxidase, promotes insulin biogenesis and glucose homeostasis, *The Journal of Cell Biology*, 188(6), p. 821. doi:10.1083/JCB.200911086.

* - označuje rešerše

10 Přílohy

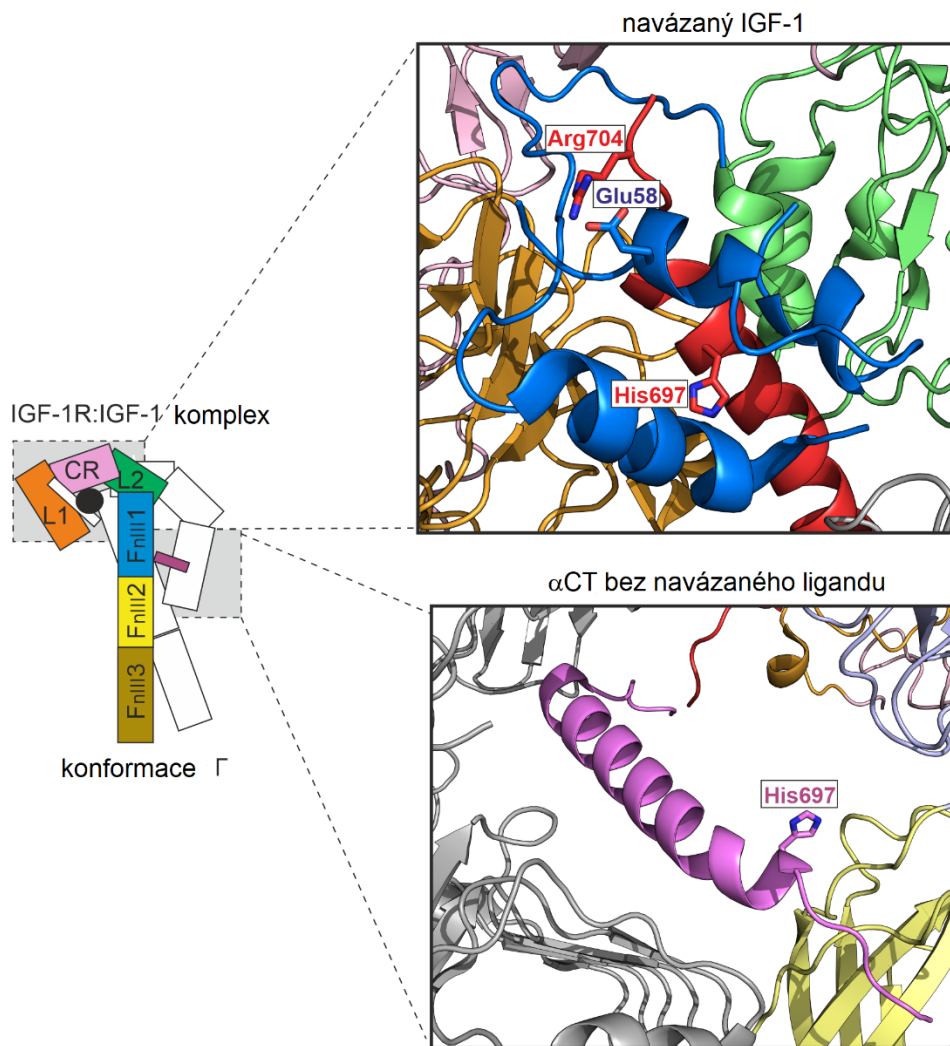
Tab. 14: Výsledné hodnoty B_{max} a K_D jednotlivých opakování saturačních vazebných zkoušek variant IGF-1R a jejich ektodomén. Jejich relativní hodnoty jsou označeny jako % B_{max} a % K_D (SD) vyjadřuje směrodatnou odchylku (z anglického „standard deviation“). Oranžově jsou značeny průměrné hodnoty saturačních vazebných zkoušek s celkovými receptory, modře pak s receptorovými ektodoménami.

