

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



NMR studie metabolicky aktivních peptidů

NMR studies of metabolically active peptides

Bc. Rozálie Hexnerová

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Zdeněk Tošner, Ph.D.

Konzultant:

Ing. Václav Veverka, Ph.D.

Praha 2014

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Zdeňka Tošnera, Ph.D. a konzultanta Ing. Václava Veverky, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyly předloženy k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Mé poděkování patří všem, kteří se, ať už cíleně nebo mimoděk, zasloužili o směřování mé cesty za vzděláním. Jmenovitě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce RNDr. Zdeňku Tošnerovi, Ph.D. za poskytnutí cenných rad v oblasti nukleární magnetické resonance. Můj velký dík patří Ing. Ireně Siegllové a RNDr. Milanu Fábrymu za vřelé předávání zkušeností v oblasti experimentální práce a pomoc při závěrečném formálním zpracování. Ing. Pavlíně Novotné z VŠCHT děkuji za provedení metody ECD. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Lence Žákové, Ph.D., RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. a kolegyni Květoslavě Křížkové za příjemnou spolupráci a pomoc s HPLC, MS analysou a vazebnými interakcemi.

V neposlední řadě děkuji svému konzultantovi Ing. Václavu Veverkovi, Ph.D. za trpělivost a laskavost, s jakými pokaždé ochotně přistupoval k mému ne vždy snadnému vedení. Celému kolektivu laboratoře Strukturní biologie děkuji za vlídné přijetí a přátelské pracovní prostředí.

Neopominutelný dík patří samozřejmě mé drahé rodině za umožnění studia a dlouhotrvající podporu při něm.

Obsah

Obsah	4
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Seznam použitých zkratk	8
1 Teoretický úvod	9
1.1 Insulin a IGF systém.....	10
1.2 Struktura IGF-II.....	11
1.2.1 Primární struktura.....	11
1.2.2 Sekundární a terciární struktura.....	12
1.3 IGF-vazebné proteiny	14
1.4 Biologické chování IGF.....	15
1.4.1 Interakce s IGF-1R	16
1.4.2 Interakce s IR.....	17
1.4.3 Interakce s IGF-2R	18
1.4.4 Vazebná místa IGF-II.....	19
1.4.5 Databáze modifikací IGF a insulinu.....	21
1.4.6 Signální odpověď	21
1.5 Cíl práce.....	24
2 Materiál	25
2.1 Bakteriální kmeny, plasmidy a kultivační média	25
2.2 Chemikálie.....	26
2.3 Ostatní materiál.....	27
2.4 Přístrojové vybavení laboratoře.....	28
3 Experimentální metody	29
3.1 Expresce rekombinantních proteinů.....	29
3.1.1 Kultivace His ₆ -GB1-Gly ⁻¹ -IGF-II	29
3.1.2 Kultivace NusA-His ₆ -(GlyAlaMet) ⁻¹ -IGF-II.....	30
3.2 SDS-PAGE	30
3.2.1 Použité roztoky	30
3.2.2 Roztoky pro barvení stříbrem a sušení gelů	31
3.2.3 Příprava vzorků z kultivace	31
3.2.4 Příprava ostatních vzorků	32
3.2.5 Postup	32
3.2.6 Barvení stříbrem	32
3.2.7 Sušení gelů.....	32
3.3 Proteinový přenos s imunodetekcí.....	33
3.3.1 Použité roztoky	33
3.3.2 Postup	33
3.4 Isolace proteinu.....	33
3.4.1 Isolace inkluzních tělísek.....	33
3.4.2 Isolace rozpustného proteinu	34
3.5 Purifikace GB1-IGF-II	35
3.5.1 Použité roztoky	35
3.5.2 Denaturace inkluzních tělísek.....	35
3.5.3 Chelatační afinitní chromatografie	35

3.5.4	Proteolytické štěpení fúzního partnera	36
3.5.5	Samospádová afinitní chromatografie	36
3.6	Purifikace NusA-IGF-II.....	37
3.6.1	Chelatační afinitní chromatografie	37
3.6.2	Proteolytické štěpení fúzního partnera	38
3.6.3	Ultrafiltrace.....	38
3.6.4	Gelová permeační chromatografie.....	38
3.7	Odsolení.....	39
3.8	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi	39
3.8.1	Analytické stanovení	39
3.8.2	Preparativní uspořádání	39
3.9	Hmotnostní spektrometrie	40
3.10	Cirkulární dichroismus	40
3.11	Vazebné testy.....	40
3.12	Nukleární magnetická resonance.....	41
4	Výsledky	45
4.1	Příprava IGF-II	45
4.1.1	Expresce	45
4.1.2	Purifikace.....	48
4.1.3	Proteolytické štěpení	50
4.1.4	Separace produktu od fúzního partnera	51
4.1.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi	53
4.2	Biofyzikální charakterizace	57
4.2.1	Cirkulární dichroismus	57
4.2.2	Vazebné interakce.....	58
4.2.3	Nukleární magnetická resonance.....	61
4.3	Difuzní a relaxační chování.....	65
5	Diskuse.....	69
6	Shrnutí výsledků	74
	Seznam použité literatury	75
	Přílohy.....	81

Abstrakt

Regulace metabolických a mitogenních buněčných dějů je komplexní systém závislý na správném fungování několika signalizačních kaskád. Jednou z nich je insulinová osa sestávající z akcí řízených třemi sekvenčně a strukturně velmi podobných hormonů (insulinu, insulinu podobnému růstovému faktoru (IGF) -I a -II) a skupinou jejich receptorů. Vysoká míra homologie panuje i mezi těmito buněčnými receptory, kterými jsou isoformy A a B insulinového receptoru a IGF-1 receptor, patřící do rodiny receptorů s tyrosin-kinasovou aktivitou. Díky tomu dochází v rámci této signalizace k prolínání vazebných interakcí, kde každý z ligandů může spouštět odlišné biologické odpovědi. Jedním z cílů v této oblasti je navržení analogů insulinu s výhradně metabolickým účinkem nebo IGF antagonistů tlumících nežádoucí mitogenní účinky, na základě identifikace oblastí důležitých pro vazbu k různým receptorům.

Překládaná diplomová práce se soustřeďuje na vliv zanesení vybraných prvků primární struktury IGF-I do molekuly IGF-II na receptorové interakce. Konkrétně se jedná o záměnu Ser²⁹ za asparagin a dvě samostatné inserce Gly-Ser za pozici Arg³⁴ a Pro-Gln za pozici Ser³⁹ nebo kombinace obou insercí. Tyto modifikace snížily afinitu IGF-II vůči IR-A, avšak nevedly ke zvýšení afinity vůči IGF-1R. V rámci plnění cílů práce byla optimalizována rekombinantní příprava IGF-II a jeho analogů v heterologním expresním systému *E. coli*, po níž následovala detailní biofyzikální charakterizace takto připraveného IGF-II, která cíleně vedla k objasnění příčiny rozšíření signálů v NMR spektrech. Na základě NMR experimentů, jež zahrnovaly difuzní měření a stanovení relaxačních časů, bylo zjištěno, že za rozšířením signálů stojí rozsáhlá dynamická konformační heterogenita molekuly IGF-II, a nikoli v literatuře často zmiňované agregační chování.

Abstract

The regulation of metabolic and mitogenic cellular processes is a complex system, depending on the precise function of several signalling cascades. One example is the insulin pathway, which is mediated by a group of three sequentially and structurally highly similar hormones (insulin, insulin-like growth factor (IGF) -I and -II) and their homologous tyrosine kinase receptors (IR-A, IR-B, IGF-1R). Such a high degree of homology leads to crosstalk in receptor communication, with each of the ligands triggering different biological responses. The design of insulin analogues activating primarily metabolic effects or IGF antagonists suppressing an unfavourable mitogenic response is one of the main goals in this research field, which can be facilitated by identification of the regions responsible for receptor binding.

The work included in this thesis is focused on the effects on receptor interactions following the introduction of selected elements from the IGF-I primary sequence into the IGF-II molecule. In particular, these include a point mutation of Ser²⁹ to Asn, an insertion of Gly-Ser after Arg³⁴, an insertion of Pro-Gln after Ser³⁹, or combination of both insertions. Although the IGF-II modifications described here negatively affected binding affinity towards IR-A, they did not enhance the IGF-1R binding. The optimisation of the recombinant production of IGF-II and its analogues in the heterologous *E. coli* based expression system was followed by a detailed biophysical characterisation of IGF-II, which lead to clarification of the mechanism behind the signal broadening in NMR spectra. The NMR diffusion and relaxation experiments revealed that the line broadening observed for IGF-II NMR signals can be attributed to the dynamic conformational heterogeneity of the molecule rather than aggregation, as frequently quoted in the literature.

(In Czech)

Seznam použitých zkratek

AV ČR	Akademie věd České republiky
CI-MPR	cation-independent mannose-6-phosphate receptor
CPMG	Car-Purcel-Meiboom-Gill
CV	column volume
DOSY	diffusion ordered spectroscopy
FPLC	fast protein liquid chromatography
GH	growth hormone
His ₆	hexaxistidinová afinitní kotva
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IGF	insulin-like growth factor
IGF-1R	insulin-like growth factor type 1 receptor
IGF-2R	insulin-like growth factor type 2 receptor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktosid
IR	insulinový receptor
IR-A	isoforma A insulinového receptoru
IR-B	isoforma B insulinového receptoru
LB	Luria-Bertani
MM	minimální médium
NMR	nukleární magnetická resonance
NOESY	nuclear Overhauser effect Spectroscopy
NSILA	non-suppressible insulin-like activity
OD _{550nm}	optická densita při vlnové délce 550 nm
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PDB	protein data bank (www.pdb.org)
ppm	parts per million
RP-HPLC	reverse phase high-performance liquid chromatography
SFA	sulfation factor activity
TEV	tobacco etch virus
TOCSY	total correlation spectroscopy
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
v.v.i.	veřejná výzkumná instituce
v/v	objemová procenta
w/v	procenta hmotnosti v objemu
WB	western blot

1 Teoretický úvod

Signální dráhy v organismu zajišťuje řada molekul různých velikostí. Důležitou roli zde hrají zejména hormony, ať už peptidové, nebo steroidní povahy. Jedním z nejznámějších je insulin – hormon pankreatu zodpovědný za hospodaření s krevním cukrem. Protože porucha jeho sekrece vede k několika civilizačním chorobám, často závažným, je tento malý protein středem vědecké pozornosti již od konce 19. století [1]. Dalšími z hormonů zodpovědných za insulinovou komunikační dráhu jsou již ne tak známé insulinu podobné růstové faktory I a II (dále IGF-I a IGF-II, z angl. *insulin-like growth factor*). Právě na IGF-II se v této práci budu soustředit. Zaměřím se nejen na strukturu a sekvenční podobnost k insulinu, ale i na problematiku podobnosti příslušných receptorů a z těchto podobností pramenících následků.

Na přelomu 19. a 20. století přišel sir Edward Albert Sharpey–Schäfer, britský fyziolog, s myšlenkou, že jistá substance produkovaná pankreatem snižuje hladinu krevního cukru. V roce 1913 tuto sloučeninu pojmenoval insulin (z lat. *insula*, ostrov) podle Langerhansových ostrůvků pankreatických buněk [2]. Když na začátku 20. století francouzský chirurg Alexis Carrel, badatel na poli orgánové transplantace, publikoval své poznatky o aktivační síle urychlující růst tkání *in vitro*, nevěřil v jejich praktickou aplikaci. Ve svých experimentech použil extrakty z několika typů tkání, přičemž největší míru účinnosti vykazovaly extrakty získané z kuřecí embryonální tkáně nebo slinivky dospělého jedince kura domácího [3].

Počátky pokusů izolace insulinu se odehrály v laboratoři Johna Macleoda na Univerzitě v Torontu, kdy se Frederick Banting a Charles Best pokoušeli vylouhovat protein zodpovědný za snížení glykemie z homogenátu hovězího pankreatu. Spolu s povoláním Jamesem Collipem se podařilo izolovat onen „aktivní princip“ zodpovědný za snížení krevního cukru u králíků a diabetických psů [2]. Rozhodli se tedy použít pankreatický extrakt k léčení 14letého diabetického chlapce [4]. V roce 1923 byl Frederick Banting s Johnem Macleodem oceněni Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu za objev insulinu.

První krystalizace insulinu se povedla ve 20. letech minulého století americkému biochemikovi Johnu Jamesi Abelovi [5] a insulinová sekvence byla objasněna v letech 50. Frederickem Sangerem, který za svůj objev získal v roce 1958 Nobelovu cenu za chemii. Trojrozměrnou strukturu definovala v letech 60. Dorothy Crowfoot Hodgkinová [6] pomocí X-ray krystalografie. Za využití této metody ke stanovení struktury biologicky aktivních molekul byla roku 1964 oceněna Nobelovou cenou za chemii.

Další vývoj na poli insulínu podobné aktivity se udál v polovině 20. století, kdy byla v séru objevena přítomnost faktoru se sulfatační aktivitou (SFA, z angl. *sulfation factor activity*). SFA podporuje vychytávání sulfátu chrupavkou zprostředkovaný růstovým hormonem (GH, z angl. *growth hormone*) [7]. Pár let poté byl v lidském séru objeven insulínu podobný faktor, jehož účinek ovšem nebyl potlačen anti-insulinovou protilátkou. Zavedl se pro něj termín „nepotlačitelná insulínu podobná aktivita“ (NSILA, z angl. *non-suppressible insulin-like activity*) [8]. Vzhledem k tomu, že oba tyto faktory měly vliv na podporu somatického růstu, byly začátkem 70. let oba zahrnuty pod pojem somatomedin [9].

K dnešnímu pojmenování se dostáváme teprve v roce 1976, kdy byl protein zodpovědný za nepotlačitelnou insulínu podobnou aktivitu osekvenován. Zjistilo se, že jde o dva odlišné proteiny, avšak vysoce homologní, a to nejen mezi sebou, ale i s insulínem [10]. Zavedly se tedy termíny „insulínu podobný růstový faktor I a II“ (IGF-I a -II, z angl. *insulin-like growth factor*), které byly ustáleny a obecně přijaty roku 1987 [11].

1.1 Insulin a IGF systém

Insulin je dvouřetězcový protein tvořený 51 aminokyselinami. Fyziologicky vzniká jako preproinsulin v β -buňkách Langerhansových ostrůvků uvnitř pankreatu, který je dále enzymově štěpen na proinsulin. Z něho se odštěpí vnitřní C-peptid a zbydou tak řetězce A a B, které se pomocí tří disulfidických můstků propojí na aktivní insulin. Sekrece insulínu se spustí při zvýšené hladině krevního cukru. Má za následek usnadnění vstupu glukosy do buněk kosterních svalů a tukové tkáně, čímž dojde ke snížení hodnoty glykemie (hladiny krevního cukru). Dále stimuluje proteosyntesu a zabraňuje rozpadu proteinů. V játrech účinky insulínu vyvolají zvýšené ukládání glukosy a podporu tvorby glykogenu [12].

Insulínu podobné růstové faktory I a II jsou proteiny tvořené na rozdíl od insulínu pouze jedním řetězcem o 70, respektive 67 aminokyselinách. Tyto růstové faktory se spolupodílí na regulaci řady procesů. IGF-I má výraznou aktivitu stimulující růst, oproti tomu IGF-II se uplatňuje prenatálně při růstu plodu. Sekrece IGF je stimulována růstovým hormonem, ovšem pro IGF-II mnohem méně [13].

Pro zprostředkování komunikace je potřeba další část systému, která přijme signál těchto mediátorů a předá ho dál. Jsou jimi receptory tvořené membránovými proteiny na povrchu buněk. Ke každému ze zmíněných růstových hormonů existuje příslušný buněčný receptor. Insulin se váže k insulinovému receptoru (IR), který je exprimován ve dvou isoformách tvořených alternativním sestřihem exonu 11 [14]. IR-B ve srovnání s IR-A potom obsahuje

navíc 12 aminokyselin kódovaných tímto exonem. Dále buňky produkují dva receptory pro IGF. Jimi jsou IGF-1R (z angl. *insulin-like growth factor type 1 receptor*) a IGF-2R (z angl. *insulin-like growth factor type 2 receptor*). IR a IGF-1R patří do skupiny receptorů s tyrosin-kinasovou aktivitou [15]. IGF-2R je také nazýván kation-nezávislý receptor pro manosu-6-fosfát (CI-MPR, z angl. *cation-independent mannose-6-phosphate receptor*), je schopný vázat IGF-II a spustit tak jeho degradaci, nebo transportovat prekurzory kyselých lysosomálních hydrolas Golgiho komplexu do lysosomu [16]. IR-A a IGF-1R jsou součástí mitogenní kaskády, IR-B je prostředníkem klasické metabolické dráhy. (Pozn. aut. – pro přehledné odlišení receptorů a jejich ligandů, jsou ligandy číslovány římskými číslicemi a receptory arabskými.)

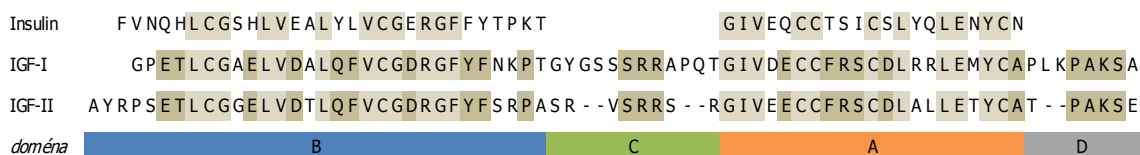
Dalšími účastníky IGF osy je šest IGF vazebných proteinů IGFBP-1 až -6 (z angl. *insulin-like growth factor binding protein*). Kontrolují biologickou dostupnost IGF a prodlužují jejich poločas života. K uvolnění IGF dochází modifikací IGFBP, například proteolysou nebo fosforylací, či přichycením k membráně. Kromě těchto vzájemně sekvenčně podobných proteinů s vysokou afinitou k IGF byly objeveny další vazebné proteiny s nižší afinitou k IGF. Díky jejich strukturní podobnosti k IGFBP byly nazvány IGFBP-příbuzné proteiny (*IGFBP-related proteins*). [17]

1.2 Struktura IGF-II

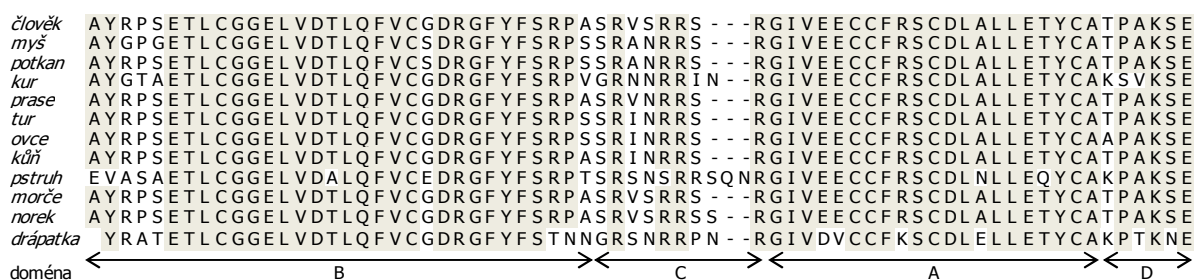
1.2.1 Primární struktura

Aminokyselinová sekvence IGF-II je téměř ze 60 % identická s IGF-I, identita vůči insulinu se blíží až k 50 %. Všechny tři zmíněné peptidy se skládají z několika podobných regionů. IGF se dělí na čtyři domény, směrem od N-konce k C-konci jsou to B, C, A a D. Doména C koresponduje s C-peptidem proinsulinu, domény A a B potom s A a B řetězci insulinu. Nejvyšší shodu v aminokyselinové sekvenci vykazují IGF-I a II v doménách A a B jak mezi sebou, tak v porovnání s A a B řetězci insulinu. [18, 19]

Řetězec je tvořený 67 aminokyselinami o molekulové váze 7,5 kDa. Zahrnuje devět pozitivně nabitých residuí, z toho osm argininů, a devět negativně nabitých. Dále sekvence obsahuje šest vysoce konzervovaných cysteinů, mezi kterými se tvoří tři disulfidické můstky. Napříč obratlovci je patrná vysoká evoluční konzervovanost s vybranými sekvencemi znázorněnými na Obrázku 2 (str. 12).



Obrázek 1: Porovnání primárních struktur insulínu, IGF-I a IGF-II. Aminokyseliny společné pro všechny tři proteiny jsou vyznačeny světle béžovou barvou, ty společné navíc mezi IGF-I a IGF-II jsou rozlišeny tmavě béžovou. Nejvyšší homologie je patrná v rámci domén B a A mezi všemi třemi proteiny. Barevné odlišení domén koresponduje s prostorovou strukturou na Obrázku 3 (str. 13)

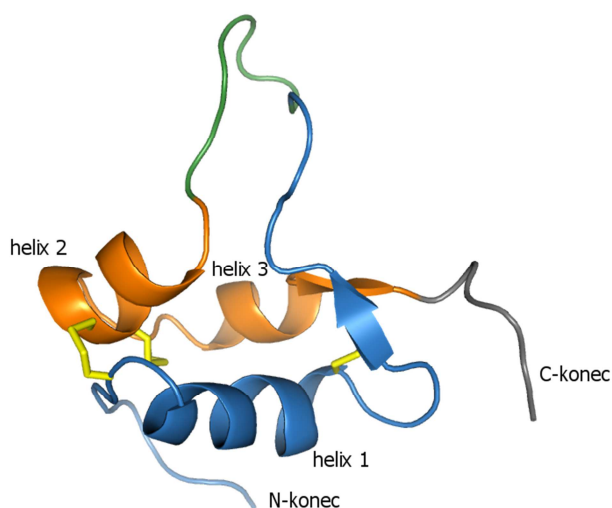


Obrázek 2: Sekvenční podobnost mezi IGF-II vybraných obratlovců. Z porovnání je patrné, že je zde velký stupeň evoluční zachovalosti. Nejvyšší míra heterogenity je pozorována v oblasti tvořené doménou C.

1.2.2 Sekundární a terciární struktura

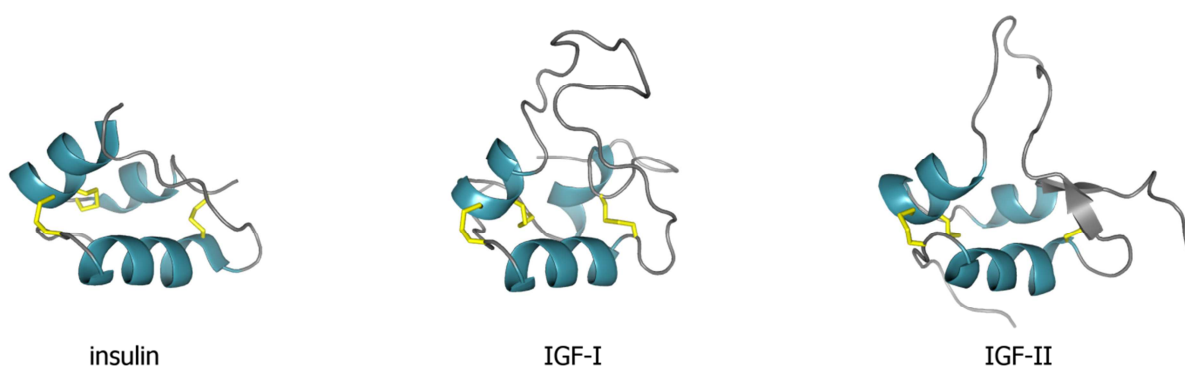
Struktura IGF-II je na rozdíl od IGF-I nebo insulínu mnohem méně prozkoumaná. Pro IGF-I bylo publikováno a uloženo v PDB databázi pět struktur získaných pomocí NMR experimentů [20–24] a šest strukturálních záznamů z dat krystalografických (z toho tři jsou pro IGF-I v komplexu s IGFBP) [25–30]. Oproti tomu struktura samotného IGF-II byla zveřejněna pouze ve dvou NMR studiích [31, 32]. Dále nalezneme krystalografické a NMR studie zabývající se komplexy IGF-II s vybranými doménami IGF-2R [33, 34] nebo krystalografickou publikací komplexu s insulin-degradujícím enzymem [35].

Majoritním strukturálním elementem všech tří peptidů jsou tři alfa helixy (viz Obrázek 4, str. 13) [24, 32, 36]. V molekule IGF-II je helix 1 tvořen aminokyselinami Gly¹¹-Cys²¹ domény B. Následuje beta otáčka typu I, ve které leží residua Gly²⁵-Tyr²⁷ proti Tyr⁵⁹-Ala⁶¹, a dlouhý nestrukturovaný úsek jako u insulínu a IGF-I. Aminokyseliny Ile⁴²-Arg⁴⁹ a Leu⁵³-Thr⁵⁸ v doméně A formují helixy 2 a 3, které jsou spojeny otáčkou tvořenou Ser⁵⁰-Asp⁵² a jsou tak orientovány antiparalelně. Helixy dohromady s postranními řetězci hydrofobních aminokyselin (Leu⁸, Val¹⁴, Phe¹⁹, Val²⁰, Phe²⁶, Tyr²⁷, Phe²⁸, Ile⁴², Ala⁵⁴, Leu⁵⁵, Ala⁶¹) tvoří hydrofobní jádro proteinu formované do jedinečného insulínu podobného sbalení. Domény C a D jsou dle NMR experimentů vysoce flexibilní.



Obrázek 3: Strukturní elementy molekuly IGF-II. Struktura byla získaná pomocí NMR experimentů ve vodném roztoku o pH 3,1 při 300 K [32]. Barvy reprezentují jednotlivé domény vyznačené na Obrázku 1 (str. 12). Modrá – doména B, zelená – doména C, oranžová – doména A, šedá – doména D. Dva helixy se nacházejí v doméně A, jeden v doméně B. Poměrně velká část domény B a celé domény C a D tvoří vysoce flexibilní úseky. Celkovou konformaci stabilizují dva disulfidické můstky propojující domény B a A a jeden v rámci domény A. Ilustrace byla vytvořena za použití PDB souboru 1IGL v programu PyMOL 1.5.

Dalším jevem, který má IGF-II s IGF-I a insulinem společný, jsou tři disulfidické můstky tvořící třídimenzionální strukturu proteinu. Můstek mezi cysteiny na pozicích 9–47 je lokalizován na povrchu, zbylé dva můstky mezi cysteiny 21–60 a 46–51 jsou ukryty v jádru. Porovnání struktur všech tří proteinů s vyznačenými disulfidickými můstky poskytuje Obrázek 4.



Obrázek 4: Porovnání ligandů insulinové rodiny. Prostorové uspořádání helixů v molekulách insulinu, IGF-I a IGF-II s vyznačenými disulfidickými můstky. Všechny tři molekuly sdílí unikátní sbalení insulinového typu. Helixy jsou propojeny třemi disulfidickými můstky. Ilustrace byla vytvořena z PDB souborů 9INS, 2GF1 a 1IGL v programu PyMOL 1.5.

1.3 IGF-vazebné proteiny

Biologická dostupnost IGF je regulována skupinou šesti IGF-vazebných proteinů (IGFBP, z angl. *insulin-like growth factor binding protein*) o velikosti zhruba 30 kDa [37, 38]. Prodlužují poločas rozpadu IGF a umožňují jejich transport do tkání [39, 40]. Kontrolují akci IGF ve směru pozitivním, tedy umožnění vazby IGF na receptory uvolněním z komplexu IGF/IGFBP, nebo v druhé rovině vychytáváním volných IGF a zamezení nežádané receptorové interakce [41]. IGF jsou od IGFBP uvolňovány pomocí různých mechanismů. Buď dochází k modifikaci IGFBP jako je například fosforylace, glykosylace a proteolýza, nebo k vazbě IGFBP na extracelulární matrix [42, 43]. Regulace hladin IGFBP poskytuje účinný nástroj pro kontrolu endokrinní působení IGF v cílových tkáních [44].

Každý ze šesti IGFBP je organizovaný do tří domén (viz Obrázek 5, str. 15) o přibližně stejné velikosti, přičemž domény na N- a C-koncích, vysoce konzervované napříč jednotlivými proteiny, jsou propojeny „linker“ doménou L [45]. Dále se zde opakuje zachování osmnácti cysteinů kromě IGFBP-6, který jich obsahuje pouze šestnáct [46]. K vazbě IGF přispívají obě domény, jak bylo ukázáno studii s doménovými fragmenty, kdy N- i C-koncový fragment IGFBP vázal IGF s až tisíckrát nižší afinitou než IGFBP o celé délce [47–54]. Na doménách L se nacházejí místa pro post-translační modifikace, jako jsou fosforylace a glykosylace [45]. Glykosylace, v porovnání s fosforylací, neovlivňuje afinitu k IGF přímo, ale působením na ostatní vlastnosti IGFBP, jakými je stabilita, přístupnost proteasám a buněčná adheze [55–57]. C-doména vykazuje sbalení thyreoglobulinového typu 1, jak ukázaly struktury získané nukleární magnetické resonancí nebo krystalografickými studii fragmentů IGFBP-1, -2, -4 a -6 [29, 58–60]. Strukturní podobnost N-koncové domény není tak výrazná. Objevují se zde úseky formující beta listy z různých počtů řetězců. Co však mají společného je bohatost na cysteiny, které napomáhají prostorovému sbalení [26, 29, 30, 47, 61].

IGFBP-1 až IGFBP-5 váží přednostně IGF-I než IGF-II. Afinita IGFBP-6 k IGF-II je až stokrát vyšší než k IGF-I [62]. Tato vazebná preference k IGF-II může odrážet skutečnost, že z dvanácti konzervovaných cysteinů na N-konci dva chybí (viz Obrázek 5, str. 15). Díky tomu dochází k jinému provázání disulfidickými můstky, jak bylo ukázáno na hmotnostní spektrometrii s pomocí ionizace elektrosprejem [46]. Nejhojnější zastoupení v séru má IGFBP-3, který tvoří ternární komplex s IGF-nevázající podjednotkou ALS (z angl. *acid labile subunit*) a IGF o velikosti 150 kDa [63]. Tyto velké komplexy nejsou schopné procházet epitheliální vrstvou cév a tvoří tak zásobní jednotku IGF v krevní cirkulaci. Teprve

menší, binární, komplexy IGF s IGFBP-1, -2, -4 a -6 mohou kapilární stěnou procházet a přivádět tak IGF do cílových tkání [64, 65].



Obrázek 5: Doménové organizace IGF vazebných proteinů. IGFBP-1 až -6 s vyznačením propojení prostřednictvím disulfidických můstků. Sekvence IGFBP-6 je o dva cysteiny chudší v porovnání s IGFBP-1 až -5, což vede v jiné provázání cysteinových můstků. N-koncová a C-koncová doména jsou zodpovědné za vazbu IGF. V rámci domény L se nachází fosforylační místa, proteolytická sekvence nebo glykosylační místa. Ilustrace vytvořena na základě [66].

Kromě interakcí s IGF vykazují IGFBP i účinky nezávislé na IGF ose. Mezi nimi jsou například inhibice proliferace nebo indukce apoptosy v nádorových buňkách [67, 68]. Tyto efekty jsou výsledkem schopnosti IGFBP proniknout do buňky a vstoupit do jádra a také možnosti interakce s komponenty extracelulární matrix, integrinů [69, 70] nebo jiných vazebných proteinů [71].