varianta	$B_{max} \pm SD$ cpm	% B_{max}	$K_D \pm SD$ [nM]	% K_D
IGF-1				
R- cells	2157 ± 225	10 ± 1	0.55 ± 0.25	23 ± 12
2	1932	10	0.30	36
3	2383	10	0.80	11
WT	21329 ± 2025	100	0.09 ± 0.01	100
1	22356	100	0.09	100
2	18501	100	0.11	100
3	23131	100	0.09	100
H697A	11087 ± 666	52 ± 2	0.38 ± 0.10	27 ± 7
1	11359	51	0.24	36
2	10171	55	0.41	26
3	11732	51	0.49	18
R704A	16974 ± 611	80 ± 8	0.34 ± 0.10	30 ± 9
1	16304	73	0.20	43
2	16835	91	0.39	27
3	17782	77	0.42	21
WT ekto.	39389 ± 4113	100	0.53 ± 0.19	100
1	35766	100	0.26	100
2	45141	100	0.70	100
3	37260	100	0.63	100
H697A ekto.	19374 ± 1778	51 ± 8	2.30 ± 0.33	23 ± 9
1	19374	54	2.07	13
2	17933	40	2.06	34
3	22212	60	2.77	22
R704A ekto.	33164 ± 2763	86 ± 15	2.09 ± 0.64	25 ± 4
1	34901	98	1.23	21
2	29264	65	2.30	30
3	35326	95	2.74	23

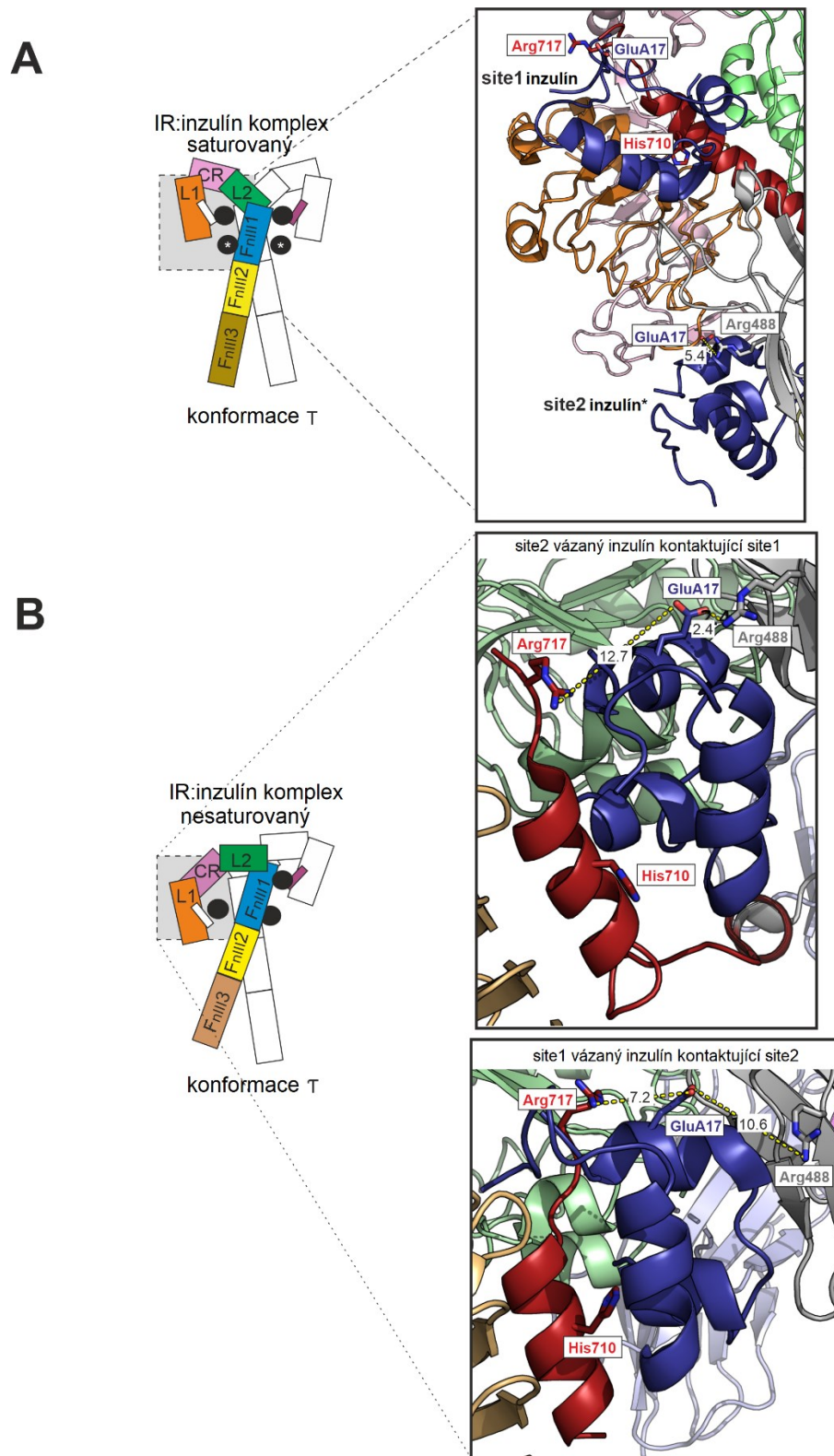
Tab. 15: Výsledné hodnoty B_{max} a K_D jednotlivých opakování saturačních vazebných zkoušek variant IR-A a jejich ektodomén. Jejich relativní hodnoty jsou označeny jako % B_{max} a % K_D (SD) vyjadřuje směrodatnou odchylku. Oranžově jsou značeny průměrné hodnoty saturačních vazebných zkoušek s celkovými receptory, modře pak s receptorovými ektodoménami. Následné pokusy s WT a IR-A R717K jsou uvedeny zvlášť z důvodu sady opakování s vyšší expresí receptorů po tranzientní transfekci vektorem pCMV3.