Kromě těchto šesti IGF vazebných proteinů byly identifikovány ještě další čtyři proteiny, jejichž alespoň jedním z názvů je IGF vazebný protein. Jedná se o (i) MAC25 protein / Prostacyklin stimulující faktor / IGFBP příbuzný protein 1 / IGFBP-7, (ii) CTGF (růstový faktor pojivové tkáně, z angl. *connective tissue growth factor*) / IGFBP-8, (iii) NovH (homolog proteinu NOV, z angl. *nephroblastoma-overexpressed*, protein overexprimovaný v nefroblastomu) / IGFBP-9 a (iv) CYR61 (angiogenní induktor bohatý na cysteiny, CYR z angl. *cysteine-rich*). Poslední tři zmíněné se dle prvních písmen svých názvů řadí do skupiny CCN (CTGF, CYR61, NovH). Hrají roli v různých buněčných procesech, jakými jsou například tvorba extracelulární matrix, buněčná adheze, migrace, proliferace nebo diferenciace. Dále se účastní některých biologických akcí, mezi nimiž jsou angiogeneze, zánětlivost, hojení ran nebo tumorigeneze. [72–74]

1.4 Biologické chování IGF

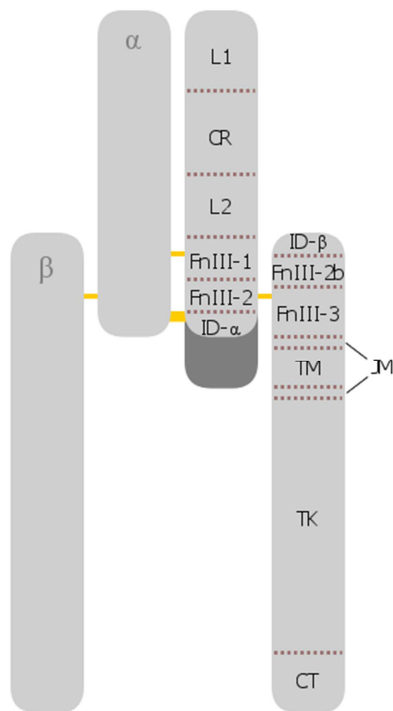
U hlodavců bylo pozorováno, že k expresi IGF-II dochází především během nitroděložního vývoje plodu [75]. Biologická funkce IGF-II je tedy spojována se stimulací růstu buněk a jejich diferenciací. Cílená delece genu *Igf2* vedla u myši k narození zakrnělých

jedinců [76] a při řízené nadměrné expresi IGF-II se plod myši narodil přerostlý a s malformacemi charakteristickými pro Beckwithův-Wiedemannův syndrom (syndrom nadměrného růstu a zvýšeného rizika nádorů) [77–79]. Během puberty a dospělosti pak dochází ke zvýšení hladiny IGF-I, který je produkován například tkáněmi plic, ledvin nebo v kostech. U lidí však tento model exprese IGF-II jako růstového faktoru plodu a IGF-I jako růstového faktoru dospělého jedince nebyl pozorován [80, 81].

1.4.1 Interakce s IGF-1R

IGF-1 receptor patří spolu s insulinovým receptorem do rodiny tyrosin-kinasových receptorů. Strukturně je IGF-1R velice podobný insulinovému receptoru. Je tvořen jako homodimer podjednotkami α a β . Podrodina insulinových receptorů je tvořena 11 odlišnými úseky (schematicky znázorněno na Obrázku 6, str. 17), které byly identifikovány v každém z monomerů. N-koncová část ektodomén obsahuje dvě homologní domény L1 a L2, mezi nimiž se nachází region bohatý na cysteiny (CR) tvořený 24 cysteiny ve třech opakujících se jednotkách [82–84]. C-koncová část sestává ze tří fibronektinových domén typu III, z nichž druhá obsahuje velkou insertní doménu (ID) [85, 86]. Intracelulární část receptoru tvoří tyrosin-kinasová katalytická doména lemovaná dvěma regulačními oblastmi. Jednou z nich je juxtamembránový (přiléhající k membráně) region tvořený residui 930–972, druhá oblast sestává z C-konce připomínající ocásek v oblasti aminokyselin 1230–1337, kde se nacházejí tyrosinová residua tvořící vazebné místo pro fosforylaci [87].

Vazba hormonu na IGF-1 receptor prostřednictvím interakcí C-koncové domény β -podjednotky stimuluje mitogenesi buňky [88]. Ovlivňuje tak funkce spojené s podporou růstu v různých typech buněk. Několik studií se věnovalo dopadům ovlivnění genu tohoto receptoru a jeho vazebných partnerů. Myši s narušeným *Igf1* genem vykazují výrazný růstový deficit, rodí se s 60 % normální porodní váhy a mnohdy krátce po porodu umírají. Závažnější následky má zásah do genu receptoru *Igf1r*, kdy novorozené myši vždy umírají a jejich porodní váha je 45 % normální porodní váhy. Kromě orgánové hypoplasie je u těchto embryí patrný zásah nejen do vývoje svalů, kostí a kůže, ale i do centrální nervové soustavy [89]. Další z funkcí IGF-1R je ochrana před apoptosou. Tuto funkci zajišťují tyrosinová residua na C-konci β -podjednotky, avšak nejedná se o stejný region, který kontroluje funkci mitogenní [90].



Obrázek 6: Doménová organizace IGF-1R a IR. Receptor je tvořen jako heterotetramer dvěma typy podjednotek, α a β , navzájem propojených disulfidickými vazbami. Podjednotka α sestává ze dvou velkých domén (L1 a L2), úseku bohatého na cysteiny (CR), domén fibronektinového typu III (FnIII) a insertní domény, která v případě IR-B isoformy nese úsek kódovaný exonem 11 (znázorněn tmavě šedou barvou). Podjednotka typu β se skládá z další části insertní domény (ID), domén fibronektinového typu III (FnIII), transmembránové domény (TM), juxtamembránové domény (JM), tyrosin-kinasové domény (TK) a C-koncové domény (CT).

1.4.2 Interakce s IR

Insulinový receptor je transmembránový receptor s tyrosin-kinasovou aktivitou. Je kódován jedním genem, ze kterého vychází dvě isoformy lišící se přítomností exonu 11, který kóduje 12 aminokyselin na C-konci [91–93]. Buňka tedy produkuje isoformy IR-A (-exon 11) a IR-B (+exon 11). Prekurzor receptoru je glykosylován na extracelulárních regionech řetězců, dimerizován a proteolyticky rozdělen na α - (o velikosti asi 135 kDa) a β - (asi 95 kDa) řetězce. Receptor je složen ze dvou extracelulárních podjednotek α a dvou transmembránových podjednotek β , které tvoří uspořádání β - α - α - β [94, 95] a jsou propojeny čtyřmi disulfidickými můstky. Výsledný receptor sestává ze dvou polovin, tvořených podjednotkami α a β , buď jako homodimer jedné z isoform (IR-A nebo IR-B), nebo jejich kombinací jako heterodimer IR-A/B. Hlavní faktory pro vazbu ligandu se nacházejí na α -podjednotkách [96, 97] a tyrosin-kinasová doména je lokalizována v cytoplasmatické části β -podjednotek [98]. Doménová organizace insulinového receptoru je shodná s organizací

v IGF-1R (viz Obrázek 6, str. 17), která byla popsána výše. Při navázání ligandu na extracelulární část receptoru dojde ke konformačním změnám receptoru vedoucím k autofosforylaci tyrosinových residuí β -podjednotky, a tím ke zvýšení vnitřní kinasové aktivity vlastního receptoru [99].

Forma IR-A je exprimována hlavně ve fetálních nebo rakovinných buňkách, forma IR-B je majoritně tvořena v diferenciováných buňkách, které jsou cílovým místem insulinu [100, 101]. Zatímco IR-B váže specificky téměř výhradně insulin, IR-A vykazuje kromě afinity k insulinu také vysokou afinitu k IGF-II a nižší afinitu k IGF-I [101].

1.4.3 Interakce s IGF-2R

IGF-2 receptor je také známý pod názvem kation-nezávislý receptor pro manosu-6-fosfát. Jde o membránový receptor, který na povrchu buněk váže IGF-II a v trans-Golgiho aparátu manosu-6-fosfát. Sestává z krátké cytoplasmatické C-koncové domény, která je skrze transmembránovou doménu propojena s doménou extracelulární tvořenou 15 homologickými regiony. Dle krystalografických studií sdílí domény 1, 2, 3 a 11 strukturní uspořádání sestávající ze zploštělého β -barelu tvořeného dvěma čtyř-řetězcovými antiparalelními β -listy, které jsou vzájemně propojeny čtyřmi disulfidickými vazbami. Domény 3, 5 a 9 vykazují vazebné schopnosti k ligandům obsahujícím manosu-6-fosfát. Zatímco vlastní vazba IGF-II je utvářena prostřednictvím domény 11, věří se, že svůj příspěvek zde má i doména 13 stimulací vazby snížením samotného uvolňování IGF-II. Poslední studie ukazují, že pro vazbu manosa-6-fosfátů a zakomponování ligandů IGF-2R v membráně funguje jako homodimer, což usnadňuje kooperaci domén 11 a 13 při vazbě IGF-II [102, 103]. IGF-2R váže s velkou afinitou IGF-II, ale IGF-I pouze s velmi nízkou afinitou a insulin neváže vůbec [104–106].

Zatím se zdá, že tento receptor nemá žádnou vnitřní aktivitu a jeho účast v IGF systému tak pravděpodobně sestává z vázání IGF-II, čímž ho posune k degradaci. Snížená funkce IGF-2R pozorována u nádorových onemocnění je spojována se zvýšeným růstem nádorových buněk a nádorovou progresí [107, 108]. K tomu dochází při ztrátě heterozygoty nebo mutace receptoru, což vede k zvýšeným koncentracím IGF-II, který takto biologicky dostupný působí přes IGF-1R. Vzhledem k tomu, že IGF-2R vychytává IGF-II, čímž snižuje jeho dostupnost pro vazbu k IGF-1R a tedy brání mitogenním účinkům, je považován za tumor supresorový faktor. Funkce IGF-2R má významnou roli v embryonálním vývoji a správném růstu. Pokud myším chyběl tento receptor, zvýšila se jim hladina IGF-II v krevním oběhu, rodily se veliké a krátce po narození zemřely na srdeční hyperplazii [109].

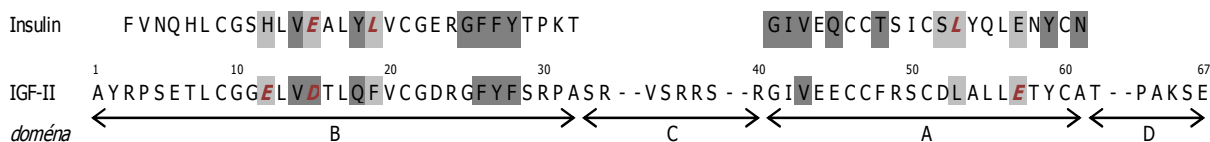
1.4.4 Vazebná místa IGF-II

V posledních dvaceti letech byla vazebná místa IGF a insulinu vůči insulinovému receptoru i receptorům pro IGF intenzivně studována. Při určování vazebných residuí IGF se mimo jiné vychází ze znalostí získaných pracemi s insulinem. V molekule insulinu byla nejprve identifikována skupina třinácti aminokyselin přispívajících k vazbě na insulinový receptor, později dalších šest residuí s významným podílem na vazebných interakcích [110–112]. První skupina je označována jako vazebné místo 1, nebo klasická vazebná část, a je tvořena residuí (v závorce vždy příslušné aminokyseliny v IGF-II) Gly^{A1} (Gly⁴¹), Ile^{A2} (Ile⁴²), Val^{A3} (Val⁴³), Glu^{A5} (Glu⁴⁵), Thr^{A8} (Phe⁴⁸), Tyr^{A19} (Tyr⁵⁹), Asn^{A21} (Ala⁶¹), Val^{B12} (Val¹⁴), Tyr^{B16} (Gln¹⁸), Gly^{B23} (Gly²⁵), Phe^{B24} (Phe²⁶), Phe^{B25} (Tyr²⁷) a Tyr^{B26} (Phe²⁸). Druhá skupina je referována jako vazebné místo 2, ve kterém byly identifikovány aminokyseliny Ser^{A12} (Asp⁵²), Leu^{A13} (Leu⁵³), Glu^{A17} (Glu⁵⁷), His^{B10} (Glu¹²), Glu^{B13} (Asp¹⁵) a Leu^{B17} (Phe¹⁹). Vazebná místa jsou souhrnně vyznačena na Obrázku 7 (str. 20).

V molekule IGF-II byla potvrzena interakce residuí Val¹⁴, Phe²⁸, Val⁴², Phe²⁶ a Tyr²⁷ při vazbě k receptorům IR a IGF-1R [113, 114]. Tyto aminokyseliny dohromady tvoří hydrofobní vrstvu potřebnou pro interakci s IR a IGF-1R. Aminokyseliny odpovídající Val⁴³ IGF-II v molekulách insulinu (Val^{A3}) a IGF-I (Val⁴⁴) jsou pro vazbu k příslušným receptorům značně důležité, neboť mutace Val^{A3}→Met v insulinu je spojována s onemocněním diabetes mellitus [115] a ekvivalentní mutace v IGF-I (Val⁴⁴→Met) byla identifikována u pacientů se závažným zpomalením růstu [116, 117]. Na okraji hydrofobního shluku IGF-II se v pozici 18 nachází glutamin, který hraje roli ve specifickém rozpoznání IGF-1R [114]. Mutace Gln¹⁸→Ala snížila afinitu k IGF-1R, ale byla bez efektu na vazbu k IR. Nižší afinita k IGF-1R byla pozorována i při zavedení odpovídající mutace do IGF-I (Gln¹⁵→Ala) [118].

Významně sníženou afinitu k IR a IGF-1R mělo pět ze šesti alaninových mutantů IGF-II v rámci aminokyselin tvořících vazebné místo 2 (Glu¹², Asp¹⁵, Phe²⁹, Leu⁵³, Glu⁵⁷) [114]. Analog s alaninovou mutací v pozici Asp⁵² vyloučil příspěvek této aminokyseliny k vazebným interakcím stejně jako ekvivalentní analog IGF-I (Asp⁵³→Ala) [119]. Nejvýraznější efekt snížení vazebné afinity k IR-A i IGF-1R byl pozorován u mutací residuí Glu¹², Asp¹⁵ a Glu⁵⁷, tedy těch s polárními postranními řetězci. Stejný trend byl pozorován i pro IGF-I v rámci vazby k IGF-1R [119]. Na druhou stranu v molekule insulinu k vazbě na vazebné místo 2 IR přispívají aminokyseliny Leu^{A13}, Glu^{B13} a Leu^{B17}, které odpovídají pozicím Leu⁵³, Asp¹⁵ a Phe¹⁹ v IGF-II [120]. Z toho vyplývá, že v rámci aktivity ve vazebném místě 2 má IGF-II více společného s IGF-I, než s insulinem, jak je tomu i v konzervovanosti

aminokyselinové sekvence. Spolu se studií vazeb na hybridní receptory IR/IGF-1R [121] dávají tyto poznatky možnosti k vysvětlení zachování vazebných schopností IGF k hybridním receptorům, v kontrastu s insulinem, který má tuto kapacitu s velmi nízkou afinitou [122].



Obrázek 7: Aminokyseliny v sekvencích insulinu a IGF-II zodpovědná za vazbu k receptorům. Tmavě šedá reprezentuje vazebné místo 2, světle šedá vazebné místo 1. Červeně kurzívou jsou znázorněna residua nejvýznamnější pro vazbu k IR (insulin) nebo IGF-1R (IGF-II). Obrázek sumarizuje poznatky ze studií mutantních ligandů rozebrané v kapitole 1.4.4.

Vazebné afinity IGF-II vůči IGF-1R byly dále zkoumány z hlediska dvou forem receptoru [114]. Jednou z nich byl IGF-1R o celé délce, druhou zastupoval tak zvaný mini-IGF-1R, který sestává z prvních tří domén (L1, CR, L2) spojených s α -podjednotkou. Mini-IGF-1R tedy postrádá domény fibronektinového typu III, které jsou pravděpodobně zodpovědné za interakci s vazebným místem 2 [111, 123, 124]. Experiment je založen na následující hypotéze. Při pozorování snížených vazebných schopností analogů pro obě verze receptorů se mutace tohoto analogu nachází ve vazebném místě 1. Při zachování vazebné afinity k mini-IGF-1R za současně snížené afinitě k celému receptoru náleží mutace použitého analogu do vazebného místa 2. Zmíněné experimenty vedou k chápání vazebného místa 1 IGF-II tvořeného aminokyselinami Val¹⁴, Gln¹⁸, Phe²⁸, Val⁴³ a Asp¹⁵. Vazebné místo 2 potom tvoří aminokyseliny Phe¹⁹, Leu⁵³, Glu¹², Glu⁵⁷. Oproti insulinu je tedy Asp¹⁵, ležící v α -helixu domény B, ještě součástí vazebného místa 1. Nachází se vedle Val¹⁴ a Gln¹⁸ a blízko výše zmíněných residuí tvořících hydrofobní shluk. Souhrnné vyznačení aminokyselin IGF-II účastnících se vazeb k receptorům je na Obrázku 7.

Zajímavé je zjištění, že všechny výše zmíněné analogy IGF-II vykazují schopnost stimulovat fosforylaci IR a IGF-1R odpovídající jejich vazebné afinitě, vyjma analogu Glu¹²→Ala, který vykazoval nižší potenci fosforylace, než bylo očekáváno dle naměřené afinity. Na tuto pozici se zaměřila další studie [125] s hypotézou, že aminokyselina v tomto místě je zodpovědná za provázání obou polovin receptoru. V předchozích experimentech vykazoval analog Glu¹²→Ala výraznější snížení afinity při měření afinity na celých buňkách (membránově vázané receptory), než v uspořádání s rozpustným receptorem. Při změně směrem k pozitivnímu náboji, jako je tomu na ekvivalentním místě v insulinu (His^{B10}), došlo

ke snížení afinity k IR-A i IGF-1R. Stejný efekt byl pozorován i v případě IGF-I, kdy záměna Glu⁹→Lys vedla ke snížené afinitě k IGF-1R [126]. Naopak taková změna v insulinu, kdy analog nese namísto His^{B10} záporný náboj, je doprovázena zvýšením afinity vůči IR a IGF-1R a výraznější mitogenní aktivitou [127–129]. Histidin v pozici B10 insulinu koordinuje ionty zinku a umožňuje tak vznik insulinových hexamerů, ze kterých je insulin v případě potřeby uvolňován. Pozoruhodné také je, že změna Glu¹² v IGF-II na Lys nebo His má větší vliv na vazbu IGF-1R než IR-A. IR-A tedy vykazuje větší míru tolerance pozitivního náboje v tomto místě, což poukazuje na různý charakter druhých vazebných kapes těchto receptorů.

1.4.5 Databáze modifikací IGF a insulinu

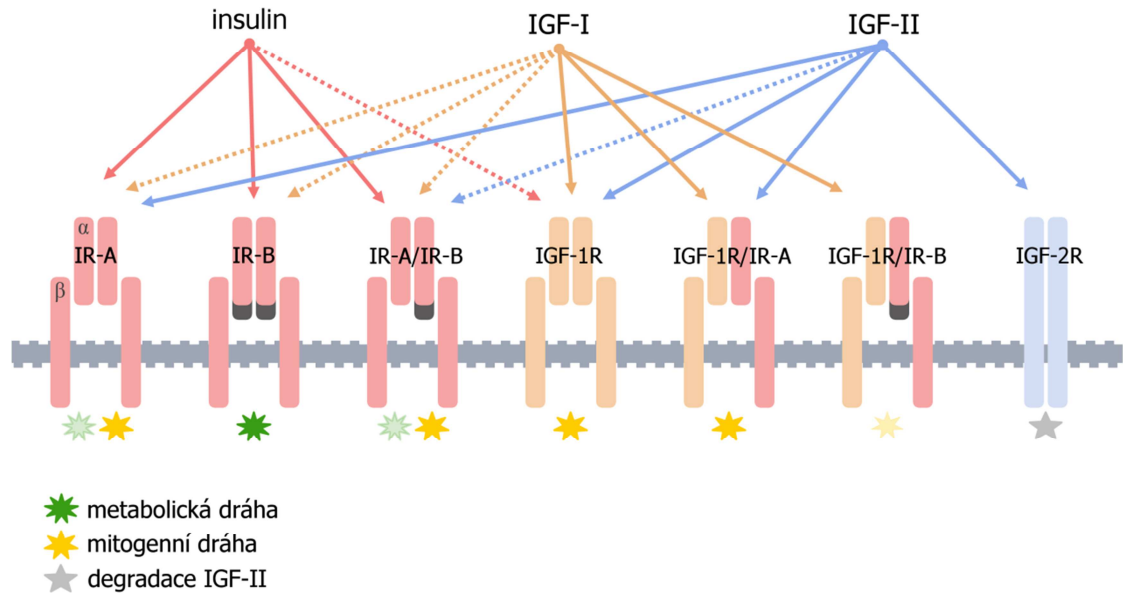
Klíčové poznatky na poli poznávání mechanismu působení IGF systému, tedy jakým způsobem insulin a IGF vyvolávají biologický účinek, se získávají pomocí zkoumání strukturních aspektů ligandů v ovlivnění afinity k jednotlivým receptorům. Začátky těchto studií se datují k 80. letům minulého století, takže není divu, že za tu dobu byly prozkoumány stovky specificky designovaných analogů insulinu nebo IGF a toto číslo stále roste. Orientace v tomto prostředí vyžaduje hlubokou znalost všech dosavadních prací. Bohužel toto vše ještě stěžuje neuniformnost v názvosloví analogů a rozmanitost používaných metod. Tomuto problému se věnovala skupina Biochemie na Univerzitě v Adelaide, která si dala práci s vytvořením webové databáze pro sjednocení dosažených výsledků v oblasti vazebných interakcí mutovaných IGF [130].

Tato databáze je veřejně volně přístupná a usnadňuje tak navrhování nových projektů výzkumu IGF. K dnešnímu datu (10. května 2014) obsahuje 547 záznamů o publikacích mutantních IGF. Vyhledávací nástroj umožňuje filtrování dat v několika rovinách. Na výběr je z typu ligandu (IGF-I nebo IGF-II), domény (B, C, A nebo D), typu mutace (pouze jedné aminokyseliny, obsahující jednobodovou mutaci, více jednobodových mutací, delece, inserce, N-koncové mutace, C-koncové mutace nebo chiméry) a také jaká aminokyselina se mění v kterou. Dále databáze umožňuje vyhledávání podle typu a přípravy receptoru, na kterém byly zkoumány vazby ligandu, jaký byl použit indikátor a metoda. Případně lze třídit analogy podle toho, jakou část afinity některého z ligandů si zachovávají.

1.4.6 Signální odpověď

Díky vysoké homologii nejen mezi zmíněnými růstovými hormony, ale i v rámci jejich receptorů, jež jsou součástí komplexního signalizačního systému IGF, dochází k vzájemným interakcím mezi vazebnými partnery a receptory. V důsledku toho i k prolínání škály

fyziologických účinků spouštěných aktivací daných receptorů. Schematické znázornění vazebných možností jednotlivých ligandů je ilustrováno na Obrázku 8.



Obrázek 8: Vazebné efekty napříč signální systémem IGF. Slabší vazebné interakce jsou znázorněny tečkovaně. Insulin se váže k receptorům IR-A, IR-B a jejich heterodimernímu receptoru. Slabší interakce je pozorována k receptoru IGF-1R. Molekula IGF-I vykazuje vazebné schopnosti směrem k receptoru IGF-1R a jeho heterodimerním formám s IR-A nebo IR-B. Slaběji se váže k různým formám IR. IGF-II interaguje s receptory IGF-1R a IR-A, ale ne s isoformou insulinového receptoru typu B nebo jejími heterodimerními formami. Jako jediný z těchto tří proteinů je IGF-II schopný vazby k IGF-2R. Vazba ligandu na IR-B spouští metabolickou dráhu signalizace, vazba k IGF-1R mitogenní. IGF-2R reguluje biologickou dostupnost IGF-II spuštěním degrační dráhy.

Insulinový receptor a IGF-1 receptor spouští dvě různé signální dráhy. V prvním kroku po navázání ligandu receptor podstoupí autofosforylační proces, který umožní navázání různých signalizací zprostředkujících molekul. Těmi jsou substráty insulinového receptoru (IRS, z angl. *insulin response substrate*) nebo proteiny obsahující Src homologní doménu 2 (Shc, z angl. *Src-homology 2 domain containing*). Ligandem vyvolaný děj se v tomto momentě nasměruje do jedné ze dvou kaskád. Metabolická dráha je spuštěna následnou aktivací fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3K) vedoucí k fosforylaci Akt, neboli protein kinasy B (PKB). Prostřednictvím této dráhy stimuluje insulin vychytávání glukosy a aktivuje jaterní glukoneogenesi. Druhá signální dráha zahrnuje aktivaci mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPK, z angl. *mitogen activated protein kinase*) směřující k aktivaci Ras

proteinu. Sled těchto událostí vede k aktivaci transkripčních faktorů kontrolujících buněčné dělení a diferenciaci, jedná se tedy o mitogenní signální dráhu. [131–135]

Studie z posledních let poukazují na korelaci mezi léčbou diabetu a rozvojem rakovinného bujení. U některých insulinových analogů byl pozorován zvýšený potenciál onkologického rizika [128, 136, 137]. Insulinové receptory, zodpovědné za přenos metabolických i mitogenních účinků insulinu a IGF, jsou v nádorových buňkách exprimovány obvykle ve vysokých koncentracích [138, 139]. Vysoká míra exprese byla pozorována i pro IGF-1 receptor a jeho ligandy v buňkách rakovinného typu [140–142]. Naopak některé studie těžce kritizují asociaci insulinových analogů a rakoviny [143, 144], avšak tento vztah nebyl na základě dostupných experimentálních dat dosud ani potvrzen, ani vyvrácen.

1.5 Cíl práce

Práce je součástí společného projektu skupiny Strukturní biologie, kde byla vypracována, a skupiny Dr. Jiřího Jiráčka. Oba výzkumné týmy spadají do oboru Biochemie a molekulární biologie na Ústavu organické chemie a biochemie (AV ČR, v.v.i.). Projekt je zaměřen na definici vazebných charakteristik insulinu, IGF-I a IGF-II vůči příslušným receptorům. Metodami zvolenými pro tyto účely jsou sledování vazebných interakcí a změn strukturních vlastností těchto ligandů při zanesení modifikací do primární struktury. Navržené analogy jsou potom připravovány cestou enzymové semisyntézy nebo rekombinantně.

Cíle diplomové práce jsou následující:

- Rekombinantní příprava, purifikace a biologická charakterizace IGF-II a jeho analogů.
- Rekombinantní příprava a purifikace isotopově obohaceného IGF-II pro NMR experimenty.
- Objasnění agregačního chování IGF-II při NMR experimentech.

2 Materiál

2.1 Bakteriální kmeny, plasmidy a kultivační média

Escherichia coli BL21 (DE3)

Kompetentní *E. coli* s DE3 λ profágem nesoucím gen T7 RNA-polymerasy pod transkripční kontrolou *lacUV5* promotoru (Novagen, USA).

Expresní vektory

Používané expresní vektory byly připraveny ve školící laboratoři.

- pHis₆-GB1-Gly⁻¹-IGF-II (*pHis₆GB* dar od Mgr. et Mgr. Evžena Bouři, Ph.D., odvozeno od *pRSFDuet-1*, Novagen, USA):

IGF-II ve fúzi s imunoglobulin vázající doménou B1 proteinu G (*Streptococcus*) se štěpící sekvencí rozpoznatelnou TEV proteasou

Mutace zanesené do tohoto vektoru:

- bodová mutace Ser²⁹→Asn
 - inserce Gly-Ser za Arg³⁴
 - inserce Pro-Gln za Ser³⁹
 - inserce Gly-Ser za Arg³⁴, Pro-Gln za Ser³⁹
- pNusA-His₆-(GlyAlaMet)⁻¹-IGF-II (*odvozeno od pETM-60*, EMBL, Německo):
- IGF-II ve fúzi s transkripčně terminačním proteinem NusA (*E. coli*) se štěpící sekvencí rozpoznatelnou TEV proteasou

LB médium

10 mg/ml Trypton (Difco, USA); 5 mg/ml Yeast Extract (Difco, USA); 5 mg/ml NaCl.

LB agar

15 mg/ml agar (Difco, USA); 1% (w/v) glukosa; 30 mg/l kanamycin.

Minimální médium (MM)

0,4% (w/v) glukosa; 1 g/l (NH₄)₂SO₄; 17,16 g/l Na₂HPO₄·12H₂O; 3 g/l KH₂PO₄; 0,5 g/l NaCl; 96,5 mg/l Na₂SO₄·10H₂O; 50 mg/l EDTA; 16 mg/l MnCl₂; 8 mg/l FeCl₂·6H₂O; 0,5 mg/l ZnCl₂; 0,185 mg CuCl₂·2H₂O; 0,1 mg/l H₃BO₃; 60,25 mg/l MgSO₄; 22 mg/l CaCl₂·2H₂O; 0,5 mg/l biotin; 0,5 mg/l thiamin.

Isotopově obohacené minimální médium

MM, které obsahuje glukosu (U-¹³C₆, 99%) a (NH₄)₂SO₄ (¹⁵N₂, 99%).

2.2 Chemikálie

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, USA
Acetonitril pro HPLC (ACN)	Sigma-Aldrich, USA
Akrylamid (AA)	Fluka, Švýcarsko
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Lachema, Česká republika
D-Biotin	Sigma-Aldrich, USA
Deuterium oxid (99,90%)	Euriso-top, Francie
Deoxycholová kyselina (DOC)	Merc, Německo
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema, Česká republika
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	Lachema, Česká republika
Dodecylsíran sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Dusičnan stříbrný	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Penta, Česká republika
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	Lachema, Česká republika
Ethyl-β-D-thiogalaktosid (ETG)	laskavě poskytl Jan Ježek (ÚOCHB AV ČR, v.v.i.)
Fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Švýcarsko
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, USA
D-Glukosa	Penta, Česká republika
D-Glukosa (U- ¹³ C ₆ , 99%)	Cambridge Isotope Laboratories, USA
Glutathion oxidovaný	Sigma-Aldrich, USA
Glutathion redukováný	Sigma-Aldrich, USA
Glycerol	Penta, Česká republika
D-Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan draselný	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát	Lachema, Česká republika
Hydroxid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid draselný	Lachema, Česká republika
Chlorid kobaltnatý hexahydrát	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid manganatý	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid měďnatý dihydrát	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid sodný	Lachema, Česká republika
Chlorid vápenatý dihydrát	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid zinečnatý	Lachema, Česká republika
Chlorid železitý hexahydrát	Sigma-Aldrich, USA
Imidazol	Fluka, Švýcarsko
Kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina chlorovodíková	Lachema, Česká republika

Kyselina octová	Lachema, Česká republika
Kyselina tetradeuterooctová (99,9%)	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina trihydrogenboritá	Sigma-Aldrich, USA
Lysozym	Sigma-Aldrich, USA
β -Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Penta, Česká republika
Močovina	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycin (Bicin)	Sigma-Aldrich, USA
N,N'-methylen-bis(akrylamid) (BIS)	Fluka, Švýcarsko
Persíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, USA
Síran amonný	Sigma-Aldrich, USA
Síran amonný ($^{15}\text{N}_2$, 99%)	Cambridge Isotope Laboratories, USA
Síran hořečnatý	Sigma-Aldrich, USA
Síran sodný dekahydrát	Fluka, Švýcarsko
Thiamin	Sigma-Aldrich, USA
Thiosíran sodný	Lachema, Česká republika
Trifluoroctová kyselina (TFA)	Fluka, Švýcarsko
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, USA
Triton	Merc, Německo
Uhličitan sodný	Penta, Česká republika

2.3 Ostatní materiál

Kolona pro afinitní chromatografii HisTrap HP 5 ml, GE Healthcare Life Sciences, USA

Kolona pro gelovou permeační chromatografii Superdex 75 10/300 GL Tricorn, Amersham Biosciences, Velká Británie

Odsolovací kolona Chromabond C₄ 1 ml, Macherey-Nagel, Německo

Kolony pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii: 214TP54-C4 Vydac, 25×4,6 mm; 214TP510-C4 Vydac, 250×10 mm

Chromatografický nosič HIS-Select Nickel Affinity Gel, Sigma-Aldrich, USA

Odstředivá filtrační zařízení Amicon Ultra 4 ml, Millipore, USA

Celulosové dialyzační membrány s mezní velikostí pórů 10 kDa, Sigma-Aldrich, USA

Standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE Broad range, Bio-Rad, USA

Standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE a WB přenos bílkovin Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo scientific, USA

Standard molekulových hmotností pro gelovou chromatografii, Sigma-Aldrich, USA

Nitrocelulosová membrána pro WB přenos bílkovin Hybond-C Extra, Amersham, Biosciences, Velká Británie

Filtrační papír pro WB přenos bílkovin, Sigma-Aldrich, USA

Monoklonální protilátka Anti-polyhistidine konjugovaná s křenovou peroxidasou, Sigma-Aldrich, USA

Přírodní celofán k sušení gelů po SDS-PAGE, Pemar, Česká republika
 Jednorázové filtry na injekční stříkačku (0,8 a 0,22 μm), Millex-GS, USA
 Jednorázové filtry 0,22 (μm), Sigma-Aldrich, USA
 Proteasa *Tobacco etch virus* (TEV), připravena ve školící laboratoři

2.4 Přístrojové vybavení laboratoře

Centrifugy	Eppendorf MiniSpin, Německo Hermle Z 323 K, rotor 220.80 V03, Německo Beckman Coulter, Avanti J-E, rotory JA-14 a JA-20, USA Beckman J-6M, rotor JS 4.0, USA
Spektrofotometry	Ultrospec 3100pro, Amersham Biosciences, Velká Británie NanoDrop ND-1000, USA
Elektroforetická souprava	Mighty Small II SE250, Hoefer Scientific Instruments, USA zdroj napětí: Consort EV243, Sigma-Aldrich, USA
Souprava na western blot přenos	The W.E.P. Company, USA; zdroj Consort EV243, Belgie
Autokláv	Unisteri HP, BMT Medical Technology, Německo
Rotační inkubátory	Gallenkamp, Velká Británie Sanyo Orbital Incubator, Japonsko
Kontrastní mikroskop	Carl Zeiss Jena, Německo
Emulsiflex	EmulsiFlex-C3, Avestin, Kanada
Stavebnicové čerpadlo	SC4, Vývojové dílny AV, Česká republika
Kapalinový chromatograf	Äkta basic, Amersham Biosciences, Velká Británie Äkta FPLC GE Healthcare Life Sciences; sběrač frakcí GE Frac-950, Velká Británie
Termostat	TCH 100, Laboratorní přístroje Praha, Česká republika Míchaná vodní lázeň (42 °C), Grant, P-Lab, Česká republika
Váhy	Adventurer Pro (OHAUS) AV2102CM, Schoeller instruments, USA
pH metr	GMH 3530, Greisinger electronic, Německo
Sonikátory	Sonic Dismembrator, Dynatech, Německo Soniprep 150 MSE, Velká Británie
Třepačka	Rotamax 120, Heidolph instruments, Německo
Magnetická míchačka	Jenway 1000, Velká Británie MR Hei-Tec, Heidolph instruments, Německo
HPLC	Čerpadlo Watrex 600, USA; duální UV/VIS detektor Waters 2487, Česká republika
NMR spektrometr	Bruker Avance II s pracovní ^1H frekvencí 600 MHz vybavený tříjadernou kryosondou, Německo

3 Experimentální metody

3.1 Expres rekombinantních proteinů

IGF-II (nebo jeho analogy) byl exprimován rekombinantně ve fúzi s proteinem GB1 nebo NusA. Jako hostitelské bakterie sloužily *E. coli* BL21 (DE3) transformované metodou teplotního šoku vybraným plasmidem. Transformace byla provedena přidáním 1 μ l (cca 50–100 ng) příslušného plasmidu ke 100 μ l suspenze kompetentních buněk *E. coli* o OD_{550nm} přibližně 0,2. Po inkubaci na ledu (45 min) byla směs vystavena teplotnímu šoku, kdy byla po dobu 90 s ve vodní lázni při 42 °C a následně 2 min na ledu. Takto ošetřená bakteriální směs byla zaočkována do 900 μ l LB média a ponechána 60 min v inkubátoru TCH 100 při 37 °C třepat na 150 ot./min. Po inkubaci byla suspenze po 350 μ l rozetřena na LB agarové plotny o průměru 20 cm, na které bylo použito 150 ml agaru s 1% (w/v) glukosou a kanamycinem o koncentraci 30 mg/l. Plotny byly umístěny do inkubátoru TCH 100, kde byly při 37 °C ponechány přes noc.

3.1.1 Kultivace His₆-GB1-Gly⁻¹-IGF-II

3.1.1.1 Použití LB média

Z každé plotny byly narostlé kolonie smyty 10 ml LB média s kanamycinem (30 mg/l) a na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro* byla změřena OD_{550nm} takto získaného inokula. Inokulum bylo následně použito k zaočkování vždy 500 ml LB média s 0,4% (v/v) glycerolem a kanamycinem (30 mg/ml) ve dvoulitrových Erlenmayerových baňkách tak, aby výsledná OD_{550nm} byla přibližně 0,1.

3.1.1.2 Použití minimálního média

Kolonie narostlé přes noc na agarové plotně byly smyty 10 ml minimálního média (MM), nebo isotopově obohaceného minimálního média, vždy s kanamycinem (30 mg/l). Na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro* byla změřena OD_{550nm} takto získaného inokula, které bylo následně použito k zaočkování vždy 500 ml MM s kanamycinem (30 mg/l) ve dvoulitrových Erlenmayerových baňkách. Inokulace byla provedena tak, aby výsledná OD_{550nm} byla přibližně 0,05.

3.1.1.3 Vlastní kultivace

Média zaočkována bakteriální kulturou dle kapitoly 3.1.1.1 nebo 3.1.1.2 byla inkubována při 37 °C v rotačním inkubátoru Gallenkamp za točení rychlostí 200 ot./min. Růstová křivka byla sledována každou hodinu měřením OD_{550nm} na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro*. Při

dosažení hodnoty OD_{550nm} přibližně 1,0 byla indukována exprese přidáním 0,5 M ETG tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mM. Biomasa byla izolována po 3 až 5 (dle rychlosti růstu) hodinách od indukce centrifugací (Beckman J 6M, 4 000×g) a uchována při -20 °C k dalšímu zpracování.

Pomocí optického fázově kontrastního mikroskopu Carl Zeiss Jena byla sledována tvorba inklusních tělísek, do kterých byl rekombinantní protein ukládán. Inklusní tělíška byla pozorována jako černé nekontrastní konce buněk.

3.1.2 Kultivace NusA-His₆-(GlyAlaMet)⁻¹-IGF-II

Z každé plotny byly narostlé kolonie smyty 10 ml LB média s kanamycinem (30 mg/l) a na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro* byla změřena OD_{550nm} takto získaného inokula. Inokulum bylo následně použito k zaočkování vždy 500 ml LB média s 0,4% (v/v) glycerolem a kanamycinem (30 mg/ml) ve dvoulitrových Erlenmayerových baňkách tak, aby výsledná OD_{550nm} byla přibližně 0,1.

Média zaočkována bakteriální kulturou byla inkubována při 37 °C v rotačním inkubátoru Gallenkamp za točení rychlostí 200 ot./min. Růstová křivka byla sledována každou hodinu měřením OD_{550nm} na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro*. Při dosažení hodnoty OD_{550nm} přibližně 1,0 byly baňky přendány do rotačního inkubátoru Sanyo temperovaného na 20 °C a po ustálení teploty byla indukována exprese přidáním 0,5 M ETG tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mM. Biomasa byla izolována po 3 až 5 (dle rychlosti růstu) hodinách od indukce centrifugací při 4 000×g (Beckman J-6M) a uchována při -20 °C k dalšímu zpracování.

Pomocí optického fázově kontrastního mikroskopu Carl Zeiss Jena bylo sledováno, zda se protein neukládá do inklusních tělísek.

3.2 SDS-PAGE

3.2.1 Použité roztoky

Dělicí gel

12,5% (w/v) nebo 15% (w/v) nebo 17,5% (w/v) AA a BIS v hmotnostním poměru BIS:AA 1:29; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 1 mM EDTA, 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED; 0,1% APS.

Zaostřovací gel

5% (w/v) AA a BIS v hmotnostním poměru BIS:AA 1:29; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 1 mM EDTA; 0,5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED; 0,1% APS.

Elektrodový pufr

20 mM Tris-HCl pH 8,3; 200 mM glycin; 0,1% (w/v) SDS.

Vzorkový pufr

VP-0 (neredukující): 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) bromfenolová modř.

VP-S (redukující): 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 8,7% (v/v) β -merkptoethanol; 0,2% (w/v) bromfenolová modř.

3.2.2 Roztoky pro barvení stříbrem a sušení gelů

Fixační roztok

12% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) methanol; 0,05% (v/v) formaldehyd.

Roztok thiosíranu sodného

0,8 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Impregnační roztok

12 mM AgNO_3 ; 0,075% (v/v) formaldehyd.

Vyvolávací roztok

570 mM Na_2CO_3 ; 16 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,05% (v/v) formaldehyd.

Zastavovací roztok

12% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) methanol.

Sušící roztok

20% (v/v) ethanol; 3% (v/v) glycerol.

3.2.3 Příprava vzorků z kultivace

Fosfátový pufr

10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM NaH_2PO_4 , pH 7,2; 136 mM NaCl; 2,6 mM KCl.

Před indukcí a na konci kultivace byly odebrány vzorky pro visualizaci pomocí SDS-PAGE. Vzorky byly připraveny z 0,5 ml bakteriální kultury, která byla 5 min centrifugována při 12 000 \times g na centrifuze Eppendorf MiniSpin. Médium bylo slito a sediment dále zpracován. Buněčná peleta vzorku před indukcí byla rozpuštěna ve 30 μl VP-S a krátce sonikována (Soniprep 150 MSE). Peleta vzorku z konce kultivace byla

resuspendována v 0,5 ml fosfátového pufru, sonikována a centrifugována za stejných podmínek. Ze supernatantu byl připraven vzorek smícháním s VP-S v poměru 2:1, sediment byl rozpuštěn ve 30 μ l VP-S.

3.2.4 Příprava ostatních vzorků

Vzorky sedimentů byly připraveny rozpuštěním ve 30 μ l příslušného vzorkového pufru, vzorky kapalné ředěním v poměru 2:1 s příslušným vzorkovým puftrem, vzorky obsahující močovinu o vysoké koncentraci byly ředěny v poměru 1:1.

3.2.5 Postup

Diskontinuální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS (SDS-PAGE) podle Laemmliho [145] byla prováděna v aparatuře Mighty Small II SE250. Do prostoru pro gel byl nalit dělicí gel o požadované koncentraci a převrstvený vodou byl ponechán polymerovat. Poté byla voda slita a vysušena filtračním papírem, byl aplikován hřeben pro tvorbu jamek o požadovaném počtu a nalit zaostřovací 5% (w/v) gel. Gel byl umístěn do elektroforetické vany, do anodového a katodového prostoru byl nalit elektroodový pufr. Do vytvořených jamek byly aplikovány vzorky. Elektrody byly zapojeny ke zdroji napětí Consort EV243. Počáteční napětí bylo nastaveno na 95 V po dobu 20 min, po zaostření vzorků bylo napětí zvýšeno na 175 V po dobu cca 80 min. Tato aparatura poskytuje gely o rozměrech 80×70×0,75 mm.

3.2.6 Barvení stříbrem

Gel vyjmutý z aparatury byl na hodinu uložen do 25 ml fixačního roztoku. Poté byl třikrát omýván 50% methanolem po dobu 10 minut. Následovalo opláchnutí v roztoku thiosíranu sodného po dobu 20 s, po kterém byl gel třikrát omyt destilovanou vodou. Po dvacetiminutové inkubaci v impregnačním roztoku byl gel důkladně omyt destilovanou vodou. Visualizace byla provedena máčením ve vyvolávacím roztoku a ukončena převedením do zastavovacího roztoku. Před usušením byl gel uchován v roztoku 50% (v/v) methanolu při 4 °C.

3.2.7 Sušení gelů

Gely byly skenovány a následně skladovány v usušeném stavu. Před sušením byly gely a sušící celofán máčeny 10 min v sušícím roztoku. Gely byly umístěny mezi dvě celofánové folie, které byly napnuty do sušícího rámečku.

3.3 Proteinový přenos s imunodetekcí

3.3.1 Použité roztoky

Elektrodový pufr

20 mM Tris-HCl pH 8,3; 200 mM glycin; 0,1% (w/v) SDS; 10% (v/v) methanol.

Fosfátový pufr

10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM NaH₂PO₄, pH 7,2; 136 mM NaCl; 2,6 mM KCl.

3.3.2 Postup

Jako další krok ověření přítomnosti proteinu v dané frakci byl proveden elektroforetický přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu (angl. *western blotting*, WB) [146]. Bylo využíváno polosuché uspořádání na aparatuře firmy The W.E.P Company. Gel získaný dle kapitoly 3.2.5 (str. 32), nitrocelulosová membrána Hybond-C Extra a blotovací papíry byly po dobu 5 min ekvilibrovány v elektrodovém pufru. Na 1 cm² membrány byl vložen konstantní elektrický proud o velikosti 1 mA po dobu 1 hod. Účinnost přenosu proteinů z gelu na membránu byla kontrolována reversibilním obarvením membrány 0,1% (w/v) Ponceau S v 5% (v/v) kyselině octové. Barva byla odstraněna omýváním fosfátovým pufrům a povrch membrány byl blokován 1 hod inkubací v 5% (w/v) odtučněném mléku ve fosfátovém pufru za laboratorní teploty (nebo přes noc při 4 °C). Po promytí fosfátovým pufrům byla membrána na dobu 1,5 hod vystavena roztoku protilátky Anti-polyhistidine (konjugované s křenovou peroxidasou) o koncentraci 1,3 µg/ml ve fosfátovém pufru, který obsahoval 0,05% (v/v) Tween a 1% (w/v) BSA. Po promytí fosfátovým pufrům byly proteiny rozpoznané protilátkou vizualizovány přidávkem TMB. Jedná se o chromogenní substrát křenové peroxidasy, se kterou je použita protilátka konjugována. Membrána byla pro evidenční účely skenována.

3.4 Isolace proteinu

3.4.1 Isolace inklusních tělísek

Omývací pufr

50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA.

Postup

Biomasa získaná dle kap. 3.1.1 (str. 29) byla resuspendována v omývacím pufru s 50 µM PMSF tak, aby na 1 g biomasy připadalo 10 ml pufru.

Buněčná suspenze byla třikrát zmrazena a rozmrazena. Poté byl přidán lysozym do výsledné koncentrace 0,5 mg/ml a směs byla 30 min míchána ve vodné lázni o teplotě 37 °C. Ke směsi bylo přidáno takové množství 1% (v/v) DOC, aby výsledná koncentrace byla 0,05 % (v/v), a směs byla po dobu 20 minut míchána v ledové lázni. Následně byla buněčná suspenze 4–6× (dokud byla vazká) sonikována v ledové lázni na sonikátoru Dynatech při výkonu 60 %.

Při zpracování většího množství biomasy byla část popsaná v předchozím odstavci nahrazena rozrušením buněčných stěn na homogenizátoru EmulsiFlex-C3.

Buněčný lysát byl centrifugován při 20 000×g, 4 °C po dobu 20 minut (Beckman Coulter). Supernatant byl slit (CS) a uložen při 4 °C, sediment byl resuspendován v původním objemu omývacího pufru s přidávkem 0,1% Tritonu. Roztok byl 3–5× sonikován v ledové lázni na sonikátoru Sonic Dismembrator při výkonu 60 % po dobu 1–2 minut s přestávkami na 2 minuty. Následovala centrifugace za stejných podmínek. Supernatant byl slit (W1) a uložen při 4 °C a sediment opět resuspendován v původním objemu omývacího pufru. Získaný roztok byl za stejných podmínek sonikován a následně stočen. Supernatant byl slit (W2) a sediment obsahující nerozpustný protein zvážen a uložen do -20 °C k dalšímu zpracování.

Ze všech frakcí byl odebrán vzorek, který byl připraven dle kap. 3.2.4 (str. 32) pro vizualizaci pomocí SDS-PAGE.

3.4.2 Isolace rozpustného proteinu

Lysační pufr

50 mM Tris-HCl pH 8,8; 300 mM NaCl; 10% (v/v) glycerol, 0,05% (v/v) Triton; 50 μM PMSF.

Postup

Biomasa získaná dle kap. 3.1.2 (str. 30) byla resuspendována v lysačním pufru tak, aby na 1 g biomasy připadalo 50 ml pufru. Buněčná suspenze byla důkladně homogenizována a 4–6× sonikována na ledu na sonikátoru Dynatech při 60 % výkonu po dobu 1–2 minut s přestávkami na 2 minuty. Buněčný lysát byl centrifugován při 20 000×g, 4 °C po dobu 40 minut (Beckman Coulter). Získaný supernatant byl dále zpracováván. Ze sedimentu byl připraven vzorek dle kap. 3.2.4 (str. 32) pro vizualizaci SDS-PAGE.

3.5 Purifikace GB1-IGF-II

3.5.1 Použité roztoky

Pro postup popsany v kapitolách 3.5.2 až 3.5.5 (str. 36) byly používány následující roztoky pufrů.

Pufr A

50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl.

Pufr B

50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 0,5 M imidazol.

3.5.2 Denaturace inklusních tělísek

Inklusní tělíška získaná dle kap. 3.4.1 (str. 33) byla resuspendována v minimálním množství pufru A s takovým množstvím 10% (v/v) β -merkaptoethanolu, aby jeho výsledná koncentrace po naředění do močoviny byla 0,02% (v/v). Tato suspenze byla sonikována (Sonic Dismembrator), následně pomalu přikapána do příslušného množství 8 M močoviny v pufru A a takto byla ponechána přibližně tři hodiny za laboratorní teploty při šetrném míchání. Na 1 g izolovaných inklusí bylo použito 50 ml roztoku močoviny.

3.5.3 Chelatační afinitní chromatografie

Denaturovaná inklusní tělíška byla dále zpracována s využitím niklové afinitní chromatografie. Vzorek připravený dle kap. 3.5.2 byl 20 min centrifugován při laboratorní teplotě, 20 000 \times g na centrifuze Beckman Coulter. Na kolonu HisTrap HP o objemu 5 ml, která byla předem ekvilibrována do pufru A s 8 M močovinou, byl za pomoci stavebnicového čerpadla nanesen roztok denaturovaných inklusních tělísek. Následovalo promytí 5–10 objemy kolony (CV, z angl. *column volume*) puftrem A s 8 M močovinou (W1) a samotným puftrem A (W2). Při vymytí močoviny z kolony došlo k přesunu na aparaturu Äkta FPLC, kde bylo nejprve pokračováno v promývání puftrem A za současného sledování stabilizace absorbance. Poté byl vázaný protein eluován imidazolovým gradientem mísením pufru A a B podle následujícího schématu:

imidazol [mM]	pufr B [%]	objem [CV]
0–200	0–40	10
200–500	40–100	3
500	100	3
500–0	100–0	2

Frakce byly jímány automatickým sběračem po objemu kolony při průtoku 1,5 ml/min a maximálním tlaku 0,3 MPa. Průběh eluce byl sledován spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm a vybrané frakce byly dále vizualizovány pomocí SDS-PAGE. Pro rozlišení monomerních a multimerních forem proteinu byly dle kap. 3.2.4 (str. 32) připraveny vzorky za použití VP-0 a VP-S.

Vybrané frakce byly zbaveny imidazolu dialýzou proti pufru A. Dialýza byla prováděna v dialyzačních celulosových membránách s mezní velikostí pórů 10 kDa při 4 °C. Dialyzát byl několikrát vyměněn.

3.5.4 Proteolytické štěpení fúzního partnera

Dialyzované frakce získané dle kap. 3.5.3 (str. 35) byly pro odstranění případných agregátů a vysrážených proteinů centrifugovány (20 min, 4 °C, 20 000×g, Beckman Coulter).

K získanému proteinovému roztoku byl přidán zásobní roztok glutathionu oxidovaného (o koncentraci 30 mM) a redukovaného (o koncentraci 300 mM) tak, aby výsledná koncentrace byla 1,5 mM pro oxidovaný glutathion a 0,15 mM pro redukovaný glutathion. Poté bylo přidáno takové množství TEV proteasy, aby byla k substrátu v poměru 1:50. Roztok byl ponechán do druhého dne za laboratorní teploty. Zda byl fúzní protein odštěpen, bylo vizualizováno pomocí SDS-PAGE.

3.5.5 Samospádová afinitní chromatografie

Produkt proteolytického štěpení byl oddělen pomocí samospádové chelatační chromatografie na koloně s náplní HIS-Select Nickel Affinity Gel. Kolona byla předem ekvilibrována pufrům A. Vzorek získaný dle kap. 3.5.4 byl nejprve zfiltrován (0,22 µm), pokud však šlo o menší objem byl 20 minut centrifugován (4 °C, 20 000×g, Beckman Coulter), aby se zamezilo ztrátám na filtru. Takto opatřený vzorek byl nanášen na kolonu. Kýžený produkt obsahovala proteklá frakce (FT), která byla jímána na led. Poté byla kolona promyta 5 CV pufru A (W). Zachycené proteiny byly eluovány pufrům B do frakce o objemu 5 CV (E). Z každé frakce byl připraven vzorek dle kap. 3.2.4 (str. 32) za použití VP-0 a VP-S pro sledování monomerních a multimerních forem pomocí SDS-PAGE.

3.6 Purifikace NusA-IGF-II

3.6.1 Chelatační afinitní chromatografie

3.6.1.1 Používané roztoky

Omývací pufr-1

50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 10% (v/v) glycerol.

Omývací pufr-2

50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl.

Eluční pufr

50 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl; 500 mM imidazol.

3.6.1.2 Postup

Supernatant získaný dle kap. 3.1.2 (str. 30) byl přefiltrován (0,8 μ m) a dále purifikován na koloně HisTrap HP o objemu 5 ml za pomoci aparatury Äkta FPLC. Vzorek byl nanášen na předem ekvilibrovanou kolonu a proteklá frakce (FT) byla zachytávána. Kolona byla promyta 5–10 CV omývacího pufru-1 (W1) a nespecificky vázané proteiny byly odmyty omývacím pufr-2 (W2), který obsahuje 5 mM imidazol, tedy odpovídá 1% elučního pufru. Pro vymytí vázaného proteinu byl nastaven segmentový gradient mísení omývacího pufru-2 a pufru elučního podle následujícího schématu:

imidazol [mM]	eluční pufr [%]	objem [CV]
5–200	1–40	10
200–500	40–100	3
500	100	3
500–0	100–0	2

Frakce byly jímány automatickým sběračem po objemu kolony při průtoku 1,5 ml/min a maximální tlaku 0,3 MPa. Průběh eluce byl sledován spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm a vybrané frakce byly vizualizovány pomocí SDS-PAGE. Pro rozlišení monomerních a multimerních forem proteinu byly připraveny vzorky dle kap. 3.2.4 (str. 32) za použití VP-0 a VP-S.

Vybrané frakce byly zbaveny imidazolu za současného převedení do pufru vhodného pro gelovou permeační chromatografii (20 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl; 1 M močovina) dialýzou proti tomuto pufru.

3.6.2 Proteolytické štěpení fúzního partnera

Dialyzované frakce získané dle kap. 3.6.1.2 (str. 37) byly pro odstranění případných agregátů 20 minut centrifugovány při 20 000×g, 4 °C (Beckman Coulter). K proteinovému roztoku bylo přidáno takové množství TEV proteasy, aby byla k substrátu v poměru 1:50. Roztok byl ponechán do druhého dne za laboratorní teploty. Zda byl fúzní protein odštěpen, bylo vizualizováno pomocí SDS-PAGE.

3.6.3 Ultrafiltrace

Před nanesením na kolonu pro gelovou permeační chromatografii byl vzorek obsahující odštěpený produkt (dle kapitoly 3.6.2) koncentrován pomocí odstředivého filtračního zařízení Amicon Ultra 4 ml s membránou o mezní velikosti pórů 3 000 Da. Zvyšování koncentrace proteinového roztoku bylo prováděno centrifugováním při 7 000×g a 4 °C na centrifuze Hermle Z 323 K. Zvýšení koncentrace bylo sledováno spektrofotometricky pomocí NanoDropu ND-1000.

3.6.4 Gelová permeační chromatografie

Nejprve byla kolona kalibrována, pro zjištění přibližného retenčního času odpovídajícímu proteinu o velikosti 7,4 kDa. Jako mobilní fáze byl použit stejný pufr, ve kterém bylo následně prováděno samotné dělení produktu štěpení, tedy 20 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl; 1 M močovina; přefiltrovaný a odvzdušněný. Na kolonu byl nanesen vzorek molekulových standardů pro gelovou chromatografii obsahující dextran blue (200 kDa), hovězí sérový albumin (66 kDa), karbonyčnou anhydrazu (29 kDa), cytochrom C (12,4 kDa) a aprotin (6,5 kDa).

Pro oddělení produktu od zbytku nepoštípaného proteinu a fúzního partnera byla provedena gelová permeační chromatografie na koloně vhodné k dělení proteinů o velikosti v rozmezí 3–70 kDa, Superdex 75 10/300 GL Tricorn. Kolona byla zapojena do FPLC aparatury Äkta Basic. Mobilní fází byl přefiltrovaný a odvzdušněný pufr o složení 20 mM Tris-HCl pH 7,0; 150 mM NaCl; 1 M močovina. Dělení proteinů vzorku získaného dle kapitoly 3.6.3 bylo prováděno za průtoku 0,8 ml/min při maximálním tlaku 1,5 MPa. Eluční profil byl sledován spektrofotometricky při vlnových délkách 254 a 280 nm. Vybrané ručně sbírané frakce byly vizualizovány pomocí SDS-PAGE.

3.7 Odsolení

Příslušné frakce obsahující produkt získané dle kap. 3.5.5 (str. 36) nebo 3.6.4 (str. 38) byly před dalším purifikačním krokem na HPLC odsoleny na koloně Chromabond C₄. Kolona byla nejprve promyta vodou a následně aktivována 100% (v/v) ACN. Před nanesením vzorku byla důkladně promyta demineralizovanou vodou s 0,1% (v/v) TFA. Frakce proteklá (FT) při nanášení vzorku byla na kolonu nanášena ještě jednou. Poté byla kolona promyta 5–10 ml 0,1% (v/v) TFA (W). Eluce byla provedena 5–10 ml 80% (v/v) ACN s 0,1% (v/v) TFA ve dvou frakcích (E1, E2). Následovalo promytí 100% (v/v) ACN (E3).

3.8 Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) byla prováděna za využití přístrojů společnosti Watrex (čerpadlo Watrex 600, UV/VIS detektor Waters 2487) v laboratoři Biochemie a molekulární biologie skupiny Dr. Jiřího Jiráčka ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Zpracování dat bylo provedeno chromatografickým programem Clarity Lite od společnosti Data Apex.

3.8.1 Analytické stanovení

K potvrzení přítomnosti produktu v eluované frakci po odsolení získané dle kapitoly 3.7 byla provedena analytická RP-HPLC na koloně 214TP54-C4 o rozměrech 25×4,6 mm společnosti Vydac. Byly analysovány frakce W, E1, E2 a E3. Gradientová eluce byla prováděna při průtoku 1 ml/min, mobilní fáze byla tvořena mísením A: 0,1% (v/v) TFA a B: 80% (v/v) ACN; 0,1% (v/v) TFA. Byl sestaven 45 minutový gradient podle následujícího schématu. Detekce probíhala sledováním absorbance při 218 a 276 nm.

min	0	30	31	32	33
% B (v/v)	25	55	100	100	25

Frakce obsahující žádaný produkt byla lyofilizována a dále přečištěna semipreparativní RP-HPLC.

3.8.2 Preparativní uspořádání

Za účelem oddělení různě sbalených forem produktu byla provedena semipreparativní RP-HPLC. Produkt získaný dle kapitoly 3.7 byl rozpuštěn v 6,67% (v/v) kyselině octové s 26,67% ACN a 0,03% TFA a následně nanesen na semipreparativní kolonu 214TP510-C4 společnosti Vydac o rozměrech 250×10 mm. Gradientová eluce byla prováděna průtokem

4 ml/min pomocí mísení mobilní fáze A: 0,1% (v/v) TFA a B: 80% (v/v) ACN; 0,1% (v/v) TFA podle následujícího schématu. Detekce byla prováděna měřením absorbance při 218 a 276 nm.

min	0	33	35	36	37
% B (v/v)	25	55	100	100	25

Jednotlivé frakce byly ručně jímány a lyofilizovány pro další použití.

3.9 Hmotnostní spektrometrie

Ověření přítomnosti správného proteinu získaného dle kapitoly 3.8.2 (str. 39) bylo mimo jiné provedeno identifikací v Laboratoři Hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR, v.v.i., na přístroji LTQ Orbitrap XL společnosti Thermo Fisher Scientific (Německo). Měřicí metodou byla ionizace pomocí elektrospreje (ESI, z angl. *electrospray ionization*) v pozitivním módu.

3.10 Cirkulární dichroismus

Spektra elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) byla měřena na pracovišti Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha na spektrometru J-810 Jasco (Japonsko). Vzorky získané dle kapitoly 3.8.2 (str. 39) byly rozpuštěny v 5% (v/v) roztoku kyseliny octové na výslednou koncentraci 0,33 mg/ml. Rychlost skenování byla nastavena na 10 nm/min, responze 8 s, šířka štěrbiny 1 nm, citlivost standardní, tj. 100 mdeg, rozlišení 1 nm, 5 akumulací, spektrální rozsah 200–300 nm. K proplachování přístroje byl použit tlakový dusík o průtoku 7 litrů za minutu. Všechna měření byla prováděna v křemenné kyvetě o tloušťce měřené vrstvy 0,5 mm (Helma, Německo). Měření bylo prováděno za stálé teploty 25 °C. Současně se spektry ECD byla ve stejném spektrálním rozsahu měřena i absorpční spektra v UV oblasti. Pro korekci základní linie bylo použito spektrum rozpouštědla vzorků. Spektrum bylo odečteno od naměřeného spektra ECD i od absorpčního spektra peptidu. Spektra ECD jsou uváděna jako závislost molární elipticity v $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}\cdot\text{res}^{-1}$ na vlnové délce v nanometrech a před dalším zpracováním nebyla vyhlazována.