varianta IR-A	$B_{max} \pm SD$ cpm	% B_{max}	$K_D \pm SD$ [nM]	% K_D
R- cells	1164 ± 354	7.5 ± 0.5	0.3 ± 0.12	190 ± 14
1	1518	8	0.18	205
2	809	7	0.42	176
WT	12693 ± 4115	100	0.20 ± 0.08	100
1	19154		0.37	
2	11477		0.22	
3	8631		0.16	
4	15585		0.12	
5	8620		0.28	
WT	36629 ± 2263	100		
6	33658		0.10	
7	37084		0.19	
8	39144		0.14	
R717K	29748 ± 3532	82 ± 15	0.55 ± 0.32	31 ± 9
6	34743	103	0.26	38
7	27270	74	0.99	19
8	27231	70	0.39	36
H710A	839 ± 510	9 ± 7	0.74	38
1				
2				
3	nejednoznačné		nejednoznačné	
4	329	2	nejednoznačné	
5	1349	16	0.74	38
R717A	3391 ± 2869	24 ± 13	0.79 ± 0.48	36 ± 13
1	8760	45	1.60	23
2	3826	33	0.90	24
3	1557	18	0.42	38
4	2073	13	0.20	60
5	738	9	0.81	34
R717Q	3826 ± 1918	29 ± 8	0.27 ± 0.10	95 ± 25
1	5347	28	0.41	132
2	2414	21	0.20	110
3	1980	23	0.17	94
4	6825	44	0.19	63
5	2567	30	0.38	74
R717F	3462 ± 986	31 ± 18	0.72 ± 0.21	42 ± 27
1	3086	16	0.41	79

varianta IR-A	B_{max} ± SD cpm	% B_{max}	K_D ± SD [nM]	% K_D
2	2486	22	0.20	32
3	4813	56	0.17	16
4	nejednoznačné		nejednoznačné	
5	nejednoznačné		nejednoznačné	
WT ekto.	5234 ± 462	100	0.61 ± 0.27	100
1	5861		0.44	
2	4762		0.99	
3	5078		0.40	
H710A ekto.	416 ± 322	7	3.35 ± 0.05	21
1	738	13	3.30	13
2	94	2	3.40	29
3	nejednoznačné		nejednoznačné	
R717A ekto.	912 ± 128	18	1.23 ± 0.78	73
1	784	13	0.45	96
2	1040	22	2.00	50
3	nejednoznačné		nejednoznačné	
R717Q ekto.	1259 ± 134	24	0.75 ± 0.16	91
1	1125	19	0.59	73
2	1392	29	0.90	110
R717F ekto.	685	12	1,10	39
1	685	12	1,10	39



Obr. 45: Přibližný pohled na strukturu IGF-1 vázanou na IGF-1R (PDB ID: 6PYH). Schématické znázornění odpovídá obr. 10. Barevné znázornění struktury odpovídá schématickému znázornění domén. IGF-1 je označeno modře a α CT na horním výřezu červeně pro lepší kontrast. Jsou znázorněny aminokyselinové zbytky His697 a Arg704 IGF-1R a Glu58 IGF-1.



Obr. 46: Přiblížený pohled na strukturu inzulinu (modře) vázaného na IR. (A) IR saturaovaný inzulinem (PDB ID: 6SOF) ukazující inzulin v primárním (site1) a sekundárním (site2) vazebném místě. (B) IR v nesaturovaném stavu obsazený 3 molekulami inzulinu (PDB ID: 7STK – horní obrázek; PDB ID: 7STJ – spodní obrázek). Přiblížený pohled zobrazuje inzulin vázaný v hybridním vazebném místě (site1-2). Schématické znázornění odpovídá obr. 8. Barevné znázornění struktury odpovídá schématickému znázornění domén krom α CT, která je znázorněna červeně pro lepší kontrast. Jsou znázorněny aminokyselinové zbytky His710 a Arg717 (a Arg488) IR a GluA17 inzulinu.