3.11 Vazebné testy

Po přečištění proteinu dle kapitoly 3.8.2 (str. 39) byly provedeny testy vazeb na insulinové receptory. Proteiny byly rozpuštěny v 0,1% (v/v) kyselině octové a měřením absorbance při 280 nm byla určena přesná koncentrace. Měření vazebných aktivit bylo prováděno v laboratoři Biochemie a molekulární biologie skupiny Dr. Jiřího Jiráčka ÚOCHB AV ČR,

v.v.i., ve spolupráci s Květoslavou Křížkovou. Podrobný optimalizovaný postup je popsán v její diplomové práci [147].

Pro účely vazebných testů na IR-A *in vitro* byla použita buněčná linie lidských lymfocytů IM-9 s vysokou mírou exprese insulinových receptorů typu A. Buněčná linie byla pěstována dle pokynů dodavatele ATCC (Manassas, USA; LGC Standards, Poland). Vypěstované buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce a ředěny na koncentraci 2 milióny na mililitr. K vazebným testům na IGF-1R byly použity buněčné linie myších embryonálních fibroblastů s deletovaným genem pro myší IGF-1R poskytnuté Dr. A Belfiorem a R. Basergou, podle jejichž pokynů byly pěstovány. Tyto buňky byly trasfekovány lidským genem pro expresi IGF-1R. Dva (nebo tři) dny před testováním byly buňky nasazeny do destiček o 24 jamkách v koncentraci 3000 (nebo 1500) buněk na jamku.

Testování vazebné afinity je založeno na kompetitivním vytěsnění radioaktivně značeného insulinu (^{125}I , $\tau = 60$ dní) nebo IGF-I metodou dle De Meytse, resp. Belfioreho [101, 148]. Měřené analogy byly rozpuštěny v 0,1% (v/v) kyselině octové na koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Vzorky byly připraveny vždy s rostoucí koncentrací (v řádech 10^{-11} až 10^{-5} M) testovaného proteinu při konstantním množství buněk a radioaktivně značeného insulinu nebo IGF-I. Radioaktivita byla měřena na γ -počítači (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, USA).

Vyhodnocení dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism 5.0 podle modelu vazby do jednoho vazebného místa metodou nelineární regrese za současného zohlednění deplece ligandu. Během testování byla použita 0,01 nM koncentrace ^{125}I -insulinu, jehož disociační konstanta K_d byla předešlým testováním v laboratoři stanovena 0,03 nM. Při testech vazeb na IGF-1R byl použit ^{125}I -IGF-I o koncentraci 0,039 nM s disociační konstantou o hodnotě 0,2 nM.

3.12 Nukleární magnetická resonance

Data byla sbírána na spektrometru Bruker Avance II s pracovní ^1H frekvencí 600 MHz vybaveném tříjadernou kryosondou při teplotě 298 K. Vzorek proteinu byl umístěn do kyvety typu Shigemi o průměru 5 mm.

Pro definici biofyzikálních vlastností připraveného Gly $^{-1}$ -IGF-II byl tento vzorek získaný dle kapitoly kapitoly 3.8.2 (str. 39) rozpuštěn v 50 mM d_4 -octové kyselině (pH 3,0) s přidavkem 5 % (v/v) D_2O a 0,01% (w/v) NaN_3 na výslednou koncentraci 200 μM . Byla nasnímána data pro jednodimenzionální vodíkové spektrum (s potlačením vody) a sada

dvoudimenzionálních experimentů TOCSY (z angl. *total correlation spectroscopy*, zobrazuje spojení vodíků po chemických vazbách) a NOESY (z angl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*, dává informaci o vzdálenostech mezi vodíky v prostoru). Souhrn parametrů nastavených pro snímání dat je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Parametry snímání dat nukleární magnetické resonance

	NOESY		TOCSY		¹ H/ ¹⁵ N-HSQC		¹ H/ ¹³ C-HSQC		DOSY	
	F ₂	F ₁	F ₂	F ₁	F ₂	F ₁	F ₂	F ₁	F ₂	F ₁ *
počet bodů	2048	600	3072	600	2048	256	1716	216	28844	16
spektrální šířka [ppm]	12	12	12	12	14	28	12	80	12	
střed spektra [ppm]	4.75	4.75	4.75	4.75	4.79	115	4.73	40	4.71	
akviziční čas [ms]	142	41,6	142	41,6	122	75	119	9	2000	
počet akumulací	128		64		8		8		32	
relaxační prodleva [s]	1,5		1,5		1,3		1,3		1,5	
směšovací čas [ms]	200		60							
celkový čas experimentu	10 hod		6 hod		50 min		40 min			
efektivní akviziční čas	56 ms		56 ms		36 ms		36 ms			

* *pseudo dvoudimenzionální experiment*

Dále byly provedeny experimenty ¹³C/¹H HSQC (z angl. *heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy*), ve kterých korelují resonance uhlíků s vodíky na nich přímo vázaných a ¹⁵N/¹H HSQC pro zobrazení korelací amidických vodíků s dusíky. Pro tyto experimenty byl použit protein získaný dle kapitoly 3.8.2 (str. 39) za současného využití isotopově obohaceného média při kultivaci (dle kapitoly 3.1.1.2, str. 29). Isotopově obohacený protein byl také použit pro získání spekter nukleární magnetické resonance za účelem definice dynamického stavu molekuly. Pro tato měření byl protein rozpuštěn v 50 mM d₄-octové kyselině (pH 3,0), 5% (v/v) D₂O a 0,01% (w/v) NaN₃ na koncentraci 185 μM. Ke stanovení rotačního korelačního času molekuly byla měřena sada dvoudimenzionálních ¹⁵N/¹H korelačních experimentů upravených pro stanovení ¹⁵N relaxačních dob T₁ (HSQC zahrnující tzv. *inversion recovery* blok) a T₂ (HSQC zahrnující Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) relaxační sekvenci). Pro učení longitudinálního relaxačního času (T₁) byla snímána data s *inversion recovery* prodlevami (t₁): 0,01 s; 0,02 s; 0,05 s; 0,10 s; 0,20 s; 0,40 s; 0,60 s; 0,90 s; 1,20 s; 1,70 s a 2,50 s. Pro stanovení transverzálního relaxačního času (T₂) pak s CPMG prodlevami (t₂): 0,016 s; 0,031 s; 0,046 s; 0,061 s; 0,077 s; 0,092 s; 0,107 s; 0,14 s;

0,17 s; 0,22 s; 0,28 s; 0,36 s a 0,48 s. Dalšími experimenty byla sada difuzních měření (DOSY, z angl. *diffusion-ordered spectroscopy*) k určení translačního difuzního koeficientu. Pro tyto účely byla naměřena data na vzorku o koncentraci 185 μM rozpuštěném v 50 mM d_4 -octové kyselině (pH 3,0) ředěné D_2O s 0,01% (w/v) NaN_3 nebo v 5% d_4 -octové kyselině (odpovídá 835 mM, pH 2,5) ředěné D_2O s 0,01% (w/v) NaN_3 . Prostředí D_2O bylo zvoleno z důvodu nutnosti úplného potlačení signálu vody ve vzorku, kterého nelze efektivně dosáhnout v DOSY experimentech v prostředí H_2O . Souhrnné parametry relaxačních i difuzních měření jsou uvedeny v Tabulce 1 (str. 42).

Získaná data byla zpracována v programu TopSpin 3.2. Při vyhodnocování dat z relaxačních experimentů byly odečteny výšky příslušných píků, které byly dále zpracovány v programu OriginPro 8. Hodnoty výšek jednotlivých píků byly exponenciálně prokládány rovnicí

$$h = A \cdot e^{-\frac{t}{T}} + h_0, \quad (1)$$

kde h je hodnota výšky píku, t reprezentuje relaxační prodlevu t_1 nebo t_2 , T je relaxační čas T_1 , resp. T_2 , A je předexponenciální faktor, h_0 je lineární konstanta. Získané hodnoty T_1 a T_2 recipročně odpovídají rychlostem relaxace R_1 a R_2 , z jejichž poměru byl na základě rovnic (2) a (3) [149] vypočítán rotační korelační čas τ_c pro každé vybrané residuum.

$$R_1 = d^2[J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + c^2J(\omega_N) \quad (2)$$

$$R_2 = \frac{1}{2}d^2[4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + \frac{1}{6}c^2[3J(\omega_N) + 4J(0)] \quad (3)$$

V rovnicích (2) a (3) platí následující závislosti

$$c^2 = \frac{2}{15}\gamma_N^2 B_0^2 \Delta\sigma^2 \quad d^2 = \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_H^2 \gamma_N^2 \hbar^2}{r^6}$$

$$\omega = -\gamma B_0 \quad (\text{Larmorova frekvence}) \quad J_\omega = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (\text{funkce spektrální hustoty})$$

do kterých byly dosazeny konstanty pro gyromagnetické poměry jader N a H ($\gamma_N = -2,71261804 \cdot 10^7 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, $\gamma_H = 2,675197 \cdot 10^8 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$), Diracova konstanta ($\hbar = 1,054592 \cdot 10^{-34}$), indukce magnetického pole ($B_0 = 14,1 \text{ T}$), permeabilita vakua ($\frac{\mu_0}{4\pi} = 10^{-7}$), délka N-H vazby ($r = 1,02 \cdot 10^{-10} \text{ m}$) a anisotropie chemického posunu jader ^{15}N ($\Delta\sigma = 160 \cdot 10^{-6}$).

Na základě závislosti (4) pro rotační korelační čas a Debey-Stokes-Einsteinovy rovnice (5) byl ze získaných hodnot vypočten hydrodynamický poloměr (6).

$$\tau_c = \frac{1}{6D_r} \quad (4)$$

$$D_r = \frac{k_B T}{8\pi\eta R_h^3} \quad (5)$$

$$R_h = \sqrt[3]{3\tau_c k_B T / 4\pi\eta} \quad (6)$$

V uvedených rovnicích je k_B Boltzmanova konstanta, T je absolutní teplota a η viskozita rozpouštědla.

Translační difuzní koeficient byl vyhodnocen na základě prokládání ploch vybraných skupin signálů dle rovnice

$$I = I_0 e^{-\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D_t} . \quad (7)$$

Závislost translačního difuzního koeficientu na viskozitě a hydrodynamickém poloměru je dána Stokes-Einsteinovou rovnicí

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} . \quad (8)$$

Experimentální hodnota translačního difuzního koeficientu byla lineárně korigována na základě porovnání experimentální a tabelované hodnoty translačního difuzního koeficientu referenční molekuly dioxanu podle Yao et al [150].

4 Výsledky

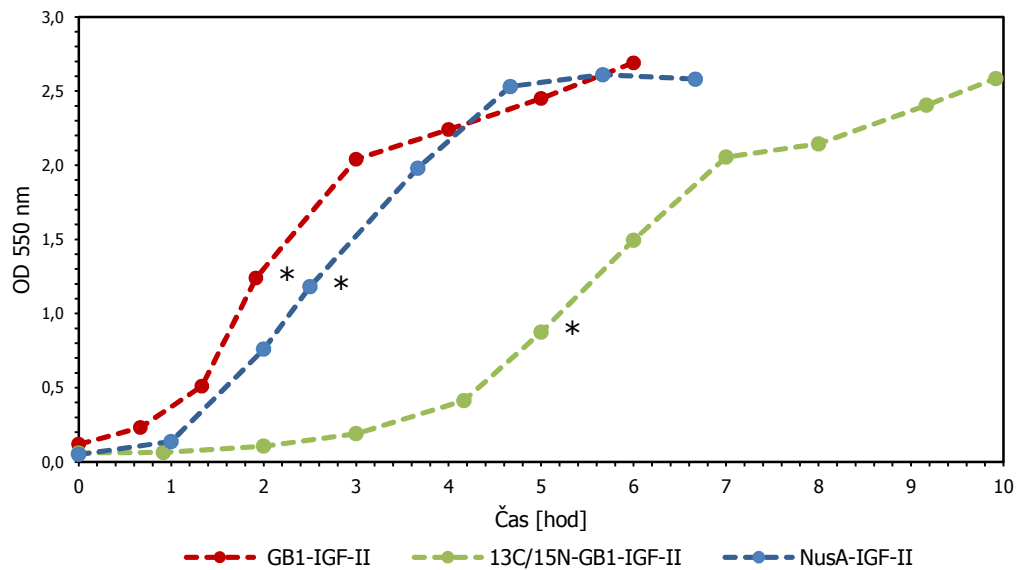
4.1 Příprava IGF-II

4.1.1 Exprese

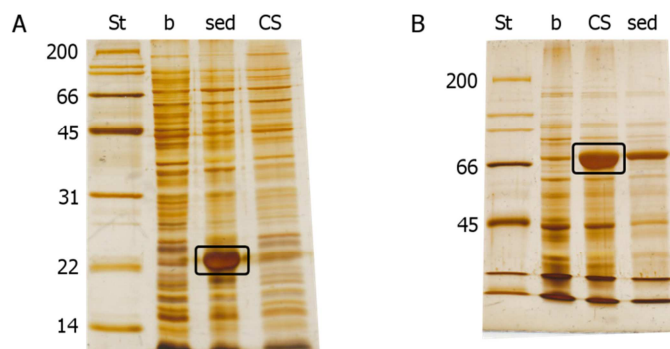
Rekombinantní IGF-II a jeho analogy byly připravovány za využití heterologního expresního systému *Escherichia coli* kmenu BL21 (DE3). Příslušné proteiny byly exprimovány z mnohokopiového expresního plasmidu, který obsahuje daný gen pod kontrolou promotoru z fága T7. Hostitelský kmen *E. coli* obsahuje transdukcí derivátem fága λ vnesený gen pro T7 RNA-polymerasu. Výhody této polymerasy jsou jednak specifické rozeznávání T7 promotoru, ale také až pětikrát vyšší rychlost syntézy RNA, než jaké dosahuje polymerasa *E. coli* [151]. Během transkripce je gen pro T7 RNA-polymerasu v genomu *E. coli* BL21 (DE3) kontrolován promotorem *lacUV5*. K expresi dochází po indukci laktosou, IPTG (nebo jeho analogem ETG), do té doby je gen pro T7 RNA-polymerasu reprimován produktem genu *lacI*. Ten je kromě bakteriálního genomu přítomen i jako součást plasmidů pET série ve své účinnější mutované formě *lacI^q*. Umístěním genu rekombinantního proteinu za T7 promotor tedy snadno kontrolujeme jeho expresi. Díky tomuto systému je hladina T7 RNA-polymerasy v hostitelských bakteriích před samotou indukcí exprese kýženého rekombinantního proteinu nízká, což umožňuje efektivní nárůst buněčné kultury, a tedy vysokou výtěžnost produktu.

Optimalizovaný protokol pro expresi IGF-II ve fúzi s proteiny GB1 a NusA je popsán v kapitolách 3.1.1 (str. 29) a 3.1.2 (str. 30). Reprezentativní růstové křivky průběhu kultivací jsou znázorněny na Obrázku 9 (str. 46). Indukce exprese byla provedena v exponenciální fázi přidavkem ETG (analog IPTG). Výtěžek vlhké biomasy při kultivaci His₆-GB1-Gly⁻¹-IGF-II na 1 L kultivačního média se pohyboval v rozmezí 4–6 g a podíl inklusních tělísek byl od 15 do 20 % hmotnosti této biomasy. Tvorba inklusí byla potvrzena pozorováním černých kontrastních konců buněk fázově kontrastním mikroskopem. Sledovány byly vzorky z různých fází kultivace, přičemž inklusní tělíska byla přítomna hlavně ke konci růstové křivky. Tvorba nerozpustného proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Z tohoto gelu (Obrázek 10, str. 46) je zřejmé, že protein nebyl tvořen před indukcí a na konci kultivace byl přítomen v nerozpustné frakci. Vzorky byly připraveny podle kapitoly 3.2.3 (str. 31). Výtěžek vlhké biomasy při kultivaci NusA-His₆-(GlyAlaMet)⁻¹-IGF-II na 1 L kultivačního média se pohyboval v rozmezí 3–4 g. Produkce rozpustného proteinu byla potvrzena analýsou vzorků

z průběhu kultivace pomocí SDS-PAGE. Na Obrázku 10 je vidět, že protein nebyl produkován před indukcí a při konci kultivace byl v rozpustné formě.



Obrázek 9: Růstové křivky bakterií *E. coli* BL21 (DE3) při expresi IGF-II. Červená křivka znázorňuje průběh kultivace His₆-GB1-Gly⁻¹-IGF-II v LB médiu; zelená v isotopově obohaceném minimálním médiu. Modrá křivka reprezentuje nárůst kultury při produkci NusA-His₆-(GlyAlaMet)⁻¹-IGF-II za použití LB média. Indukce exprese je vyznačena hvězdičkou.



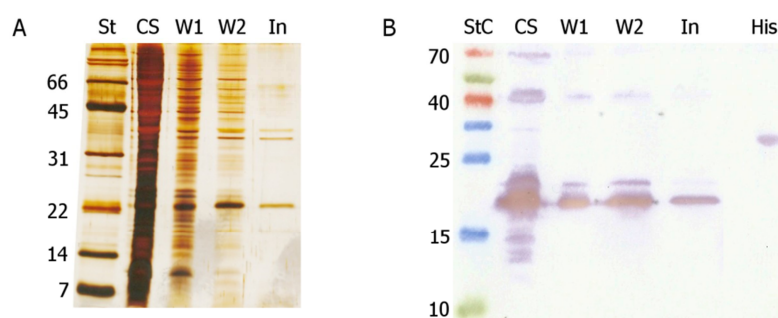
Obrázek 10: Detekce přítomnosti produkovaného IGF-II při kultivaci v bakteriích *E. coli* BL21 (DE3) **A:** 15% SDS-PAGE; Expresse His₆-GB1-Gly⁻¹-IGF-II. St – standard molekulových hmotností Broad range [kDa], b – bakterie před indukcí, sed – nerozpustná frakce z konce kultivace obsahující exprimovaný protein (o velikosti přibližně 20 kDa, v rámečku), CS – rozpustná frakce z konce kultivace. **B:** 10% SDS-PAGE; Expresse NusA-His₆-(GlyAlaMet)⁻¹-IGF-II. St – standard molekulových hmotností Broad range [kDa], b – bakterie před indukcí, CS – rozpustná frakce na konci kultivace obsahující exprimovaný protein (o velikosti přibližně 66 kDa, v rámečku), sed – nerozpustná frakce na konci kultivace.

Jak již bylo popsáno, při rekombinantní produkci insulinu a IGF v expresních systémech *E. coli* dochází k ukládání proteinu ve formě inklusních tělísek [152–154]. Jak si buňky s proteinem poradí, závisí na několika faktorech. Jsou jimi například teplota kultivace, obsah cysteinů tvořících disulfidické můstky nebo koncentrace induktoru [155, 156]. Tvorba inklusí ale nemusí být na škodu a naopak se z této skutečnosti dá těžit. Výhodou je, že protein je izolovaný od cytoplasmatických proteas a nehrozí tedy jeho degradace v průběhu pěstování buněčných kultur. Další pozitivum je získání poměrně čistého proteinu, který se ovšem musí podrobit renaturačnímu protokolu, aby protein dosáhl správného sbalení. Kombinace těchto kroků má za následek, že získání proteinu touto cestou je časově poněkud náročnější.

Isolace nerozpustného proteinu (IGF-II ve fúzi s GB1) podle kapitoly 3.4.1 (str. 33) je založena na opakované centrifugaci postupně vedoucí k získání proteinového sedimentu. Prvním krokem je rozrušení buněčných membrán pomocí sonikace v přítomnosti detergentního činidla. K usnadnění procesu je buněčná suspenze inkubována s lysosymem, který pomáhá degradovat buněčné stěny *E. coli*. Při práci s většími objemy je výhodnější buněčné stěny rozbít pomocí vysokotlakého homogenizátoru.

Obrázek 11 (str. 48) analyticky znázorňuje jednotlivé kroky izolace nerozpustného proteinu pomocí SDS-PAGE (A) a WB (B). Na této vizualizaci je vidět, že část proteinu (o molekulové hmotnosti přibližně 20 kDa) je obsažena i v oplachových frakcích (W1 a W2). Avšak při dalším zpracování tyto frakce neposkytovaly významné množství proteinu a nebyly tedy v dalších experimentech používány. Pro následující zpracování byl použit konečný sediment, který obsahoval téměř čistá inklusní tělíčka (In). Fotografie nitrocelulosové membrány po WB prokazuje, že protein o velikosti 20 kDa obsahuje polyhistidinovou kotvu. Imunodetekce byla provedena specifickou protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou.

Studie z posledních let z oblasti práce s IGF-II [34, 157] se při produkci proteinu opírají o poznatky fúze s proteinem NusA [158]. Tento bakteriální protein je přirozeně rozpustný a byl proto úspěšně určen jako dobrý fúzní partner [159]. Isolace rozpustného proteinu (IGF-II ve fúzi s NusA) z buněčné biomasy získané dle kapitoly 3.1.2 (str. 30) byla provedena sonikací. Postup je popsán v kapitole 3.4.2 (str. 34). Používaný pufr obsahuje detergent, který pomáhá desintegrovat buněčné membrány, a glycerol přispívající ke stabilitě rozpustného proteinu. Přítomnost proteinu v solubilní formě (CS) potvrdila analýza pomocí SDS-PAGE, která je znázorněna na Obrázku 13 (str. 50). Část proteinu byla přítomna i ve frakci nerozpustné (sed).



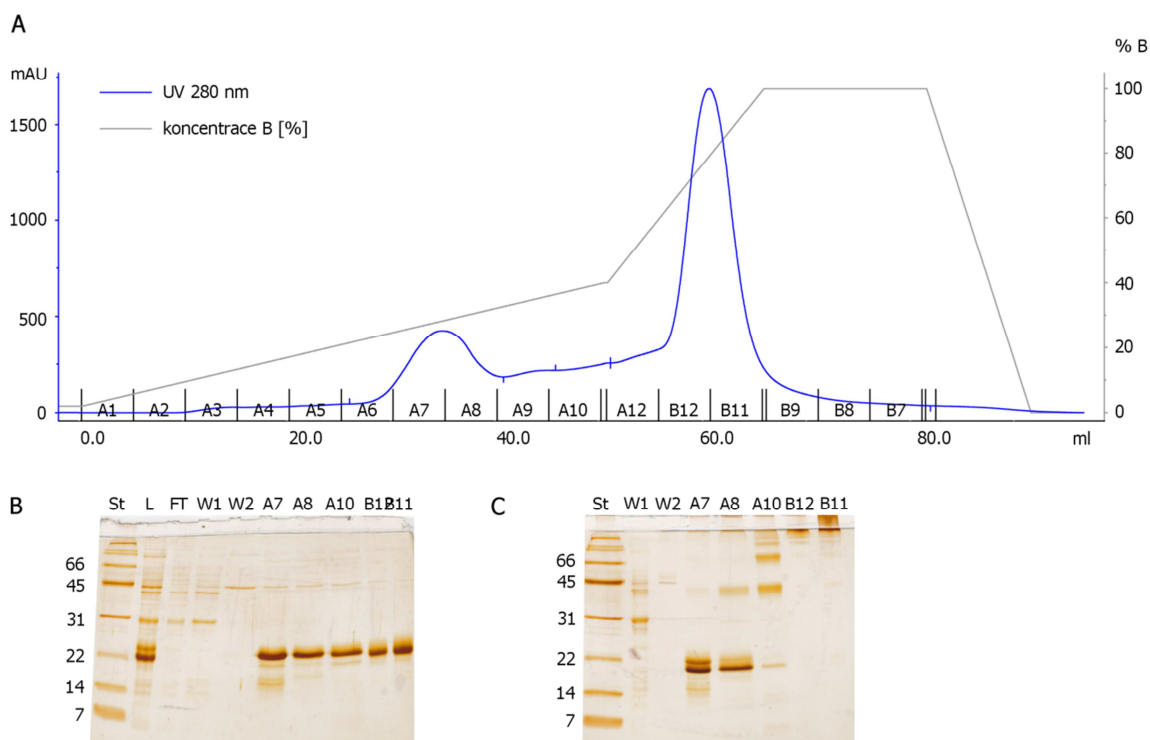
Obrázek 11: Isolace nerozpustného proteinu ($\text{His}_6\text{-GB1-Gly}^{-1}\text{-IGF-II}$) z cytoplasmy *E. coli* BL21 (DE3). St – standard molekulových hmotností Broad range [kDa], StC – standard molekulových hmotností Spectra multicolor [kDa], CS – buněčný supernatant, W1 – první omytí, W2 – druhé omytí, In – inkluze, His – pozitivní standard proteinu s histidinovou kotvou (30 kDa). **A: 15% SDS-PAGE za redukujících podmínek. **B:** WB proteinový přenos s imunodetekcí.**

4.1.2 Purifikace

Podle doporučených postupů výrobce afinitní kolony [160] a na základě zkušeností ve školící laboratoři byl navržen protokol proteinové renaturace pro práci s nerozpustným proteinem (IGF-II ve fúzi s GB1). Při tomto postupu je protein nejprve denaturován za využití chaotropních vlastností vysoce koncentrované močoviny. Přídavek redukčního činidla, jakým je β -merkaptoethanol, v tomto kroku zároveň rozvolňuje disulfidické můstky. Takto ošetřena inkusní tělíska jsou nanášena na kolonu, kde komplexované ionty niklu v agarosovém nosiči zachytí histidinovou kotvu proteinu. V tomto okamžiku je protein stále v denaturačních podmínkách a nemá definovanou strukturu. Ke sbalení proteinu dojde v momentě, kdy vymyjeme chaotropní činidla a převedeme protein do pufru o správném pH. Nyní již může následovat eluce, pro kterou využíváme vytěšňovacích vlastností látky podobné histidinu, imidazolu. Při vhodně nastaveném gradientu tato metoda umožňuje oddělení proteinu v různých formách, jakými jsou třeba agregované stavy.

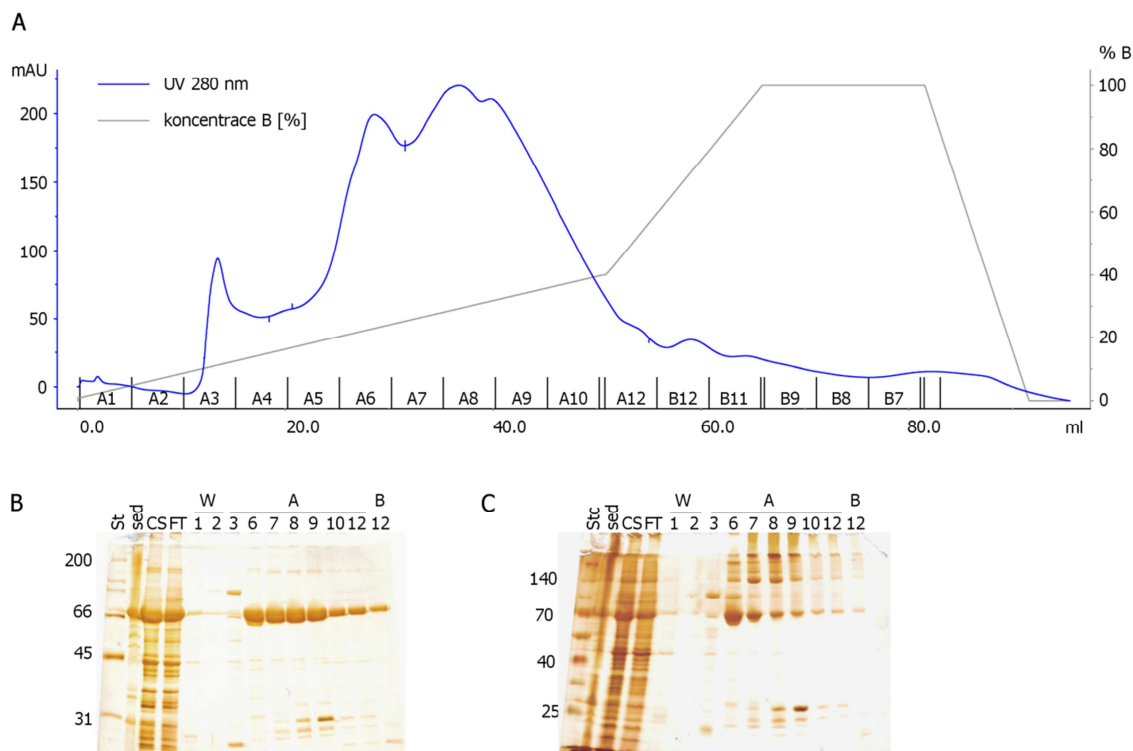
Inklusní tělíska získaná dle kapitoly 3.4.1 (str. 33) byla nanášena na kolonu HisTrap HP (5 ml) po 2–3 hodinové inkubaci v pufru s 8 M močovinou a 0,02% (v/v) β -merkaptoethanolem. Eluce byla prováděna segmentovým gradientem na aparatuře Äkta FPLC za spektrofotometrické detekce při vlnové délce 280 nm, kde absorbují aromatické aminokyseliny. Reprezentativní chromatografický záznam je znázorněn na Obrázku 12 (str. 49), stejně tak vizualizace pomocí SDS-PAGE v redukujícím i neredukujícím prostředí. Z těchto ilustrací je zřejmé, že se protein z kolony uvolňuje jak ve formě monomeru (frakce A7 a A8), tak ve směsi multimerních stavů (frakce B12 a B11). Pro další zpracování byly

spojeny frakce příslušných forem, ale byly ponechány izolovaně. Před proteolytickým oddělením fúzního partnera byl pomocí dialýzy ze vzorků odstraněn imidazol.



Obrázek 12: Purifikace IGF-II z inklučních tělísek. **A:** Reprezentivní záznam elučního profilu purifikace His₆-GB1-Gly⁻¹-IGF-II na koloně HisTrap HP. Eluce byla prováděna imidazolovým gradientem (100 % B obsahuje 0,5 M imidazol). **B, C:** 15% SDS-PAGE analýza průběhu eluce v redukujícím (**B**) a neredukujícím (**C**) prostředí. St – standard molekulových hmotností Broad range [kDa], L – nanáška, FT – proteklá frakce, W1 – první promytí kolony, W2 – druhé promytí, A7–B12 – jímané frakce.

Při práci s rozpustným proteinem (IGF-II ve fúzi s NusA) je proces purifikace o něco rychlejší. Postup je popsán v kapitole 3.4.2 (str. 34). Na kolonu byl nanášen buněčný supernatant (CS). Nespecificky vázané proteiny byly vymyty imidazolem o nízké koncentraci (5 mM, W2) nebo do frakce A3, která odpovídá přibližně 50 mM imidazolu podle chromatografického záznamu na Obrázku 13 (str. 50). Zhodnocení dat, která poskytuje vizualizace pomocí porovnání SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí (tentýž obrázek), vypovídá o majoritní přítomnosti monomerní formy proteinu ve frakci A6. Frakce následující obsahují postupný žebříček proteinů o multimerním charakteru. Pro následující postupy byla použita izolovaná frakce A6. Před proteolytickým oddělením fúzního partnera byl ze vzorků odstraněn imidazol pomocí dialýzy, kdy došlo zároveň k převedení do pufru vhodného pro následnou gelovou chromatografii.



Obrázek 13: Purifikace rozpustného IGF-II (ve fúzi s NusA). **A:** Eluční profil purifikace NusA-His₆-(GlyAlaMet)⁻¹-IGF-II. Eluce byla prováděna imidazolovým gradientem (100 % B obsahuje 0,5 M imidazol). **B, C:** 12,5% SDS-PAGE analýza jednotlivých frakcí purifikace v redukujícím (**B**) a neredukujícím (**C**) prostředí. St – standard molekulových hmotností Broad range [kDa], StC – standard molekulových hmotností Spectra multicolor [kDa], sed – sediment buněčného lysátu, CS – buněčný supernatant, FT – proteklá frakce, W1 – omytí nanášejícím pufrem, W2 – omytí nespecificky vázaných proteinů (pufr s 5 mM imidazolem), A3–B12 – jímání frakce.

4.1.3 Proteolytické štěpení

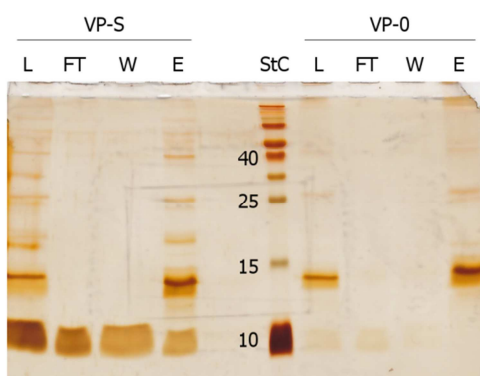
Po odstranění imidazolu z vybraných proteinových frakcí je třeba oddělit žádaný produkt od fúzního partnera. Součástí obou konstruktů produkce fúzního IGF-II je specifická sekvence aminokyselin rozeznávaná TEV proteasou. Štěpení za použití TEV proteasy má hned několik výhod. TEV proteasa vyžaduje specifičtější sekvenci aminokyselin pro štěpení než například thrombin nebo enterokinasa. Proto také není třeba štěpící proces v určité chvíli zastavovat, neboť nehrozí nebezpečí, že by degradovala i samotný produkt. Sekvence je dána uskupením ENLYFQ-G, které je v běžných proteinech velmi vzácné. Ke štěpení dochází mezi glutaminem a glycinem. Hlavní výhodou TEV proteasy však je, že ji lze rekombinantně snadno připravit za dosažení vysokých výtěžků.

Postup proteolytického štěpení je popsán v kapitolách 3.5.4 (str. 36) a 3.6.2 (str. 38). V případě štěpení IGF-II od GB1 bylo třeba TEV protease umožnit štěpení přidávkem

redukční síly do pufru. Protože IGF-II obsahuje disulfidické můstky, bylo tohoto prostředí dosaženo nastavením poměru redukovaného a oxidovaného glutathionu. V případě práce s IGF-II ve fúzi s NusA nebylo potřeba dalších aditiv ke zpřístupnění proteinu protease.

4.1.4 Separace produktu od fúzního partnera

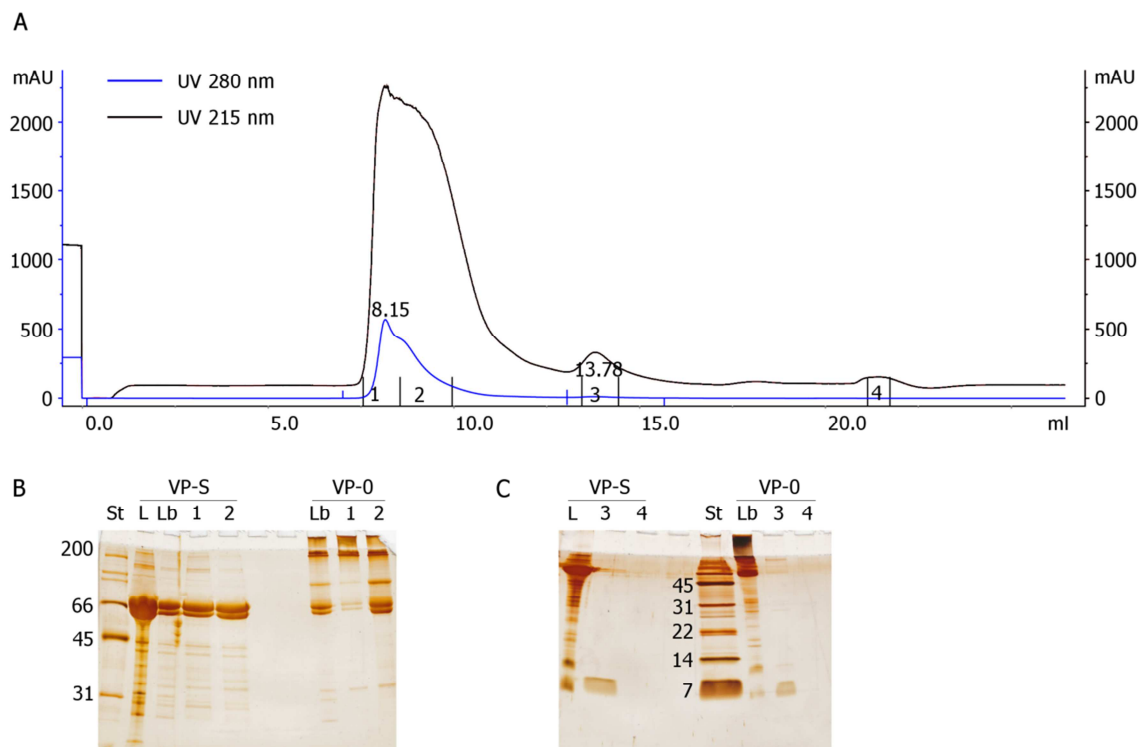
Pomocí samospádové chelatační chromatografie na nosiči HIS-Select Nickel Affinity Gel byl oddělen produkt štěpení od fúzního partnera GB1. Postup je popsán v kapitole 3.5.5 (str. 36). Histidinová kotva je navázána na fúzním proteinu, který se zachytí na koloně, a požadovaný produkt proteče skrz (FT). Kolona je poté ještě omyta nanášecím pufrům (W), aby byl veškerý produkt zachycen k dalšímu zpracování. Navázaný protein a spolu s ním i TEV proteasa, která také obsahuje histidinovou kotvu, je poté eluován elučním pufrům s 0,5 M imidazolem (E). Na Obrázku 14 je zobrazeno porovnání těchto frakcí pomocí SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím prostředí.



Obrázek 14: Elektroforetický záznam separace produktu proteolytického štěpení pomocí niklové afinitní chromatografie. StC – standard molekulových hmotností Spectra multicolor [kDa], L – nanáška na kolonu, FT – proteklá frakce, W – omytí kolony, E – eluce vázaných proteinů. Při tomto uspořádání se kýžený produkt (Gly⁻¹-IGF-II o velikosti 7,4 kDa) nachází v proteklé frakci a částečně i ve frakci omývací. Fúzní partner se díky přítomnosti histidinové kotvky zachytí na koloně. Levá část gelu sestává ze vzorků s redukujícím prostředím (VP-S), pravá ze vzorků bez redukčního činidla (VP-0).

Je zde vidět, že nanáška (L) obsahuje jednak produkty štěpení, kterými jsou Gly⁻¹-IGF-II a His₆-GB1, dále zbytek nepoštípaného materiálu a mimo jiné i multimerní formy produktu. Z redukující části gelu je patrné, že frakce proteklá (FT) a omývací (W) obsahují kýžený produkt, ale neredukující část gelu ukazuje, že je tento produkt přítomen téměř jen v multimerních formách provázaný přes disulfidické můstky, a proto na gelu i přes delší vybarvování není patrný pás monomeru. Toto propojení je přítomno i se zbytkem

nepošťípaného proteinu, z tohoto důvodu je produkt i ve frakci proteinů eluovaných z kolony (E). Díky tomuto chování IGF-II je poněkud ztížená práce s ním a vyplývají z ní celkem nízké výtěžky preparace.



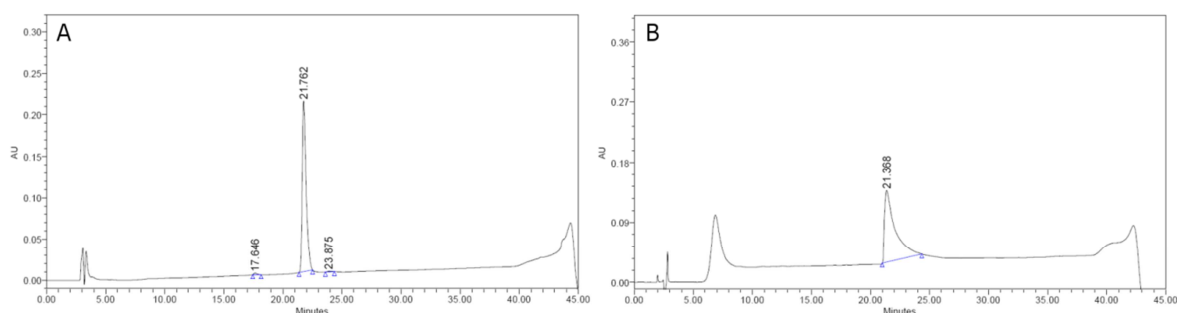
Obrázek 15: Separace produktu proteolytického štěpení při práci s IGF-II ve fúzi s NusA. **A:** Chromatografický záznam gelové permeační chromatografie využitý k separaci $(\text{GlyAlaMet})^{-1}$ -IGF-II a odštěpeného fúzního partnera. **B, C:** 10% (**B**) a 20% (**C**) SDS-PAGE v redukujícím (frakce VP-S) a neredukujícím (frakce VP-0) prostředí. St – standard molekulových hmotností Broad range [kDa], L – nanáška, Lb – nanáška před zvýšením koncentrace, 1–4 – zachycené frakce. Separovaný $(\text{GlyAlaMet})^{-1}$ -IGF-II (o velikosti přibližně 7,4 kDa) byl přítomen ve frakci 3.

Při práci s IGF-II ve fúzi s NusA není po odštěpení dalším krokem niklová afinitní chromatografie, ale gelová permeační chromatografie, která umožňuje dělení proteinů na základě velikosti částic. Pracovní postup je popsán v kapitole 3.6.4 (str. 38). Pro tuto metodu byla použita kolona Superdex 75 10/300 GL a FPLC aparatura Äkta basic. Má však omezený objem nanášky, a tak byla ve frakci před použitím navyšována koncentrace pomocí ultrafiltrace. Zahušťování probíhalo bez problémů, proteiny se nelepily na filtrační membránu. Zvýšení koncentrace bylo sledováno spektrofotometricky pomocí NanoDropu ND-1000. Produkty štěpení jsou dva odlišně velké proteiny: $(\text{GlyAlaMet})^{-1}$ -IGF-II o velikosti asi 7,4 kDa a NusA-His₆ o velikosti 57 kDa. Jako první tedy kolonou projde NusA-His₆,

případně zbytek nepoštípaného proteinu, kdežto (GlyAlaMet)⁻¹-IGF-II se zpomalí zachytáváním do náplně kolony a eluuje se v pozdějším retenčním čase. Pro odhadnutí tohoto času byla kolona nejprve kalibrována směsí proteinů o známé velikosti. Pro (GlyAlaMet)⁻¹-IGF-II byl vypočítán retenční čas přibližně 14 minut. Tento výpočet souhlasí se skutečným průběhem, který je znázorněn chromatogramem na Obrázku 15 (str. 52). Eluční profil byl sledován při dvou vlnových délkách, 254 a 280 nm. Jímané frakce byly dále analysovány pomocí SDS-PAGE, jejíž výstup je na tomtéž obrázku. Z gelu je patrné, že frakce 1 a 2 obsahují nepoštípaný protein a odštěpený NusA-His₆, a to i v multimerních formách, dle porovnání gelu v redukujícím a neredukujícím prostředí. Do frakce 3 byl zachycen produkt (GlyAlaMet)⁻¹-IGF-II, který je ve formě monomerní, jak ukazuje opět porovnání gelu v redukujícím a neredukujícím prostředí.

4.1.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi

Frakce získané dle kapitol 3.5.5 (str. 36) a 3.6.4 (str. 38), tedy ty obsahující IGF-II, byly nejprve zbaveny pufru na koloně Chromabond C₄, jak je popsáno v kapitole 3.7 (str. 39). Náplň kolony tvoří silikagel s navázanými nepolárními řetězci o délce čtyř uhlíků (butylové skupiny). Proteinová interakce s kolonou je na základě hydrofobních vlastností daného proteinu. Silněji se na kolonu váže protein s větší mírou hydrofobních úseků. Eluce byla prováděna 80% ACN (v/v) s 0,1% TFA (v/v) rozdělená do dvou frakcí po cca pěti objemech kolony (E1, E1). Eluce případných silně vázaných proteinů, jakými by mohly být multimerní formy IGF-II tvořící agregáty s vysokým podílem hydrofobních úseků, byla prováděna 100% ACN (E3).

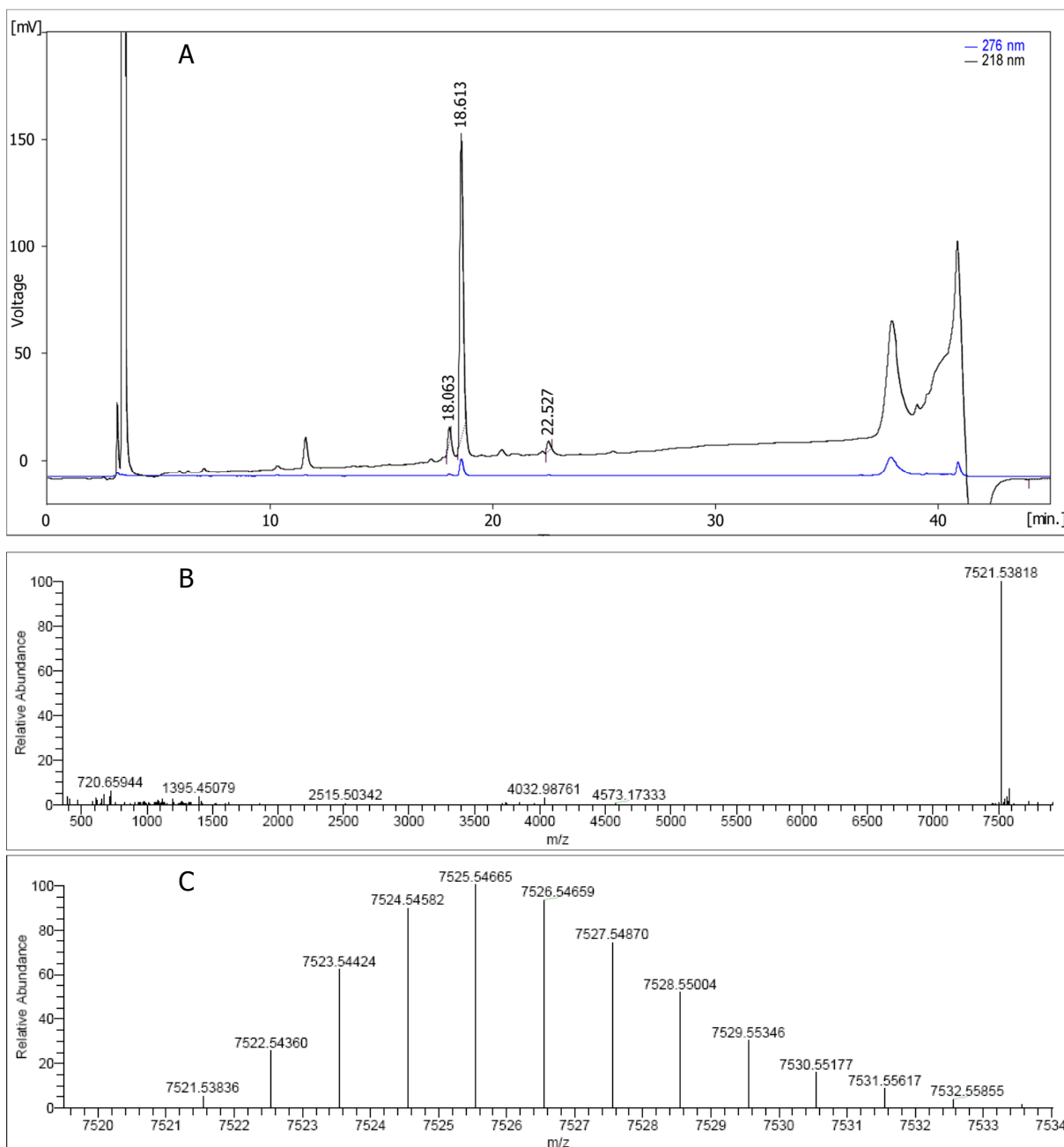


Obrázek 16: Porovnání chromatografických záznamů z analytické RP-HPLC (na koloně 214TP54-C4 o rozměrech 25×4,6 mm společnosti Vydac) komerčně dostupného IGF-II (B) a rekombinantně připraveného Gly⁻¹-IGF-II (A). Retenční čas připraveného Gly⁻¹-IGF-II odpovídá retenčnímu času zakoupeného IGF-II.

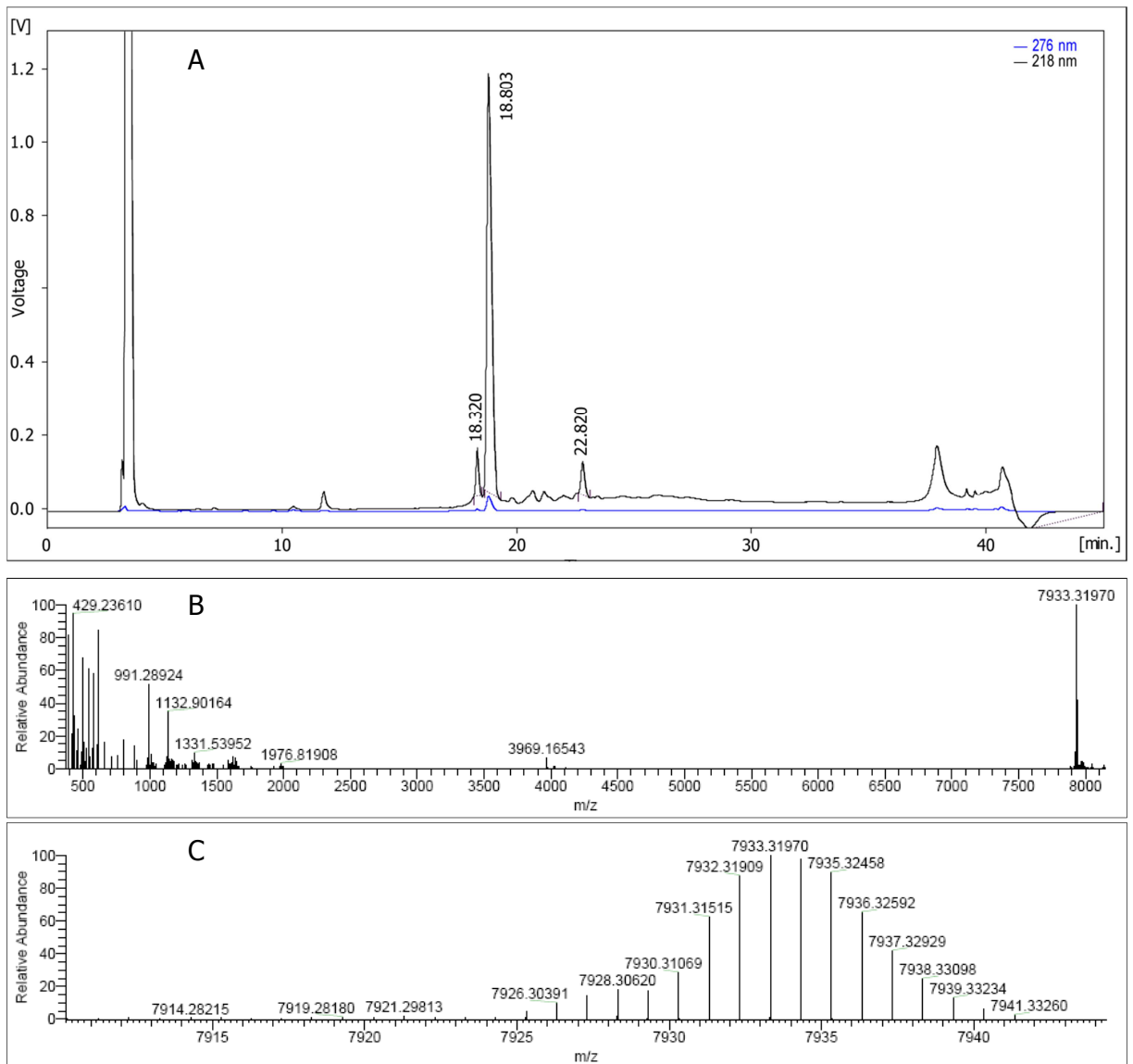
Přítomnost produktu v eluované frakci byla potvrzena pomocí analytického uspořádání RP-HPLC na koloně 214TP54-C4 (Vydac) o rozměrech 25×4,6 mm. Postup je popsán v kapitole 3.8.1 (str. 39). Byly analysovány frakce W, E1, E2 a E3. Protein se vždy nacházel ve frakci E1, jak se předpokládalo. Chromatografický záznam analýzy frakce E1 obsahující Gly⁻¹-IGF-II v porovnání se záznamem komerčně dostupného IGF-II je znázorněn na Obrázku 16 (str. 53).

Molekula IGF-II obsahuje ve své sekvenci šest cysteinů, které při sbalování proteinu vytváří tři disulfidické můstky. Při nesprávném provázání dochází k tvorbě různých isoform IGF-II. Během oxidativní renaturace obvykle dochází k vytvoření dvou termodynamicky stabilních forem s různě poskládanými disulfidickými můstky, jak bylo pozorováno pro IGF-I [161]. Správně sbalená forma proteinu lze odlišit pomocí vazebných testů, protože odlišná orientace helixu v druhé termodynamicky stabilní isoformě vede ke snížení biologické aktivity [162]. Za účelem oddělení těchto isoform byla provedena RP-HPLC v preparativním uspořádání. Frakce získaná po odsolení byla lyofilizována a následně rozpuštěna v 6,67% (v/v) kyselině octové s 26,67% (v/v) ACN a 0,03% (v/v) TFA. Takto připravený roztok proteinu byl nanesen na semipreparativní kolonu 214TP510-C4 (Vydac) o rozměrech 250×10 mm. Gradientová eluce popsaná v kapitole 3.8.2 (str. 39) probíhala za průtoku 4 ml/min. Chromatografické záznamy z přečištění Gly⁻¹-IGF-II a ¹³C/¹⁵N-Gly⁻¹-IGF-II s vyznačenými retenčními časy a hmotnostní spektra jsou na Obrázku 17 (str. 55) a 18 (str. 56). Chromatografické záznamy z přečištění ostatních analogů jsou spolu se záznamy z hmotnostní spektrometrie v Přílohách 1 až 9 (od str. 81). Nasbírané frakce byly lyofilizovány a přítomnost správného produktu byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie. V případě (GlyAlaMet)⁻¹-IGF-II však nebylo přečištěno dostatečné množství potřebné pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie. Připraveny byly následující proteiny:

<i>přibližný výtěžek na 1 L kultivačního média</i>	
Gly ⁻¹ -IGF-II	1,0 mg
¹³ C/ ¹⁵ N-Gly ⁻¹ -IGF-II	1,0 mg
Gly ⁻¹ Asn ²⁹ -IGF-II	1,4 mg
Gly ⁻¹ -IGF-II ins: Gly-Ser za Arg ³⁴	1,2 mg
Gly ⁻¹ -IGF-II ins: Pro-Gln za Ser ³⁹	0,8 mg
Gly ⁻¹ -IGF-II ins: Gly-Ser za Arg ³⁴ , Pro-Gln za Ser ³⁹	0,8 mg
(GlyAlaMet) ⁻¹ -IGF-II	nevážitelné



Obrázek 17 A: Chromatografický záznam semipreparativního uspořádání RP-HPLC z preparace Gly¹-IGF-II. Separovány byly tři frakce dle vyznačených retenčních časů. Nativní protein byl přítomen ve druhé frakci. **B:** Úplné hmotnostní spektrum Gly¹-IGF-II získané metodou ionizací pomocí elektrospreje. **C:** Vybraná oblast hmotnostního spektra příslušná signálu proteinu.



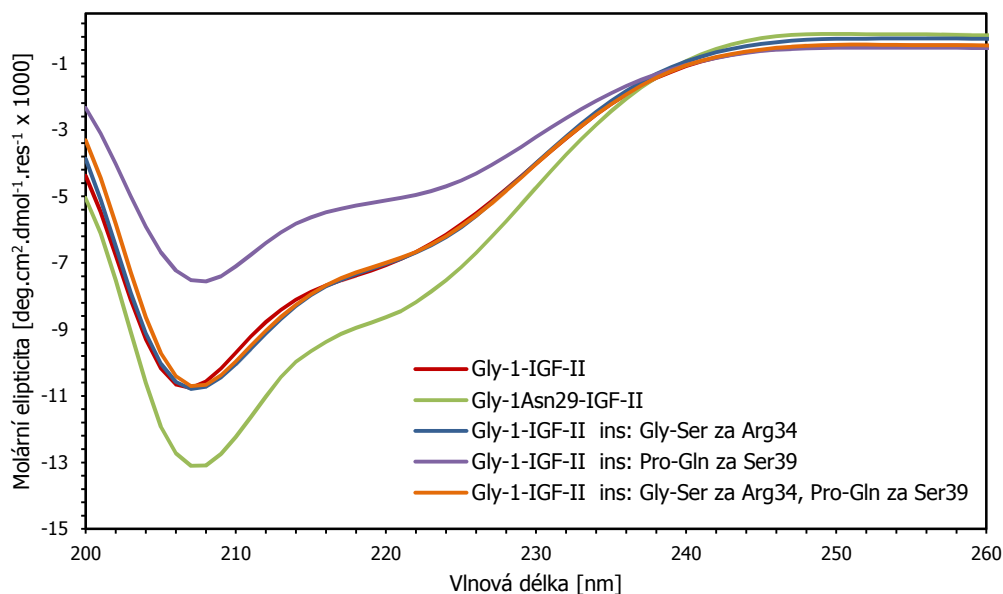
Obrázek 18 A: Chromatografický záznam semipreparativního uspořádání RP-HPLC z preparace $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Gly $^{-1}$ -IGF-II. Separovány byly tři frakce dle vyznačených retenčních časů. Nativní protein byl přítomen ve druhé frakci. **B:** Úplné hmotnostní spektrum $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Gly $^{-1}$ -IGF-II získané metodou ionizací pomocí elektrospreje. **C:** Vybraná oblast hmotnostního spektra příslušná signálu proteinu.

4.2 Biofyzikální charakterizace

4.2.1 Cirkulární dichroismus

Pro vyloučení odlišností sekundární struktury připravených proteinů, IGF-II a jeho analogů, byla využita metoda elektronového cirkulárního dichroismu (ECD). Cirkulární dichroismus je dán rozdílnou absorpcí pravotočivě a levotočivě kruhově polarizovaného paprsku a je měřen jako funkce vlnové délky. Tuto vlastnost mají opticky aktivní látky, jakými jsou i proteiny díky obsahu chirálních uhlíků tvořících peptidovou vazbu. Rozdílné sekundární struktury dávají jiný průběh ECD spektra.

Parametry snímání dat jsou popsány v kapitole 3.10 (str. 40). Vzorky byly měřeny v 5% (v/v) roztoku kyseliny octové při koncentraci 0,33 mg/ml. Proměřena byla spektra Gly⁻¹-IGF-II; Gly⁻¹Asn²⁹-IGF-II; Gly⁻¹-IGF-II ins: Gly-Ser za Arg³⁴; Gly⁻¹-IGF-II ins: Pro-Gln za Ser³⁹ a Gly⁻¹-IGF-II ins: Gly-Ser za Arg³⁴, Pro-Gln za Ser³⁹. Získaná spektra jsou zobrazena na Obrázku 19.



Obrázek 19: Spektra z cirkulárního dichroismu IGF-II a jeho analogů. Podle odlišnosti křivek analogů Gly⁻¹Asn²⁹-IGF-II a Gly⁻¹-IGF-II ins: Pro-Gln za Ser³⁹ lze soudit, že u těchto analogů patrně dochází k mírné modulaci terciární struktury.

Z průběhu naměřených spekter je patrné, že u dvou ze čtyř analogů dochází k podstatnému posunu křivky oproti nemodifikovanému Gly⁻¹-IGF-II. V případě Gly⁻¹Asn²⁹-IGF-II je změna směrem k většímu podílu helikální struktury, konkrétně se jedná o téměř 6% nárůst. Inserce Pro-Gln za Ser³⁹ naopak vede ke snížení procentuálního zastoupení helixu v terciární

strukturu proteinu o 5 %. V rámci ostatních strukturních elementů nedošlo k signifikantní změně.

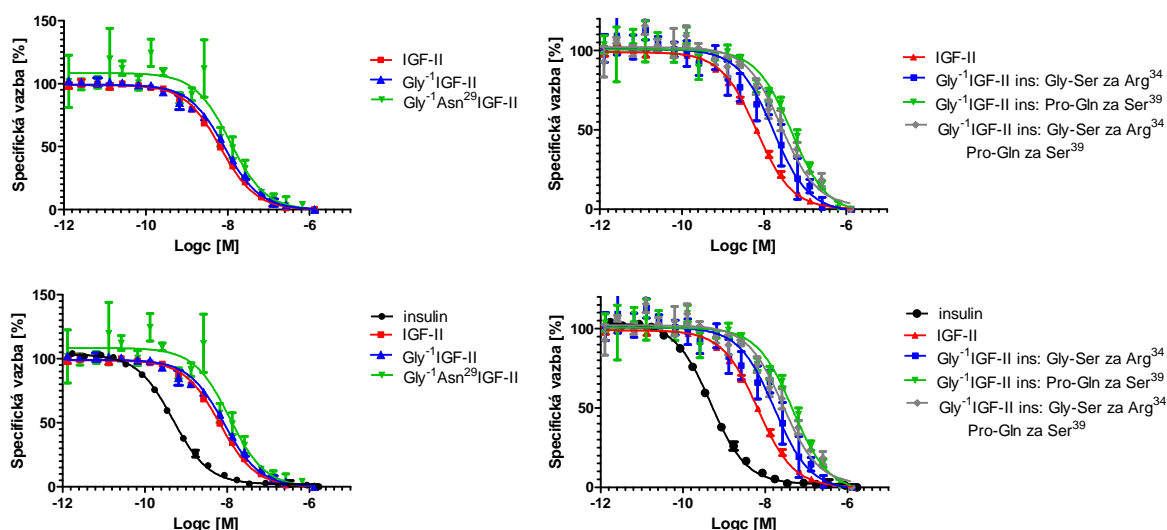
Pro odhad obsahu sekundárních struktur byla použita data nasnímaná v oblasti 200 až 260 nm. Výpočet byl proveden pomocí programu CD Spectra Deconvolution 2.11 s využitím metody neuronových sítí NNET_13. Používaná neuronová síť NNET_13 je vhodná pro komplexní spektra peptidů, přičemž průměrná chyba predikce sekundární struktury je 4,63 %. Program analysoval spektra v jednotkách v $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$. Vypočítané hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 2.

Tabulka 2: Procentuální zastoupení strukturních elementů IGF-II a jeho analogů vypočítané na základě dat z cirkulárního dichroismu v oblasti 200–260 nm.

	<i>α-helix</i>	<i>Antiparalelní β-list</i>	<i>Paralelní β-list</i>	<i>β-otáčka</i>	<i>Statistické klubko</i>	<i>Celkem</i>
Gly ¹ -IGF-II	25,5 %	11,8 %	10,6 %	18,9 %	35,3 %	102,1 %
Gly ¹ Asn ²⁹ -IGF-II	30,3 %	10,0 %	9,0 %	17,9 %	31,0 %	98,2 %
Gly ¹ -IGF-II ins: Gly-Ser za Arg ³⁴	26,0 %	11,6 %	10,5 %	18,8 %	35,0 %	101,8 %
Gly ¹ -IGF-II ins: Pro-Gln za Ser ³⁹	21,0 %	13,9 %	12,8 %	19,8 %	41,0 %	108,5 %
Gly ¹ -IGF-II ins: Gly-Ser za Arg ³⁴ , Pro-Gln za Ser ³⁹	26,0 %	11,6 %	10,5 %	18,7 %	35,2 %	102,0 %

4.2.2 Vazebné interakce

Vazebné afinity k receptorům IR-A a IGF-1R byly testovány *in vitro* v laboratoři Dr. Jiřího Jiráčka ve skupině Biochemie a molekulární biologie ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Afinity připravených proteinů vůči insulinovému receptoru isoformy A byly testovány na linii lidských lymfocytů IM-9, vůči IGF-1R na linii myších embryonálních fibroblastů s deletovaným genem pro myší IGF-1R transfekovaných genem pro lidský IGF-1R. Testování bylo prováděno metodou kompetitivního vytěšňování radioaktivně značeného insulinu nebo IGF-I vždy duplicitně a minimálně ve třech opakováních. K vyhodnocení výsledků byl použit program GraphPad Prism 5.0, ve kterém byly vytvořeny vazebné křivky a s využitím prokládání rovnicí modelu jednoho vazebného místa za současného zohlednění deplece ligandu určeny hodnoty disociačních konstant (K_d). Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3 (str. 59) a 4 (str. 60).



Obrázek 20: Porovnání vazebných křivek rekombinantně připravených analogů IGF-II k IR-A. Křivky závislosti specifické vazby na koncentraci daného analogu byly generovány programem GraphPad Prism 5.0 z hodnot získaných vždy minimálně ze tří měření.

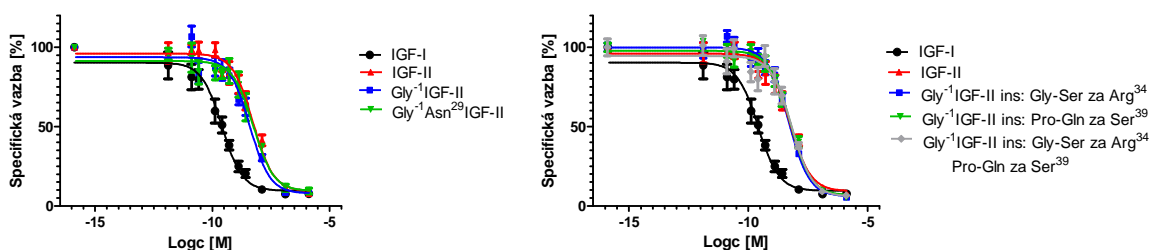
Afinita rekombinantně připraveného Gly¹-IGF-II vůči IR-A a IGF-1R je srovnatelná s afinitou komerčně dostupného IGF-II. Takto připravované proteiny tedy mohou být využívány ke stanovení vazebných interakcí vůči receptorům. Všechny připravené analogy v sobě nesou mutaci, která je odvozena ze sekvence IGF-I. Při testování došlo u všech čtyř analogů k očekávanému snížení vazebné afinity vůči insulinovému receptoru isoformy A.

Tabulka 3: Afinita rekombinantně připraveného Gly¹-IGF-II a jeho analogů k IR-A měřená na linii lidských lymfocytů IM-9. Hodnoty disociačních konstant byly získány proložením vazebných křivek za použití modelu jednoho vazebného místa, ze sady měření byla vypočítána střední chyba průměru. Specifická vazba byla vypočtena v závislosti na disociační konstantě insulinu.

<i>ligand</i>	<i>K_d ± SEM [nM]</i>	<i>specifická vazba [%]</i>	<i>počet měření</i>
insulin (Sigma-Aldrich, USA)	0,47 ± 0,05	100 ± 11	4
IGF-II (Sigma-Aldrich, USA)	6,99 ± 0,41	6,1 ± 0,4	7
Gly ¹ -IGF-II	8,09 ± 0,19	5,8 ± 0,1	3
Gly ¹ Asn ²⁹ -IGF-II	12,36 ± 2,20	3,8 ± 0,7	3
Gly ¹ -IGF-II ins: Gly-Ser za Arg ³⁴	15,37 ± 6,03	3,1 ± 1,2	3
Gly ¹ -IGF-II ins: Pro-Gln za Ser ³⁹	37,99 ± 2,92	1,2 ± 0,1	3
Gly ¹ -IGF-II ins: Gly-Ser za Arg ³⁴ , Pro-Gln za Ser ³⁹	23,38 ± 4,79	2,0 ± 0,4	3

Nejvýraznější snížení bylo pozorováno pro analog Gly⁻¹-IGF-II ins: Pro-Gln za Ser³⁹, u kterého byla naměřena specifická vazba 1,2 % v porovnání s insulinem. Naopak nejmenší snížení vazby k receptoru, bylo pozorováno u analogu s bodovou mutací v pozici 29, kdy byl serin nahrazen asparaginem. Naměřená hodnota odpovídá 3,8 % specifické vazby insulinu. Vazebné křivky jsou na Obrázku 20 (str. 59) a souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3 (str. 59).

Hodnoty získané z měření vazebných afinit připravených analogů vůči IGF-1 receptoru nevyovídají o významné změně vazebných interakcí. Na Obrázku 21 jsou vazebné křivky připravených analogů a souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4.



Obrázek 21: Porovnání vazebných křivek rekombinantně připravených analogů IGF-II k IGF-1R. Křivky závislosti specifické vazby na koncentraci daného analogu byly generovány programem GraphPad Prism 5.0 vyhodnocením hodnot získaných minimálně třemi měřeními.

V rámci připravených analogů došlo k mírnému nárůstu vazebné specifity vůči IGF-1R oproti komerčně dostupnému IGF-II. Vypočítané hodnoty disociačních konstant rekombinantně připraveného Gly⁻¹-IGF-II a komerčního IGF-II se mírně liší v důsledku nehomogenity mezi daty naměřenými pro Gly⁻¹-IGF-II, ve kterých se jedna z obdržných hodnot výrazně lišila od ostatních, ale přesto nebyla zanedbána. Mezi připravenými analogy měla větší vliv na zvýšení vazebné interakce inserce aminokyselin glycin a serin za arginin v pozici 34, pro kterou byla vypočítána vazebná specifita 5,8 % vztažená na IGF-I oproti 4,7 % komerčně dostupného IGF-II. Inserce prolinu a glutaminu za serin v pozici 39 se prakticky na vazebné afinitě neprojevila. Kombinace obou insercí naopak způsobila snížení specifické vazby (4,2 %).

Tabulka 4: Afinita rekombinantně připraveného Gly⁻¹-IGF-II a jeho analogů k IGF-1R měřená na transgenních myších embryonálních fibroblastech. Hodnoty disociačních konstant byly získány proložením vazebných křivek za použití modelu jednoho vazebného místa, z provedených měření byla vypočítána směrodatná odchylka. Specifická vazba byla vypočtena v závislosti na disociační konstantě IGF-I.

<i>ligand</i>	$K_d \pm SEM$ [nM]	<i>specifická vazba</i> [%]	<i>počet měření</i>
IGF-I (Tercica, USA)	0,24 ± 0,05	100 ± 19,2	5
IGF-II (Sigma-Aldrich, USA)	5,11 ± 1,64	4,7 ± 1,5	4
Gly ⁻¹ -IGF-II	3,35 ± 0,66	7,2 ± 1,4	4
Gly ⁻¹ Asn ²⁹ -IGF-II	4,56 ± 1,09	5,3 ± 1,3	3
Gly ⁻¹ -IGF-II ins: Gly-Ser za Arg ³⁴	4,13 ± 0,90	5,8 ± 1,3	3
Gly ⁻¹ -IGF-II ins: Pro-Gln za Ser ³⁹	5,00 ± 1,10	4,8 ± 1,1	3
Gly ⁻¹ -IGF-II ins: Gly-Ser za Arg ³⁴ , Pro-Gln za Ser ³⁹	5,68 ± 2,13	4,2 ± 1,6	3

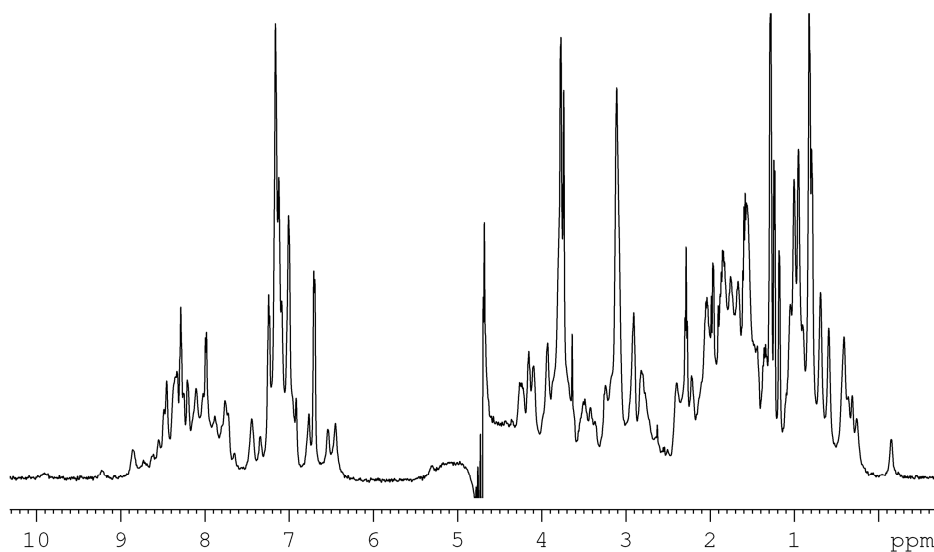
4.2.3 Nukleární magnetická resonance

Přítomnost terciární struktury rekombinantně připraveného Gly⁻¹-IGF-II byla potvrzena sérií experimentů nukleární magnetické resonance. Data byla snímána na spektrometru Bruker Avance II s pracovní ¹H frekvencí 600 MHz vybaveném tříjadernou kryosondou.

Byla proměřena spektra rekombinantně připravených Gly⁻¹-IGF-II nebo ¹³C/¹⁵N-Gly⁻¹-IGF-II o koncentraci 200 μM, resp. 185 μM, ve vodném roztoku 50 mM deuterované kyseliny octové s 5% (v/v) D₂O a 0,01% NaN₃. Parametry měření jsou uvedeny v kapitole 3.12 (str. 41). Na jednodimenzionálním ¹H spektru na Obrázku 22 (str. 62) jsou patrné signály amidických vodíků v oblasti 7.5 až 9 ppm. Tato disperze je charakteristická pro protein s pravidelnou strukturou obsahující hydrofobní jádro, naopak protein s nedefinovanou strukturou poskytuje signály pouze v užším rozmezí okolo 8.0 ppm [149]. Oblast v rozmezí 7 až 10 ppm přísluší signálům amidických vodíků hlavního řetězce, které se v oblasti okolo 7 ppm překrývají se signály aromatických skupin. Signály v okolí 1 ppm jsou typické pro vodíky na methylových skupinách s charakteristickou disperzí způsobenou přítomností hydrofobního jádra proteinu.

Dále bylo realizováno několik dvoudimenzionálních experimentů pro obdržení dat vhodných k biofyzikální charakterizaci připraveného proteinu. Na Obrázku 23 (str. 63) jsou specifické výřezy z těchto dvoudimenzionálních spekter vykazující další charakteristické rysy sekundární struktury. Na panelu A je zobrazena oblast spektra 2D TOCSY nesoucí korelace alifatických (F1) a amidických (F2) vodíků. Panely B a C obsahují 2D NOESY spektra

s prvky příznačnými pro α -helikální uspořádání terciární struktury (7–8 ppm F1 a 8–9 ppm F2).

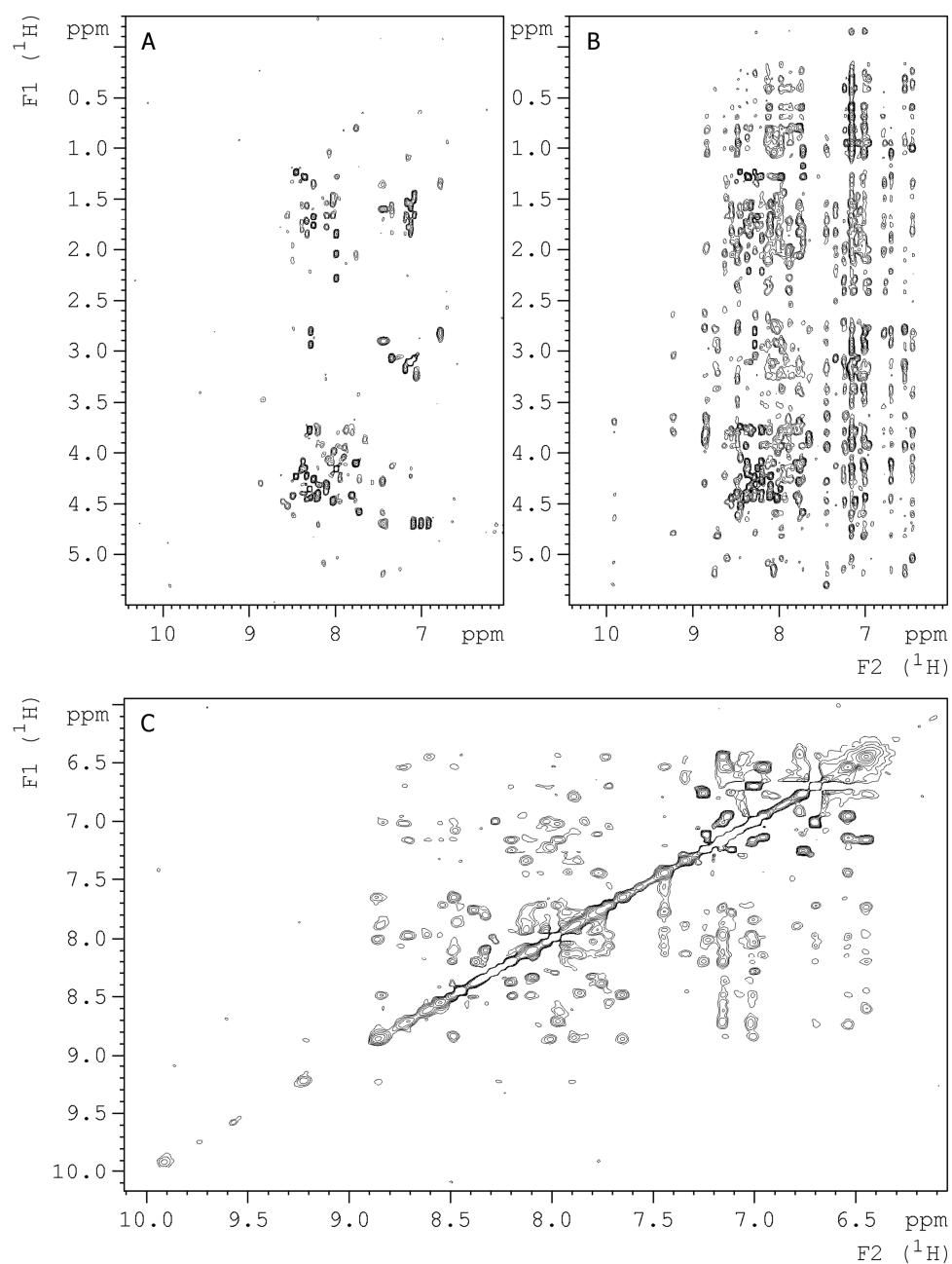


Obrázek 22: NMR spektrum rekombinantně připraveného Gly¹-IGF-II.

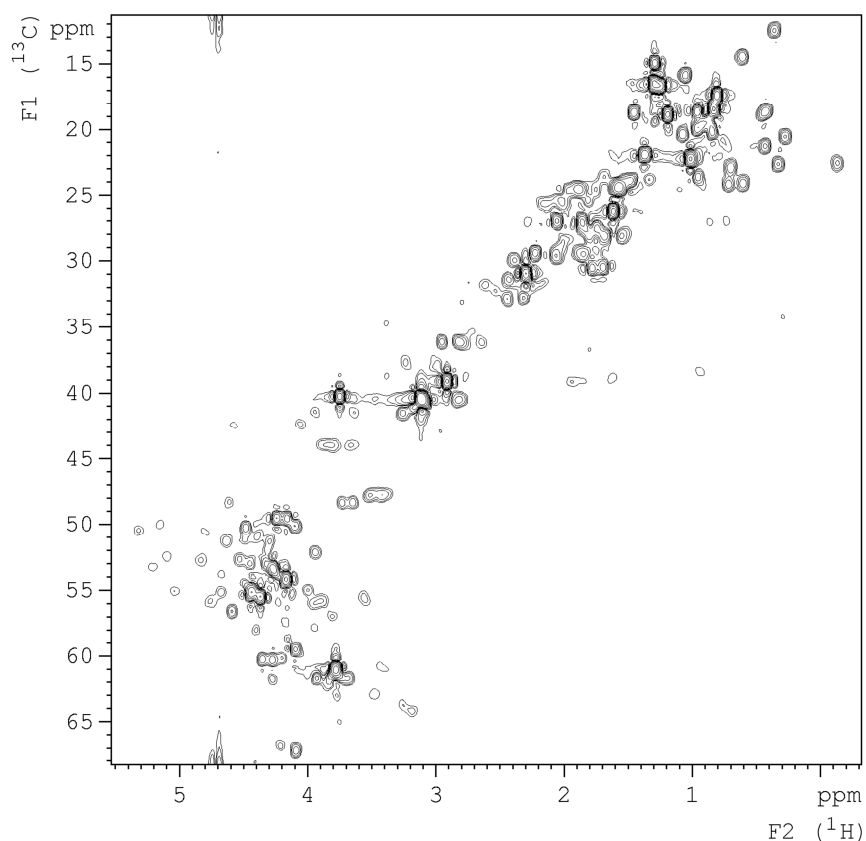
¹H NMR spektrum Gly¹-IGF-II o koncentraci 200 μ M měřené při 298 K ve vodném roztoku 50 mM deuterované kyseliny octové (pH 3,0) s 5% přídatkem D₂O. Signály v oblasti 7–10 ppm dávají vodíky na amidických dusících hlavního řetězce, oblast v okolí 1 ppm je charakteristická pro vodíky methylových skupin. Spektrum bylo generováno programem TopSpin 3.2.

Jako další v rámci formulace biofyzikálního chování byly uskutečněny experimenty HSQC. Pro tyto účely byl rekombinantně připraven Gly¹-IGF-II uniformě obohacený o isotopy ¹⁵N a ¹³C. Korelace přímo svázaných uhlíků a vodíků jsou zobrazeny na Obrázku 24 (str. 64). V tomto dvoudimenzionálním ¹³C/¹H HSQC spektru se nacházejí regiony typické pro methylové skupiny (11–30 ppm F1, 0–2 ppm F1), pro korelace uhlíků a vodíků hlavního řetězce (50–60 ppm F1, 3–5.5 ppm F2). Signály v oblasti 30–45 ppm F1 a 2–4 ppm F2 jsou zeslabené, což jsou charakteristické příznaky konformační heterogenity. Dalším dvoudimenzionálním experimentem bylo snímání dat vyvolaných odezvou svázaných atomů dusíku a vodíku hlavního řetězce a amidických skupin postranních řetězců (Obrázek 25, str. 65). Disperze jednotlivých signálů v tomto ¹⁵N/¹H spektru potvrzuje přítomnost terciární struktury, neboť nesbalený protein poskytuje data o signálech téměř nerozlišitelných v ¹H doméně. Přibližně 60 % získaných signálů lze dobře odlišit, zbylá část se navzájem překrývá v prostřední části spektra. Na základě publikovaných dat [34] byly k některým signálům přiřazeny odpovídající aminokyseliny. Ve spektru jsou označeny píky pro typickou

deuteriovou výměnou postranního řetězce glutaminu (Q18) a signály příslušející rigidním residuům, na něž byla soustředěna pozornost při studiu dynamiky proteinu.

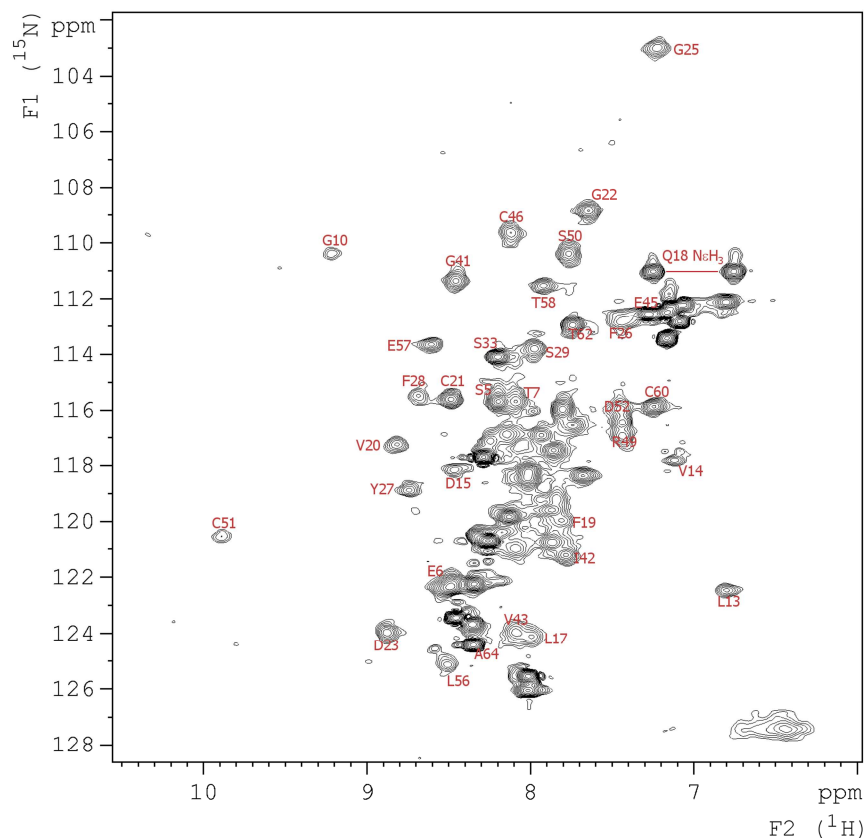


Obrázek 23: Biofyzikální charakteristika rekombinantně připraveného Gly¹-IGF-II. Protein byl měřen v koncentraci 200 μM při 298 K ve vodném roztoku 50 mM deuterované kyseliny octové (pH 3,0) s 5% přidavkem D₂O. **A:** 2D ¹H/¹H TOCSY oblast korelací alifatických (F1) vodíků s amidickými (F2). **B:** 2D ¹H/¹H NOESY korelace alifatických (F1) vodíků s amidickými (F2). **C:** 2D ¹H/¹H NOESY spektrum se signály v oblastech 7–8 ppm F1 a 8–9 ppm F2 charakteristickými pro α-helix. Spektrum bylo generováno programem TopSpin 3.2.



Obrázek 24: Spektrum nukleární magnetické resonance C-H párů molekuly Gly¹-IGF-II. 2D ¹³C/¹H HSQC spektrum zobrazuje koherence přímo svázaných uhlíků a vodíků molekuly ¹³C/¹⁵N-Gly¹-IGF-II o koncentraci 185 μM v roztoku 50 mM deuterované kyseliny octové s 5% (v/v) D₂O. Spektrum vykazuje typické rysy korelací v rámci methylových skupin (11–30 ppm F1, 0–2 ppm F2) a na hlavním proteinovém řetězci (50–60 ppm F1, 3–5.5 ppm F2). Zeslabené signály v centrální části spektra poukazují na strukturní heterogenitu. Spektrum bylo generováno programem TopSpin 3.2.

Nasnímaná data z výše zmíněných experimentů vykazují stejný jev rozšířených spektrálních čar, než jaké odpovídají proteinu o dané velikosti. Tento rys je typický u proteinů, které podléhají samovolné agregaci nebo se vyznačují podstatnou strukturní heterogenitou. Proto byla dále provedena měření difuzního chování za účelem objasnění chování studovaného proteinu.



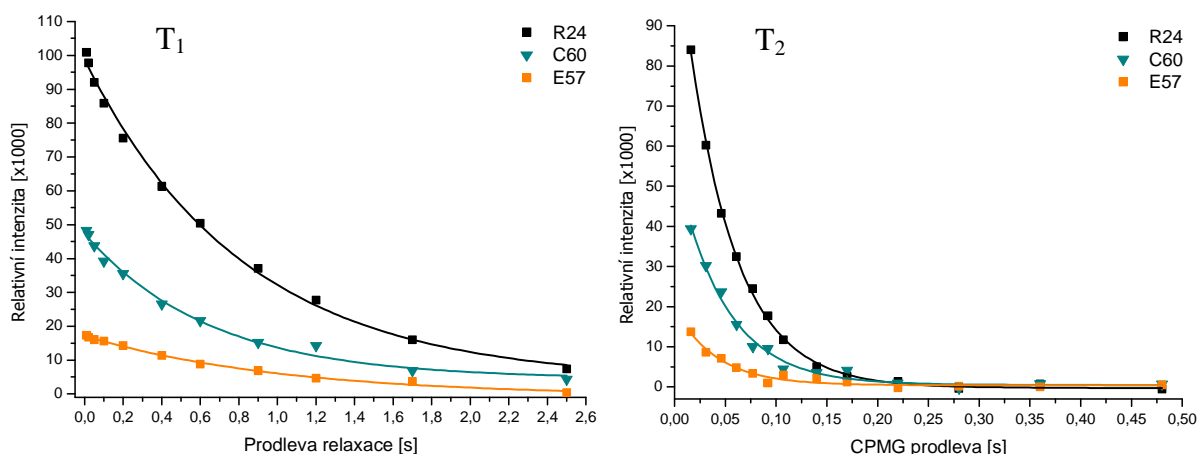
Obrázek 25: Resonanční odpověď párů N-H molekuly Gly⁻¹-IGF-II. 2D ¹⁵N/¹H HSQC spektrum ¹³C/¹⁵N-Gly⁻¹-IGF-II o koncentraci 185 μM v roztoku 50 mM deuterované kyseliny octové s 5% (v/v) D₂O. Ve spektru se nacházejí signály typické pro jednotlivé aminokyseliny, například výměnný dublet vodíku a deuteria postranního řetězce glutaminu (111 ppm F1, 7±0.2 ppm F2). S přihlédnutím k publikovaným datům [34] byly některé rozlišené signály přiřazeny k primární sekvenci. Spektrum bylo generováno programem TopSpin 3.2.

4.3 Difuzní a relaxační chování

Za účelem definice chování IGF-II z hlediska tvorby agregátů byly provedeny experimenty vedoucí k získání hodnot translačního difuzního koeficientu a rotačního korelačního času, které poskytují informaci o hydrodynamickém poloměru molekuly.

Jednu sadu experimentů představovalo snímání dat pro výpočet longitudinálního a transverzálního relaxačního času pro různé ¹⁵N na páteři proteinu. Měření bylo prováděno na vzorku ¹³C/¹⁵N-Gly⁻¹-IGF-II o koncentraci 185 μM v 50 mM deuterované kyselině octové (odpovídající pH 3,0) s přidavkem 5% (v/v) D₂O. Zhodnocením intenzity získaných signálů v závislosti na použitých relaxačních prodlevách podle rovnic uvedených v kapitole 3.12 (str. 41) byly získány hodnoty rotačních korelačních časů pro residua identifikovaná na základě dříve publikovaných dat [34]. Pro směrodatnost výsledků byly pro určení rotačního

korelačního času vybrány pouze aminokyseliny nacházející se v rigidní části molekuly, u nichž lze předpokládat, že transversální relaxace není ovlivněna příspěvkem chemické výměny [149]. Reprezentativní ukázky proložení křivek závislosti relativních intenzit signálů na relaxační prodlevě (longitudinální relaxační čas) a na CPMG prodlevě (transverzální relaxační čas) jsou na Obrázku 26. Křivky byly proloženy exponenciální rovnicí pro získání parametrů relaxace (T_1 a T_2). Hodnoty získaných longitudinálních a transversálních relaxačních časů pro přiřazená residua jsou na Obrázku 27 (str. 67).

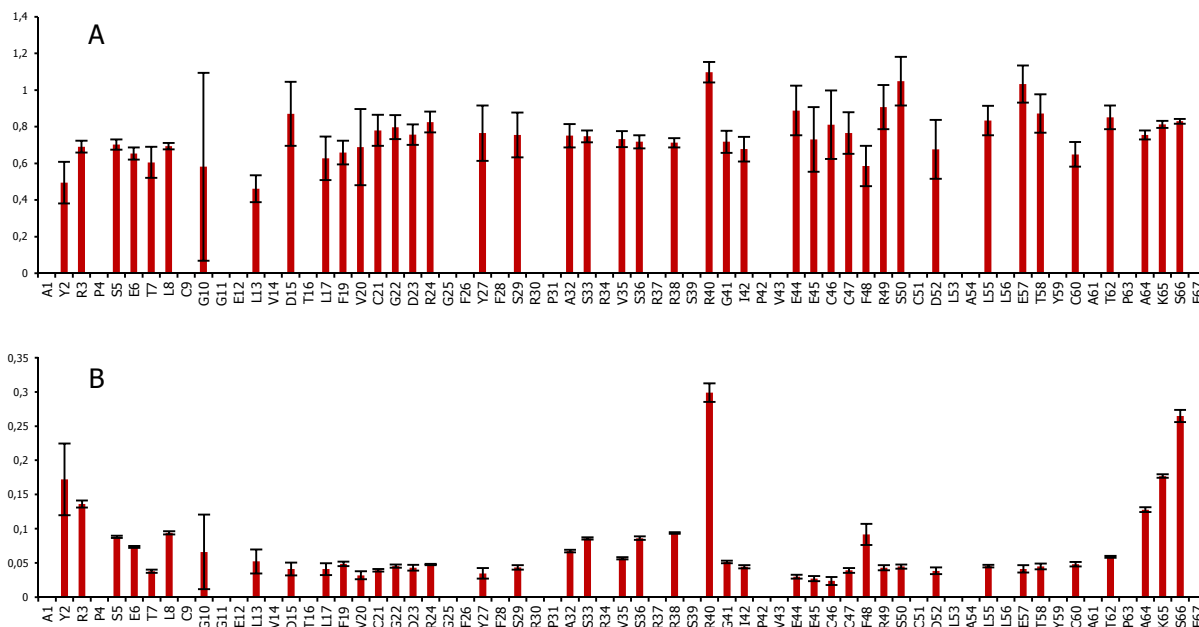


Obrázek 26: Příklad proložení křivek longitudinální (T_1) a transversální (T_2) relaxace. Křivky byly proloženy rovnicí $h = A \cdot e^{-t/T} + h_0$. Pro tato konkrétní residua byly získány hodnoty T_1 a T_2 R24: 0,826 s a 0,048 s, pro C60: 0,649 s a 0,048 s a pro E57: 1,033 s a 0,041 s. Vyhodnocení a grafický výstup byly získány v programu OriginPro 8.0.

Ze závislosti na poměru T_1 a T_2 byl vypočítán rotační korelační čas pro přiřazená residua molekuly. Průměrná hodnota rotačního korelačního času byla stanovena $13,4 \pm 2,8$ ns. Z něho vypočítaná hodnota hydrodynamického poloměru dle vztahu $R_h = \sqrt[3]{3\tau_c k_B T / 4\pi\eta}$ je $24,5 \pm 1,7$ Å.

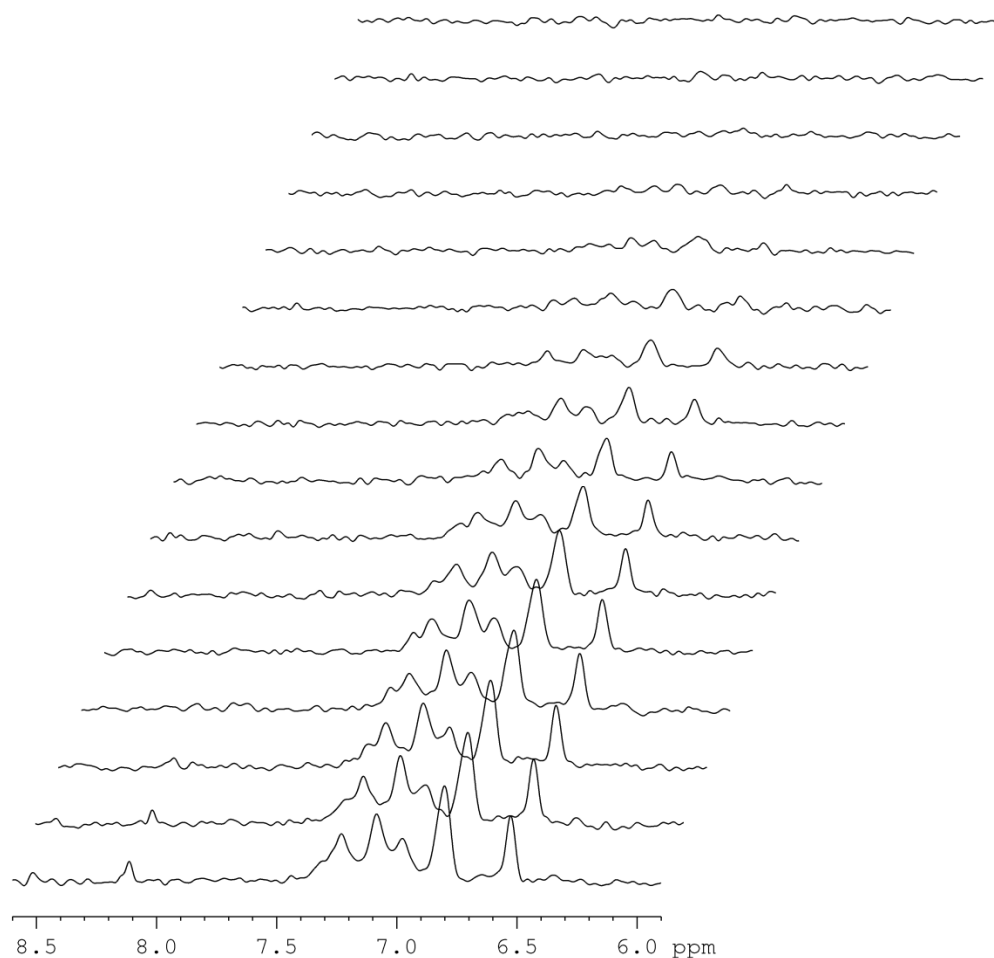
Druhé měření bylo zacíleno na získání hydrodynamického poloměru pomocí difuzních koeficientů za využití Debey-Stokes-Einsteinova vztahu. Měření bylo prováděno na vzorku $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Gly $^{-1}$ -IGF-II o koncentraci 185 μM v 50 mM (pH 3,0) a 5% (odpovídá 835 mM, pH 2,5) deuterované kyselině octové v prostředí D_2O . Ukázka takto získaného pseudodvodimenzionálního spektra pro oblast ^1H signálů aromatických postranních řetězců je na Obrázku 28 (str. 68). Matematické podklady pro výpočty jsou uvedeny v kapitole 3.12 (str. 41). Difuzní koeficient je v tomto případě určen za využití měření referenční molekuly, kterou byl zvolen dioxan. Z naměřených dat byl získán translační difuzní koeficient

$1,22 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ v roztoku 50 mM deuterované kyseliny octové a $1,13 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ v roztoku 5% deuterované kyseliny octové. Těmto translačním difuzním koeficientům odpovídají hydrodynamické poloměry 16,3 a 17,6 Å.



Obrázek 27: Hodnoty longitudinálních (A) a transverzálních (B) relaxačních časů přiřazených residuů. Chybové úsečky reprezentují směrodatné odchylky získané při exponenciálním proložení dat.

Hodnoty translačního difuzního koeficientu, hydrodynamického poloměru a rotačního korelačního času lze také stanovit teoretickým výpočtem pomocí programů HYDRONMR [163] nebo HYDROPRO [164], které jako vstupní hodnoty používají soubory z PDB databáze. Průměrné hodnoty translačního difuzního koeficientu a hydrodynamického poloměru vypočítané z dvaceti modelů struktury IGF-II (vstup 1IGL) pomocí programu HYDROPRO 10 jsou $(1,15 \pm 0,12) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a $13,3 \pm 0,3 \text{ Å}$. Průměrná hodnota rotačního korelačního času vypočtená programem HYDRONMR 7a ze stejných modelů je $6,5 \pm 0,3 \text{ ns}$.



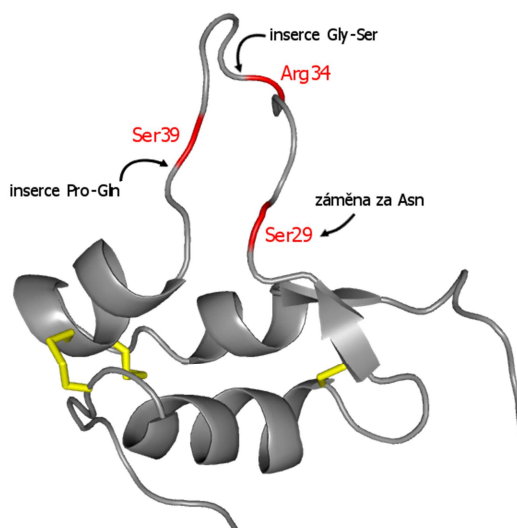
Obrázek 28: Chování ^1H signálů aromatických postranních řetězců při difuzních měřeních. Data byla snímána na $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Gly $^{-1}$ -IGF-II o koncentraci 185 μM v roztoku 5% deuterované kyseliny octové v prostředí D_2O . Intenzita signálu se zeslabuje v závislosti na použité intenzitě gradientů magnetického pole. Zpracováním integrálů vybraných signálů byla získána hodnota translačního difuzního koeficientu. Spektrum bylo generováno programem TopSpin 3.2.

5 Diskuse

Na rozdíl od insulínu a IGF-I, se kterými sdílí vysokou sekvenční podobnost a strukturní uspořádání, je IGF-II schopen vazby jak k insulínovému receptoru isoformy A, tak k IGF-1 receptoru s relativně vysokou afinitou. Každý z hormonů je mediátorem jiné buněčné odezvy. Hladina insulínu reguluje metabolické děje, jakými jsou nakládání se sacharidy a lipidy, zatímco cílová skupina dějů kontrolovaných IGF zahrnuje buněčnou proliferaci nebo diferenciaci. Díky strukturní podobnosti i mezi receptory pro výše zmíněné ligandy dochází k častému prolínání vyvolávaných účinků, a tím nechtěné systémové odpovědi. Je tedy namísto identifikovat jednotlivé prvky zodpovědné za specifitu receptorových interakcí jak mezi molekulami hormonů, tak v rámci buněčných receptorů. Tato diplomová práce se zabývá zkoumáním chování IGF-II pomocí NMR experimentů s cílem vytvoření efektivních podmínek pro další strukturní studie. Předmětem práce byl návrh protokolu vhodného k purifikaci rekombinantně připravovaných analogů IGF-II pro následné měření afinit k vybraným receptorům a biofyzikální charakterizaci. V rámci této práce byly připraveny čtyři analogy IGF-II, na kterých byl zkoumán vliv některých částí IGF-I na vazebnou afinitu k IGF-1R. Pro strukturní studie byl připraven uniformě ^{13}C a ^{15}N isotopově obohacený IGF-II k určení strukturní heterogenity a dynamiky pomocí NMR experimentů.

K produkci IGF-II byly zvoleny dva vektory pro heterologní expresi v systému *E. coli*. V obou plasmidech je obsažena sekvence kódující IGF-II ve fúzi s jiným proteinem, který usnadňuje rozpustnost a tedy i purifikaci daného proteinu. Při expresi IGF-II ve fúzi s GB1 proteinem v bakteriích dochází k ukládání produkovaného proteinu do inkluzních tělísek a za účelem získání správně sbaleného proteinu je třeba dále postoupit renaturační protokol. Tento fúzní partner byl zvolen pro jeho dobrou rozpustnost, stabilitu a snadné sbalení do nativní formy, ke kterému dojde i v rámci k němu připojenému proteinu [165, 166]. Druhým fúzním partnerem byl protein NusA, který vede k produkci rozpustného proteinu přímo do bakteriální cytoplasmy. Fúze IGF-II s tímto partnerem zajišťuje relativně vysoké výtěžky správně sbaleného proteinu [158]. Tento vektor byl zvolen na základě již publikovaných studií IGF-II [157]. Purifikace rekombinantně připravovaných analogů byla zatížena intermolekulárním kovalentním provázáním IGF-II přes cysteinové disulfidické můstky, díky kterému nedocházelo k efektivnímu odštěpení fúzního partnera a celkově k relativně nízkým výtěžkům. Na tento fakt se zaměří další experimenty za účelem zefektivnění proteinové produkce.

Na základě aminokyselinové sekvence IGF-I byly navrženy čtyři analogy IGF-II nesoucí v sekvenci bodovou mutaci nebo inserce. Změny v primární struktuře byly následující: (i) záměna serinu v pozici 29 za asparagin, (ii) vložení aminokyselin glycin a serin za asparagin v pozici 34, (iii) vložení prolinu a glutaminu za serin v pozici 39 a (iv) kombinace těchto dvou insercí. Zmíněné modifikace jsou vyznačeny na Obrázku 29. Inserce se nacházejí v nestrukturované doméně C a zavedení obou dvou insercí do molekuly IGF-II tuto doménu prodlužuje na stejnou délku jako je tomu u molekuly IGF-I. Tyto analogy a nemodifikovaný IGF-II byly připraveny v heterologním expresním systému *E. coli* ve fúzi s proteinem GB1. Jako enzym odštěpující fúzní protein byla zvolena TEV proteasa, a to pro její snadnou rekombinantní přípravu a nespornou výhodu štěpící sekvence, ze které na cílovém proteinu zůstává oproti přirozenému IGF-II navíc pouze jedna aminokyselina. Touto aminokyselinou je glycin umístěný na N-koncové části sekvence.



Obrázek 29: Znázornění residuů pro umístění mutací v rámci primární sekvence molekuly IGF-II. Serin v pozici 29 byl zaměněn za asparagin. Za arginin v pozici 34 byl vložen aminokyselinový pár glycin-serin a za serin v pozici 39 byly vloženy aminokyseliny prolin a glutamin. Inserce v pozici 39 měla největší vliv na vazebnou aktivitu ligandu, pravděpodobně díky svému umístění v blízkosti α -helixu, jehož formace mohla být tímto zásahem narušena. Ilustrace byla vytvořena v programu PyMOL 1.5 za použití PDB souboru 1IGL.

Analytické uspořádání vysokoučinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi a měření vazebných afinit potvrdily, že u takto připraveného Gly¹-IGF-II nedochází ke změnám v biologických vlastnostech. Retenční čas RP-HPLC Gly¹-IGF-II se překrýval s retenčním časem komerčně dostupného IGF-II. Naměřeny byly téměř shodné vazebné afinity k IR-A:

5,8 % specifické vazby pro Gly⁻¹-IGF-II a 6,1 % pro komerční IGF-II. Vazebné afinity Gly⁻¹-IGF-II (7,1 %) a komerčního IGF-II (4,6 %) vůči IGF-1R, jsou si velmi podobné, nicméně větší rozptyl jednotlivých hodnot K_d komerčního IGF-II potřebuje další upřesnění v budoucích experimentech.

Biochemická a biofyzikální charakterizace výše zmíněných analogů IGF-II metodami měření afinit těchto ligandů k receptorům a snímání spekter elektronového cirkulárního dichroismu poskytují informaci o sekvenčních elementech zodpovědných za rozdílné chování IGF-II a IGF-I.

Vazebné afinity všech čtyř analogů IGF-II vůči insulinovému receptoru isoformy A byly podle předpokladů nižší, než pro nemutovaný IGF-II. Nejvýraznější ovlivnění vazebné interakce bylo pozorováno u analogu s insercí Pro-Gln za Ser³⁹ (1,2 % specifické vazby). Podstatné snížení vazebné afinity způsobila inserce Gly-Ser za Arg³⁴ (3,1 %) nebo kombinace obou insercí (2,0 %). Data získaná z měření afinit vůči IGF-1R neposkytují průkazné informace o ovlivnění vazby, neboť se pro všechny analogy pohybují v přibližně stejném rozmezí hodnot.

Data z ECD ukazují mírné strukturní odlišnosti u dvou ze čtyř analogů ve srovnání s nepozměněným IGF-II, a to konkrétně v podílu α -helikálního uspořádání. Přibližně 26 % sekundární struktury Gly⁻¹-IGF-II, Gly⁻¹-IGF-II ins: Gly-Ser za Arg³⁴ a Gly⁻¹-IGF-II ins: Gly-Ser za Arg³⁴, Pro-Gln za Ser³⁹ je tvořeno α -helixem. V případě analogu s bodovou mutací Ser²⁹→Asn je tento podíl o 5 % vyšší a v situaci inserce Pro-Gln za Ser³⁹ je tento podíl o 5 % nižší. Zhodnocení dat získaných z vazebných afinit a strukturního porovnání připravených analogů nahrává následujícímu: Inserce dvou aminokyselin za arginin v pozici 34 se díky umístění v nestrukturované smyčce se na modulaci obsahu pravidelné sekundární struktury téměř neprojeví. Minimálně ne tak významně jako inserce dvou aminokyselin za serin v pozici 39, za kterým následuje sekvence aminokyselin formujících α -helix (Obrázek 29, str. 70). Zdá se, že tento nepatrný zásah do primární struktury proteinu výrazně může narušit jeho sekundární strukturu, avšak při kombinaci obou insercí se tato manipulace částečně kompenzuje. Podrobnější informace a prostředky k plnohodnotným závěrům však poskytnou až strukturní studie.

Doposud publikované NMR studie volného IGF-II poukazují na vysokou míru agregace, kvůli které jsou signály v obdržených spektrech podstatně širší, než jaké odpovídají proteinu o této velikosti [31, 32]. Jedním z faktorů ovlivňujících agregační chování proteinu je jeho vyšší koncentrace. Při předchozích experimentech byla snímána data vzorků o koncentracích

v rozmezí 1,3–2,4 mM, neboť v té době běžně používané NMR sondy nebyly schopny tak vysokého stupně citlivosti, jakého lze dosáhnout například s dnes dostupnými kryosondami. Zmíněná literatura se však neshoduje na pozorovaném chování IGF-II při jeho rozpouštění. Kvůli špatné rozpustnosti ve vodném roztoku o pH v rozmezí 4–11 a pro potlačení agregačního chování byl IGF-II rozpouštěn v kyselém prostředí. V předchozích NMR studiích na insulinu a IGF-I bylo pozorováno, že agregační chování omezí přidavek kyseliny octové [23, 167]. Pro práci s IGF-II proti sobě v této fázi stojí dvě pozorování, kdy v jednom případě naměřili ve vodném roztoku 5% (v/v) kyseliny octové kvalitní data [31], avšak v rukou druhé skupiny IGF-II v těchto podmínkách precipitoval [18], a tak další měření prováděli bez přídavku kyseliny octové. Efekt přítomnosti kyseliny octové v nízkých koncentracích na zúžení spektrálních čar však nemohou ani popřít, jelikož jimi použitý vzorek jisté stopy této látky obsahoval.

Data prezentovaná v této diplomové práci byla snímána ve vodných roztocích kyseliny octové a při nízkých proteinových koncentracích. NMR experimenty diskutované v tomto odstavci byly uskutečněny v 50 mM deuterované kyselině octové, která odpovídá přibližně roztoku o koncentraci 0,3 % (v/v) a pH 3,0. Dvoudimenzionální experimenty typu TOCSY a NOESY potvrzují existenci terciární struktury v připraveném Gly⁻¹-IGF-II. V několika oblastech se však naměřené signály překrývají, proto byly uskutečněny další vícedimenzionální experimenty s použitím isotopově obohaceného materiálu. Jedním z těchto experimentů bylo snímání ¹³C/¹H HSQC spektra uniformě dvojitě značeného Gly⁻¹-IGF-II. Signály v centrální části tohoto spektra jsou značně slabé, což poukazuje na konformační heterogenitu měřeného vzorku. V dalším provedeném experimentu byly snímány korelace dusíků a na nich vázaných vodíků. Podstatná část získaného spektra je tvořena relativně dobře rozlišenými signály, které byly na základě již publikovaných dat částečně přiřazeny k primární sekvenci [34]. I toto spektrum je zatíženo rozšířenými čarami, než jaké odpovídají proteinu o této velikosti, z čehož lze opět usuzovat na výskyt jisté konformační heterogenity nebo tvorbu agregátů. Jednou z možností, jak zvýšit kvalitu snímaných dat, tedy jak zamezit překryvům signálů a snížit jejich šířku, je měření IGF-II v komplexu s doménou 11 IGF-2R [34].

Na výše zmíněné agregační chování volného Gly⁻¹-IGF-II byly zaměřeny experimenty, pomocí kterých lze sledovat dynamické vlastnosti molekul. Výstupem těchto metod je odhadnutí hydrodynamického poloměru molekuly, v jednom případě na základě výpočtu rotačního korelačního času z longitudinálních a transverzálních relaxačních časů dusíku,

v druhém případě na základě translační difuze. Relaxace spinového systému byla sledována snímáním série dvoudimenzionálních heteronukleárních $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ korelačních experimentů pro měření ^{15}N longitudinálních a transverzálních relaxačních dob. Uniformě isotopově obohacený $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Gly⁻¹-IGF-II byl rozpuštěn v 50 mM deuterované kyselině octové s 5% (v/v) přídavkem D_2O . Difuzní měření zahrnovala snímání dat jak v 50 mM deuterované kyselině octové v prostředí D_2O , tak na vzorku rozpuštěném v 5% (v/v) deuterované kyselině octové v prostředí D_2O pro ověření rozpustnosti proteinu diskutované výše. Získaný translační difuzní koeficient byl v obou podmínkách přibližně stejný a podobný hodnotě vypočítané pomocí programu HYDROPRO verze 10. Hydrodynamický poloměr, odpovídající naměřenému translačnímu difuznímu koeficientu, 16,3 Å je srovnatelný s tím, který byl získán teoretickým výpočtem (13,3 Å), čímž poukazuje na výskyt monomerů a vylučuje tak tvorbu agregátů. Avšak hodnota rotačního korelačního času získaná z měření relaxací byla 2,5krát větší, než jaká byla vypočítána programem HYDRONMR verze 7c. Naměřené hodnotě odpovídá hydrodynamický poloměr 24,5 Å.

Zhodnocení těchto komplementárních technik vede k závěru, že rozšířené čáry v NMR spektrech IGF-II nejsou způsobeny tvorbou agregátů, ale výskytem dynamické konformační heterogenity. Díky těmto neustálým změnám konformace dochází k ovlivnění relaxačních časů, zejména transverzálních, a metoda tak poskytuje zkreslené údaje, které nelze využít k definici oligomerního stavu molekuly. Oproti tomu translační difuze není ovlivněna dynamickým chováním molekuly, neboť závisí především na jejím objemu, respektive molekulové hmotnosti. Součástí budoucích experimentů bude ověření relaxačního chování měřením na spektrometru s vyšším magnetickým polem.

6 Shrnutí výsledků

Metodou rekombinantní exprese v heterologním systému *E. coli* byl připraven Gly⁻¹-IGF-II, jehož vazebná specifita je srovnatelná s komerčně dostupným IGF-II. Takto připravený protein může být dále používán k definici vazebných interakcí. Pro studování rozhodujících prvků IGF-II majících vliv na vazbu k IR-A a IGF-1R byly připraveny analogy nesoucí elementy z aminokyselinové sekvence IGF-I. Jedním z nich byla bodová mutace serinu v pozici 29 za asparagin, další analogy zahrnovaly modifikace v nestrukturované doméně C. Mezi nimi bylo vložení aminokyselinových párů glycin a serin za arginin v pozici 34, dále inserce prolinu a glutaminu za serin v pozici 39, nebo kombinace obou insercí. Všechny připravené analogy měly podle očekávání nižší afinitu k insulinovému receptoru isoformy A oproti nepozměněnému Gly⁻¹-IGF-II. Při testování analogu s kombinací obou insercí, vedoucí ke stejné délce domény C jako v případě IGF-I, vůči IGF-1R však nebyla pozorována zvýšená vazebná interakce.

Součástí této diplomové práce bylo testování agregačního chování molekuly Gly⁻¹-IGF-II při experimentech nukleární magnetické resonance. Zhodnocení dat získaných z relaxačních difuzních měření vede k závěru, že za daných podmínek (50 mM nebo 5% (v/v) kyselina octová) je protein v monomerní formě a relativně nízká kvalita spekter (rozšířené čáry) je pravděpodobně způsobena výskytem dynamické konformační heterogenity.

Seznam použité literatury

- [1] A. Sakula, *J. R. Soc. Med.*, 81 (7), 414–5, 1988.
- [2] L. Rosenfeld, *Clin. Chem.*, 48 (12), 2270–88, 2002.
- [3] A. Carrel, *J. Exp. Med.*, 17 (1), 14–9, 1913.
- [4] F. G. Banting, C. H. Best, J. B. Collip, W. R. Campbell, A. A. Fletcher, *Can. Med. Assoc. J.*, 87 (20), 1062–7, 1962.
- [5] J. J. Abel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 12 (2), 132–6, 1926.
- [6] D. C. Hodgkin, *Diabetes*, 21 (12), 1131–50, 1972.
- [7] W. D. Salmon, W. H. Daughaday, *J. Lab. Clin. Med.*, 49 (6), 825–36, 1957.
- [8] E. R. Froesch, H. Bürgi, E. B. Ramseier, P. Bally, A. Labhart, *J. Clin. Invest.*, 42 (11), 1816–34, 1963.
- [9] W. H. Daughaday, K. Hall, M. S. Raben, W. D. Salmon, J. L. van den Brande, J. J. van Wyk, *Nature*, 235 (5333), 107, 1972.
- [10] E. Rinderknecht, R. E. Humbel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 73 (12), 4379–81, 1976.
- [11] W. H. Daughaday, K. Hall, W. D. Salmon, J. L. Van den Brande, J. J. Van Wyk, *Endocrinology*, 121 (5), 1911–2, 1987.
- [12] S. Trojan, *Lékařská fyziologie*, 4. vydání, GRADA, 2003.
- [13] W. F. Ganong, *Přehled lékařské fyziologie*, 20. vydání, Galén, 2005.
- [14] H. G. Joost, *Cell. Signal.*, 7 (2), 85–91, 1995.
- [15] J. Lee, P. F. Pilch, *Am. J. Physiol.*, 266 (2 Pt 1), C319–34, 1994.
- [16] S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.*, 61, 307–30, 1992.
- [17] D. R. Clemmons, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 140 (1)–(2), 19–24, 1998.
- [18] E. Rinderknecht, R. E. Humbel, *J. Biol. Chem.*, 253 (8), 2769–76, 1978.
- [19] E. Rinderknecht, R. E. Humbel, *FEBS Lett.*, 89 (2), 283–6, 1978.
- [20] M. L. Schaffer, K. Deshayes, G. Nakamura, S. Sidhu, N. J. Skelton, *Biochemistry*, 42 (31), 9324–34, 2003.
- [21] L. G. Laajoki, G. L. Francis, J. C. Wallace, J. A. Carver, M. A. Keniry, *J. Biol. Chem.*, 275 (14), 10009–15, 2000.
- [22] E. De Wolf, R. Gill, S. Geddes, J. Pitts, A. Wollmer, J. Grötzinger, *Protein Sci.*, 5 (11), 2193–202, 1996.
- [23] A. Sato, S. Nishimura, T. Ohkubo, Y. Kyogoku, S. Koyama, M. Kobayashi, T. Yasuda, Y. Kobayashi, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 41 (5), 433–40, 1993.
- [24] R. M. Cooke, T. S. Harvey, I. D. Campbell, *Biochemistry*, 30 (22), 5484–91, 1991.
- [25] A. M. Brzozowski, E. J. Dodson, G. G. Dodson, G. N. Murshudov, C. Verma, J. P. Turkenburg, F. M. de Bree, Z. Dauter, *Biochemistry*, 41 (30), 9389–97, 2002.
- [26] I. Siwanowicz, G. M. Popowicz, M. Wisniewska, R. Huber, K. P. Kuenkele, K. Lang, R. A. Engh, T. A. Holak, *Structure*, 13 (1), 155–67, 2005.
- [27] F. F. Vajdos, M. Ultsch, M. L. Schaffer, K. D. Deshayes, J. Liu, N. J. Skelton, A. M. de Vos, *Biochemistry*, 40 (37), 11022–9, 2001.
- [28] C.-H. Yun, Y.-H. Tang, Y.-M. Feng, X.-M. An, W.-R. Chang, D.-C. Liang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326 (1), 52–9, 2005.
- [29] T. Sitar, G. M. Popowicz, I. Siwanowicz, R. Huber, T. A. Holak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103 (35), 13028–33, 2006.
- [30] W. Zesławski, H. G. Beisel, M. Kamionka, W. Kalus, R. A. Engh, R. Huber, K. Lang, T. A. Holak, *EMBO J.*, 20 (14), 3638–44, 2001.

- [31] H. Terasawa, D. Kohda, H. Hatanaka, K. Nagata, N. Higashihashi, H. Fujiwara, K. Sakano, F. Inagaki, *EMBO J.*, 13 (23), 5590–7, 1994.
- [32] A. M. Torres, B. E. Forbes, S. E. Aplin, J. C. Wallace, G. L. Francis, R. S. Norton, *J. Mol. Biol.*, 248 (2), 385–401, 1995.
- [33] J. Brown, C. Delaine, O. J. Zaccheo, C. Siebold, R. J. Gilbert, G. van Boxel, A. Denley, J. C. Wallace, A. B. Hassan, B. E. Forbes, E. Y. Jones, *EMBO J.*, 27 (1), 265–76, 2008.
- [34] C. Williams, H. Hoppe, D. Rezgui, M. Strickland, B. E. Forbes, F. Grutzner, S. Frago, R. Z. Ellis, P. Wattana-amorn, S. N. Prince, O. J. Zaccheo, C. M. Nolan, A. J. Mungall, E. Y. Jones, M. P. Crump, A. B. Hassan, *Science*, 338 (6111), 1209–13, 2012.
- [35] Q. Guo, M. Manolopoulou, Y. Bian, A. B. Schilling, W.-J. Tang, *J. Mol. Biol.*, 395 (2), 430–43, 2010.
- [36] O. Gursky, Y. Li, J. Badger, D. L. Caspar, *Biophys. J.*, 61 (3), 604–11, 1992.
- [37] S. Shimasaki, M. Shimonaka, H. P. Zhang, N. Ling, *J. Biol. Chem.*, 266 (16), 10646–53, 1991.
- [38] J. L. Martin, R. C. Baxter, *J. Biol. Chem.*, 261 (19), 8754–60, 1986.
- [39] R. C. Baxter, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 278 (6), E967–76, 2000.
- [40] D. R. Clemmons, *Endocr. Rev.*, 22 (6), 800–17, 2001.
- [41] S. Rajaram, D. J. Baylink, S. Mohan, *Endocr. Rev.*, 18 (6), 801–31, 1997.
- [42] R. C. Bunn, J. L. Fowlkes, *Trends Endocrinol. Metab.*, 14 (4), 176–81, 2003.
- [43] S. Shimasaki, N. Ling, *Prog. Growth Factor Res.*, 3 (4), 243–66, 1991.
- [44] C. Duan, Q. Xu, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 142 (1)–(2), 44–52, 2005.
- [45] S. M. Firth, R. C. Baxter, *Endocr. Rev.*, 23 (6), 824–54, 2002.
- [46] G. M. Neumann, L. A. Bach, *J. Biol. Chem.*, 274 (21), 14587–94, 1999.
- [47] W. Kalus, M. Zweckstetter, C. Renner, Y. Sanchez, J. Georgescu, M. Grol, D. Demuth, R. Schumacher, C. Dony, K. Lang, T. A. Holak, *EMBO J.*, 17 (22), 6558–72, 1998.
- [48] J. F. Wang, B. Hampton, T. Mehlman, W. H. Burgess, M. M. Rechler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157 (2), 718–26, 1988.
- [49] P. Vorwerk, B. Hohmann, Y. Oh, R. G. Rosenfeld, R. M. Shymko, *Endocrinology*, 143 (5), 1677–85, 2002.
- [50] L. D. Payet, X.-H. Wang, R. C. Baxter, S. M. Firth, *Endocrinology*, 144 (7), 2797–806, 2003.
- [51] P. J. Ho, R. C. Baxter, *Endocrinology*, 138 (9), 3811–8, 1997.
- [52] S. J. Headey, K. S. Leeding, R. S. Norton, L. A. Bach, *J. Mol. Endocrinol.*, 33 (2), 377–86, 2004.
- [53] M. Galanis, S. M. Firth, J. Bond, A. Nathanielsz, A. A. Kortt, P. J. Hudson, R. C. Baxter, *J. Endocrinol.*, 169 (1), 123–33, 2001.
- [54] F. E. Carrick, B. E. Forbes, J. C. Wallace, *J. Biol. Chem.*, 276 (29), 27120–8, 2001.
- [55] S. M. Firth, R. C. Baxter, *J. Endocrinol.*, 160 (3), 379–87, 1999.
- [56] J. A. Marinaro, D. J. Casley, L. A. Bach, *Eur. J. Endocrinol.*, 142 (5), 512–6, 2000.
- [57] J. A. Marinaro, G. M. Neumann, V. C. Russo, K. S. Leeding, L. A. Bach, *Eur. J. Biochem.*, 267 (17), 5378–86, 2000.
- [58] A. Sala, S. Capaldi, M. Campagnoli, B. Faggion, S. Labò, M. Perduca, A. Romano, M. E. Carrizo, M. Valli, L. Visai, L. Minchiotti, M. Galliano, H. L. Monaco, *J. Biol. Chem.*, 280 (33), 29812–9, 2005.
- [59] Z. Kuang, S. Yao, D. W. Keizer, C. C. Wang, L. A. Bach, B. E. Forbes, J. C. Wallace, R. S. Norton, *J. Mol. Biol.*, 364 (4), 690–704, 2006.
- [60] S. J. Headey, D. W. Keizer, S. Yao, G. Brasier, P. Kantharidis, L. A. Bach, R. S. Norton, *Mol. Endocrinol.*, 18 (11), 2740–50, 2004.

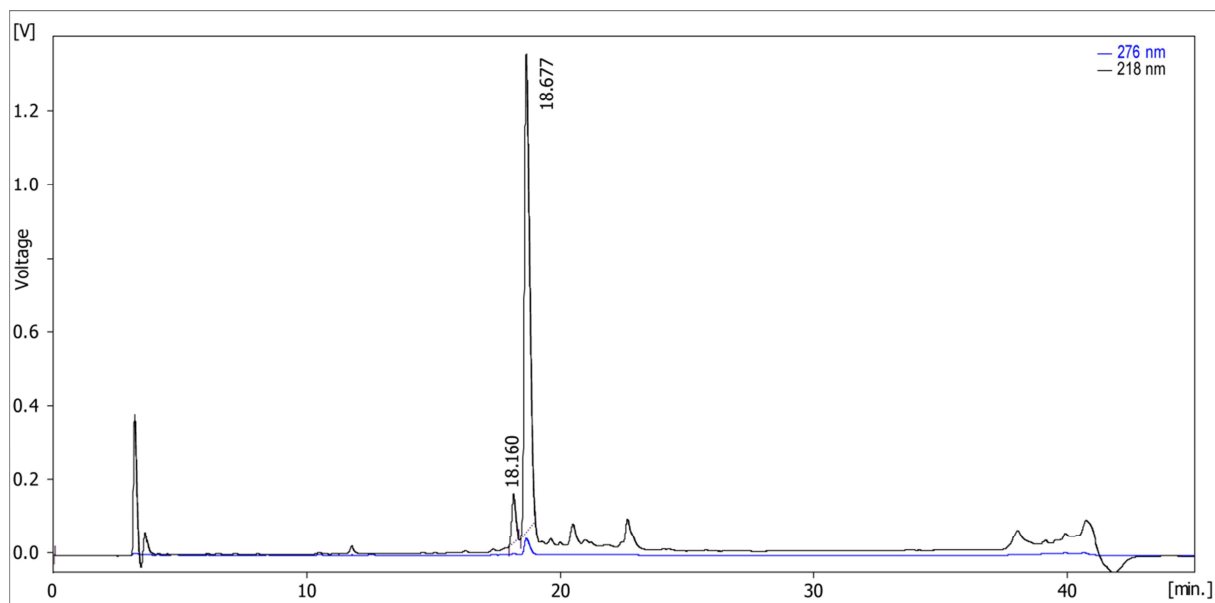
- [61] I. R. Chandrashekar, S. Yao, C. C. Wang, P. S. Bansal, P. F. Alewood, B. E. Forbes, J. C. Wallace, L. A. Bach, R. S. Norton, *Biochemistry*, 46 (11), 3065–74, 2007.
- [62] R. C. Baxter, H. Saunders, *J. Endocrinol.*, 134 (1), 133–9, 1992.
- [63] S. M. Firth, U. Ganeshprasad, R. C. Baxter, *J. Biol. Chem.*, 273 (5), 2631–8, 1998.
- [64] M. Boes, B. A. Booth, A. Sandra, B. L. Dake, A. Bergold, R. S. Bar, *Endocrinology*, 131 (1), 327–30, 1992.
- [65] M. S. Lewitt, H. Saunders, J. L. Phuyal, R. C. Baxter, *Endocrinology*, 134 (6), 2404–9, 1994.
- [66] B. E. Forbes, P. McCarthy, R. S. Norton, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 3, 38, 2012.
- [67] S. M. Leal, S. S. Huang, J. S. Huang, *J. Biol. Chem.*, 274 (10), 6711–7, 1999.
- [68] R. Rajah, B. Valentinis, P. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 272 (18), 12181–8, 1997.
- [69] B. S. Schütt, M. Langkamp, U. Rauschnabel, M. B. Ranke, M. W. Elmlinger, *J. Mol. Endocrinol.*, 32 (3), 859–68, 2004.
- [70] C. Perks, P. V Newcomb, M. R. Norman, J. M. Holly, *J. Mol. Endocrinol.*, 22 (2), 141–150, 1999.
- [71] K.-W. Lee, B. Liu, L. Ma, H. Li, P. Bang, H. P. Koeffler, P. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 279 (1), 469–76, 2004.
- [72] D. M. Bradham, A. Igarashi, R. L. Potter, G. R. Grotendorst, *J. Cell Biol.*, 114 (6), 1285–94, 1991.
- [73] V. Joliot, C. Martinerie, G. Dambrine, G. Plassiart, M. Brisac, J. Crochet, B. Perbal, *Mol. Cell. Biol.*, 12 (1), 10–21, 1992.
- [74] M. Wong, M. L. Kireeva, T. V Kolesnikova, L. F. Lau, *Dev. Biol.*, 192 (2), 492–508, 1997.
- [75] M. Constância, M. Hemberger, J. Hughes, W. Dean, A. Ferguson-Smith, R. Fundele, F. Stewart, G. Kelsey, A. Fowden, C. Sibley, W. Reik, *Nature*, 417 (6892), 945–8, 2002.
- [76] T. M. DeChiara, E. J. Robertson, A. Efstratiadis, *Cell*, 64 (4), 849–59, 1991.
- [77] Z. Q. Wang, M. R. Fung, D. P. Barlow, E. F. Wagner, *Nature*, 372 (6505), 464–7, 1994.
- [78] P. A. Leighton, R. S. Ingram, J. Eggenschwiler, A. Efstratiadis, S. M. Tilghman, *Nature*, 375 (6526), 34–9, 1995.
- [79] F. L. Sun, W. L. Dean, G. Kelsey, N. D. Allen, W. Reik, *Nature*, 389 (6653), 809–15, 1997.
- [80] W. H. Daughaday, P. Rotwein, *Endocr. Rev.*, 10 (1), 68–91, 1989.
- [81] I. K. Ashton, J. Zapf, I. Einschenk, I. Z. MacKenzie, *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 110 (4), 558–63, 1985.
- [82] M. Bajaj, M. D. Waterfield, J. Schlessinger, W. R. Taylor, T. Blundell, *Biochim. Biophys. Acta*, 916 (2), 220–6, 1987.
- [83] C. W. Ward, P. A. Hoyne, R. H. Flegg, *Proteins*, 22 (2), 141–53, 1995.
- [84] A. Ullrich, A. Gray, A. W. Tam, T. Yang-Feng, M. Tsubokawa, C. Collins, W. Henzel, T. Le Bon, S. Kathuria, E. Chen, S. Jacobs, U. Francke, J. Ramachandran, Y. Fujita-Yamaguchi, *EMBO J.*, 5 (10), 2503–12, 1986.
- [85] C. Marino-Buslje, K. Mizuguchi, K. Siddle, T. L. Blundell, *FEBS Lett.*, 441 (2), 331–6, 1998.
- [86] J. P. O’Bryan, R. A. Frye, P. C. Cogswell, A. Neubauer, B. Kitch, C. Prokop, R. Espinosa, 3rd, M. M. Le Beau, H. S. Earp, E. T. Liu, *Mol. Cell. Biol.*, 11 (10), 5016–31, 1991.
- [87] E. Surmacz, C. Sell, J. Swantek, H. Kato, C. T. Roberts Jr, D. LeRoith, R. Baserga, *Exp. Cell Res.*, 218 (1), 370–80, 1995.
- [88] D. L. Esposito, V. A. Blakesley, A. P. Koval, A. G. Scrimgeour, D. LeRoith, *Endocrinology*, 138 (7), 2979–88, 1997.
- [89] J. P. Liu, J. Baker, A. S. Perkins, E. J. Robertson, A. Efstratiadis, *Cell*, 75 (1), 59–72, 1993.
- [90] R. O’Connor, A. Kauffmann-Zeh, *Mol. Cell. Biol.*, 17 (1), 427–35, 1997.

- [91] Y. Yamaguchi, J. S. Flier, H. Benecke, B. J. Ransil, D. E. Moller, *Endocrinology*, 132 (3), 1132–8, 1993.
- [92] S. Seino, G. I. Bell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159 (1), 312–6, 1989.
- [93] L. Mosthaf, K. Grako, T. J. Dull, L. Coussens, A. Ullrich, D. A. McClain, *EMBO J.*, 9 (8), 2409–13, 1990.
- [94] B. Bhaumick, R. M. Bala, M. D. Hollenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78 (7), 4279–83, 1981.
- [95] S. D. Chernausk, S. Jacobs, J. J. Van Wyk, *Biochemistry*, 20 (26), 7345–50, 1981.
- [96] J. Brandt, A. S. Andersen, C. Kristensen, *J. Biol. Chem.*, 276 (15), 12378–84, 2001.
- [97] E. M. Schaefer, K. Siddle, L. Ellis, *J. Biol. Chem.*, 265 (22), 13248–53, 1990.
- [98] M. Kasuga, F. A. Karlsson, C. R. Kahn, *Science*, 215 (4529), 185–7, 1982.
- [99] J. B. Rubin, M. A. Shia, P. F. Pilch, *Nature*, 305 (5933), 438–40, 1983.
- [100] A. Belfiore, *Curr. Pharm. Des.*, 13 (7), 671–86, 2007.
- [101] F. Frasca, G. Pandini, P. Scalia, L. Sciacca, R. Mineo, A. Costantino, I. D. Goldfine, A. Belfiore, R. Vigneri, *Mol. Cell. Biol.*, 19 (5), 3278–88, 1999.
- [102] J. C. Byrd, J. H. Park, B. S. Schaffer, F. Garmroudi, R. G. MacDonald, *J. Biol. Chem.*, 275 (25), 18647–56, 2000.
- [103] J. L. Kreiling, J. C. Byrd, R. G. MacDonald, *J. Biol. Chem.*, 280 (22), 21067–77, 2005.
- [104] P. Y. Tong, S. E. Tollefsen, S. Kornfeld, *J. Biol. Chem.*, 263 (6), 2585–8, 1988.
- [105] P. D. Lee, D. Hodges, R. L. Hintz, J. H. Wyche, R. G. Rosenfeld, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 134 (2), 595–600, 1986.
- [106] D. Z. Ewton, S. L. Falen, J. R. Florini, *Endocrinology*, 120 (1), 115–23, 1987.
- [107] A. T. De Souza, G. R. Hankins, M. K. Washington, T. C. Orton, R. L. Jirtle, *Nat. Genet.*, 11 (4), 447–9, 1995.
- [108] G. R. Devi, A. T. De Souza, J. C. Byrd, R. L. Jirtle, R. G. MacDonald, *Cancer Res.*, 59 (17), 4314–9, 1999.
- [109] T. Ludwig, J. Eggenschwiler, P. Fisher, A. J. D'Ercole, M. L. Davenport, A. Efstratiadis, *Dev. Biol.*, 177 (2), 517–35, 1996.
- [110] P. De Meyts, *Diabetologia*, 37 Suppl 2, S135–48, 1994.
- [111] P. De Meyts, *Trends Biochem. Sci.*, 33 (8), 376–84, 2008.
- [112] L. Schäffer, *Eur. J. Biochem.*, 221 (3), 1127–32, 1994.
- [113] K. Sakano, T. Enjoh, F. Numata, H. Fujiwara, Y. Marumoto, N. Higashihashi, Y. Sato, J. F. Perdue, Y. Fujita-Yamaguchi, *J. Biol. Chem.*, 266 (31), 20626–35, 1991.
- [114] C. L. Alvino, K. A. McNeil, S. C. Ong, C. Delaine, G. W. Booker, J. C. Wallace, J. Whittaker, B. E. Forbes, *J. Biol. Chem.*, 284 (12), 7656–64, 2009.
- [115] Z.-L. Wan, K. Huang, B. Xu, S.-Q. Hu, S. Wang, Y.-C. Chu, P. G. Katsoyannis, M. A. Weiss, *Biochemistry*, 44 (13), 5000–16, 2005.
- [116] A. Denley, C. C. Wang, K. A. McNeil, M. J. E. Walenkamp, H. van Duyvenvoorde, J. M. Wit, J. C. Wallace, R. S. Norton, M. Karperien, B. E. Forbes, *Mol. Endocrinol.*, 19 (3), 711–21, 2005.
- [117] M. J. E. Walenkamp, M. Karperien, A. M. Pereira, Y. Hilhorst-Hofstee, J. van Doorn, J. W. Chen, S. Mohan, A. Denley, B. Forbes, H. A. van Duyvenvoorde, S. W. van Thiel, C. A. Sluimers, J. J. Bax, J. A. P. M. de Laat, M. B. Breuning, J. A. Romijn, J. M. Wit, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90 (5), 2855–64, 2005.
- [118] M. Jansson, M. Uhlen, B. Nilsson, *Biochemistry*, 36 (14), 4108–17, 1997.
- [119] L. Gauguin, C. Delaine, C. L. Alvino, K. A. McNeil, J. C. Wallace, B. E. Forbes, P. De Meyts, *J. Biol. Chem.*, 283 (30), 20821–9, 2008.

- [120] M. Jensen, Analysis of Structure-activity Relationships at the Insulin Molecule by Alanine-scanning Mutagenesis., University of Copenhagen, Denmark, 2000, citováno dle [114].
- [121] S. Benyoucef, K. H. Surinya, D. Hadaschik, K. Siddle, *Biochem. J.*, 403 (3), 603–13, 2007.
- [122] R. Slaaby, L. Schäffer, I. Lautrup-Larsen, A. S. Andersen, A. C. Shaw, I. S. Mathiasen, J. Brandt, *J. Biol. Chem.*, 281 (36), 25869–74, 2006.
- [123] C. Kristensen, F. C. Wiberg, A. S. Andersen, *J. Biol. Chem.*, 274 (52), 37351–6, 1999.
- [124] C. Ward, M. Lawrence, V. Streltsov, T. Garrett, N. McKern, M. Z. Lou, G. Lovrecz, T. Adams, *Acta Physiol. (Oxf)*, 192 (1), 3–9, 2008.
- [125] C. L. Alvino, S. C. Ong, K. A. McNeil, C. Delaine, G. W. Booker, J. C. Wallace, B. E. Forbes, *PLoS One*, 6 (11), e27488, 2011.
- [126] B. A. Magee, G. K. Shooter, J. C. Wallace, G. L. Francis, *Biochemistry*, 38 (48), 15863–70, 1999.
- [127] T. Glendorf, A. R. Sørensen, E. Nishimura, I. Pettersson, T. Kjeldsen, *Biochemistry*, 47 (16), 4743–51, 2008.
- [128] P. Kurtzhals, L. Schäffer, A. Sørensen, C. Kristensen, I. Jonassen, C. Schmid, T. Trüb, *Diabetes*, 49 (6), 999–1005, 2000.
- [129] G. P. Schwartz, G. T. Burke, P. G. Katsoyannis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84 (18), 6408–11, 1987.
- [130] H. Rajapaksha, C. L. Alvino, P. McCarthy, B. E. Forbes, *Growth Horm. IGF Res.*, 22 (5), 158–66, 2012.
- [131] M. Párrizas, A. R. Saltiel, D. LeRoith, *J. Biol. Chem.*, 272 (1), 154–61, 1997.
- [132] G. Kulik, A. Klippel, M. J. Weber, *Mol. Cell. Biol.*, 17 (3), 1595–606, 1997.
- [133] L. M. Chuang, S. F. Hausdorff, M. G. Myers Jr, M. F. White, M. J. Birnbaum, C. R. Kahn, *J. Biol. Chem.*, 269 (44), 27645–9, 1994.
- [134] M. F. White, C. R. Kahn, *J. Biol. Chem.*, 269 (1), 1–4, 1994.
- [135] J. M. Kyriakis, H. App, X. F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp, J. Avruch, *Nature*, 358 (6385), 417–21, 1992.
- [136] G. Milazzo, L. Sciacca, V. Papa, I. D. Goldfine, R. Vigneri, *Mol. Carcinog.*, 18 (1), 19–25, 1997.
- [137] L. Berti, M. Kellerer, B. Bossenmaier, E. Seffer, G. Seipke, H. U. Häring, *Horm. Metab. Res.*, 30 (3), 123–9, 1998.
- [138] V. Vella, G. Pandini, L. Sciacca, R. Mineo, R. Vigneri, V. Pezzino, A. Belfiore, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87 (1), 245–54, 2002.
- [139] L. Sciacca, A. Costantino, G. Pandini, R. Mineo, F. Frasca, P. Scalia, P. Sbraccia, I. D. Goldfine, R. Vigneri, A. Belfiore, *Oncogene*, 18 (15), 2471–9, 1999.
- [140] H.-B. Shan, R. Zhang, Y. Li, G.-L. Xu, G.-Y. Luo, X.-Y. Gao, H.-L. Yang, *Technol. Cancer Res. Treat.*, 10 (4), 381–9, 2011.
- [141] R. M. Tamimi, G. A. Colditz, Y. Wang, L. C. Collins, R. Hu, B. Rosner, H. Y. Irie, J. L. Connolly, S. J. Schnitt, *Breast Cancer Res. Treat.*, 128 (1), 243–50, 2011.
- [142] G. Pandini, M. Genua, F. Frasca, R. Vigneri, A. Belfiore, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1155, 263–7, 2009.
- [143] J. A. Johnson, E. A. M. Gale, *Diabetes*, 59 (5), 1129–31, 2010.
- [144] S. J. Pocock, L. Smeeth, *Lancet*, 374 (9689), 511–3, 2009.
- [145] U. K. Laemmli, *Nature*, 227 (5259), 680–5, 1970.
- [146] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76 (9), 4350–4, 1979.
- [147] K. Křížková, Příprava a charakterizace selektivních analogů insulínu a IGF-II pro různé isoformy insulinového receptoru, Univerzita Karlova v Praze, 2014.

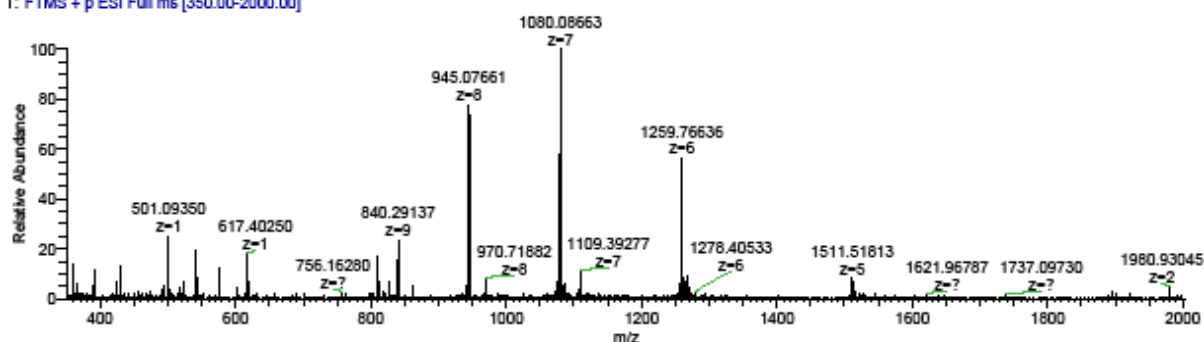
- [148] A. Morcavallo, M. Genua, A. Palumbo, E. Kletvikova, J. Jiracek, A. M. Brzozowski, R. V Iozzo, A. Belfiore, A. Morrione, *J. Biol. Chem.*, 287 (14), 11422–36, 2012.
- [149] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, M. Rance, N. J. Skegton, *Protein NMR spectroscopy*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, 2007.
- [150] S. Yao, J. J. Babon, R. S. Norton, *Biophys. Chem.*, 136 (2)–(3), 145–51, 2008.
- [151] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.*, 189 (1), 113–30, 1986.
- [152] H. J. Rhee, Y. I. Lee, K. H. Yang, *J. Biotechnol.*, 13 (4), 293–304, 1990.
- [153] Z. Upton, G. L. Francis, K. Kita, J. C. Wallace, F. J. Ballard, *J. Mol. Endocrinol.*, 14 (1), 79–90, 1995.
- [154] R. King, J. R. E. Wells, P. Krieg, M. Snoswell, J. Brazier, J. C. Bagley, J. C. Wallace, F. J. Ballard, M. Ross, G. L. Francis, *J. Mol. Endocrinol.*, 8 (1), 29–41, 1992.
- [155] U. Rinas, L. B. Tsai, D. Lyons, G. M. Fox, G. Stearns, J. Fieschko, D. Fenton, J. E. Bailey, *Biotechnology (N. Y.)*, 10 (4), 435–440, 1992.
- [156] D. L. Wilkinson, R. G. Harrison, *Biotechnology (N. Y.)*, 9 (5), 443–8, 1991.
- [157] C. Williams, D. Rezgui, S. N. Prince, O. J. Zaccaro, E. J. Foulstone, B. E. Forbes, R. S. Norton, J. Crosby, A. B. Hassan, M. P. Crump, *Structure*, 15 (9), 1065–78, 2007.
- [158] V. De Marco, G. Stier, S. Blandin, A. de Marco, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322 (3), 766–71, 2004.
- [159] G. D. Davis, C. Elisee, D. M. Newham, R. G. Harrison, *Biotechnol. Bioeng.*, 65 (4), 382–8, 1999.
- [160] *The Recombinant Protein Handbook: Protein Amplification and Simple Purification*, Amersham Pharmacia Biotech, 2000.
- [161] J. A. Miller, L. O. Narhi, Q. X. Hua, R. Rosenfeld, T. Arakawa, M. Rohde, S. Prestrelski, S. Lauren, K. S. Stoney, L. Tsai, *Biochemistry*, 32 (19), 5203–13, 1993.
- [162] A. Sato, S. Koyama, H. Yamada, S. Suzuki, K. Tamura, M. Kobayashi, M. Niwa, T. Yasuda, Y. Kyogoku, Y. Kobayashi, *J. Pept. Res.*, 56 (4), 218–30, 2000.
- [163] J. García de la Torre, M. L. Huertas, B. Carrasco, *J. Magn. Reson.*, 147 (1), 138–46, 2000.
- [164] A. Ortega, D. Amorós, J. García de la Torre, *Biophys. J.*, 101 (4), 892–8, 2011.
- [165] P. Zhou, G. Wagner, *J. Biomol. NMR*, 46 (1), 23–31, 2010.
- [166] A. M. Gronenborn, D. R. Filpula, N. Z. Essig, A. Achari, M. Whitlow, P. T. Wingfield, G. M. Clore, *Science*, 253 (5020), 657–61, 1991.
- [167] Q. Hua, M. A. Weiss, *Biochemistry*, 30 (22), 5505–15, 1991.

Přílohy

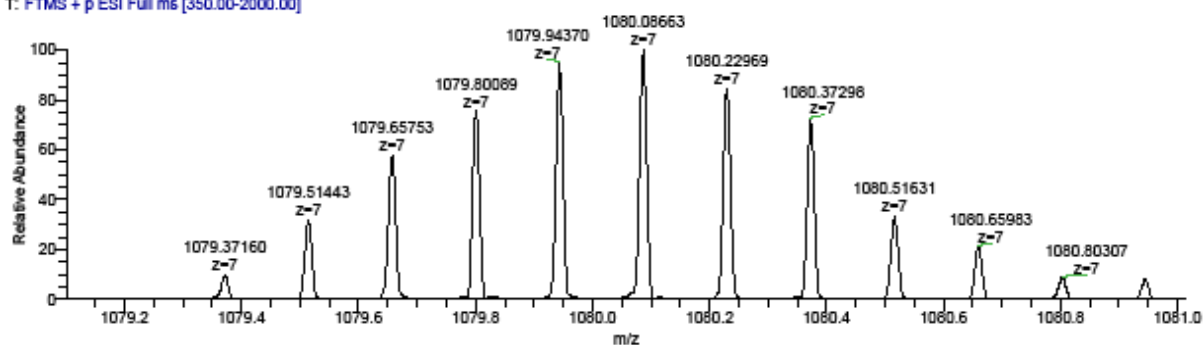


Příloha 1: Chromatografický záznam RP-HPLC preparace Gly⁻¹Asn²⁹-IGF-II

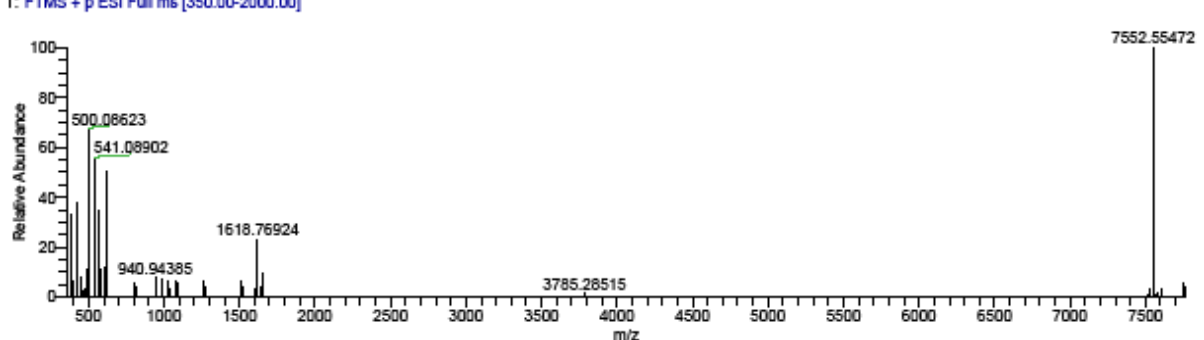
Krizkova, p1188 240114 2 #49-50 RT: 1.40-1.43 AV: 2 NL: 2.09E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



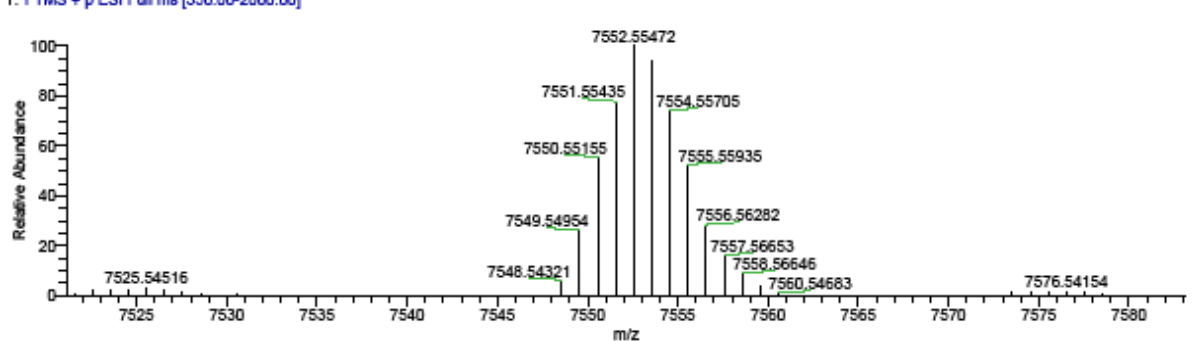
Krizkova, p1188 240114 2 #49-50 RT: 1.40-1.43 AV: 2 NL: 2.09E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



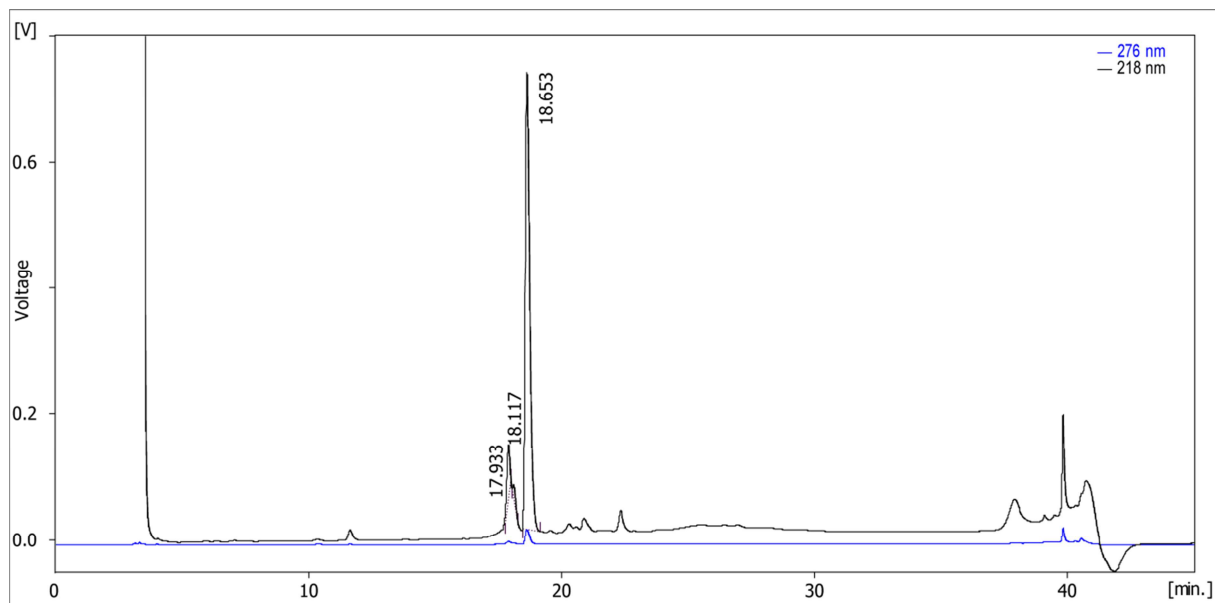
Krizkova, p1188 240114 2_XT_00001_M_140213131631 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 7.51E4
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Krizkova, p1188 240114 2_XT_00001_M_140213131631 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 7.51E4
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]

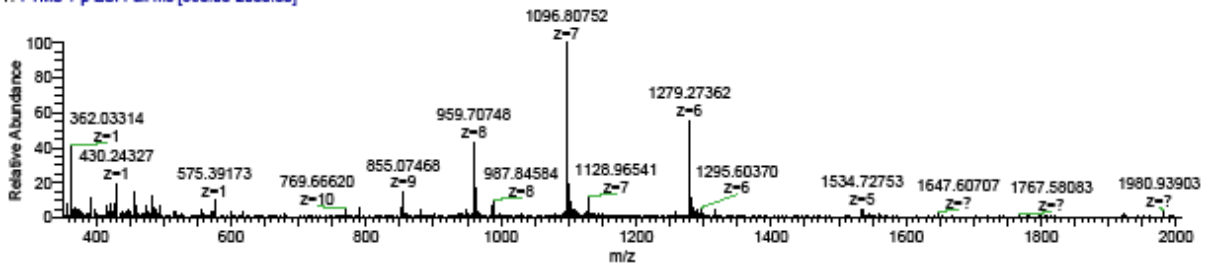


Příloha 2: Hmotnostní spektra preparovaného Gly⁻¹Asn²⁹-IGF-II

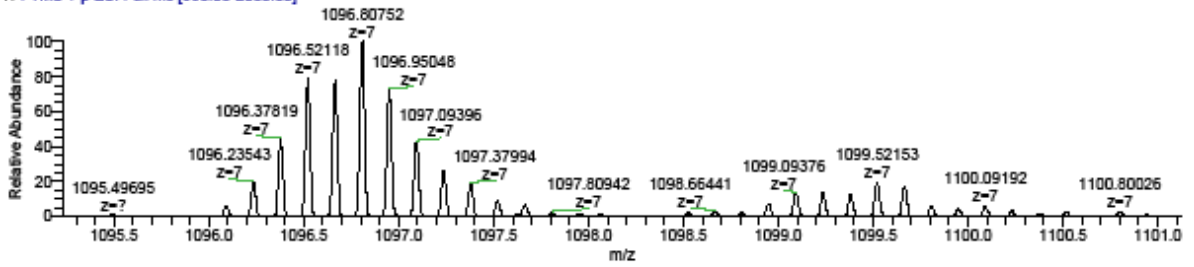


Příloha 3: Chromatografický záznam RP-HPLC preparace Gly⁻¹-IGF-II ins: Gly-Ser za Arg³⁴

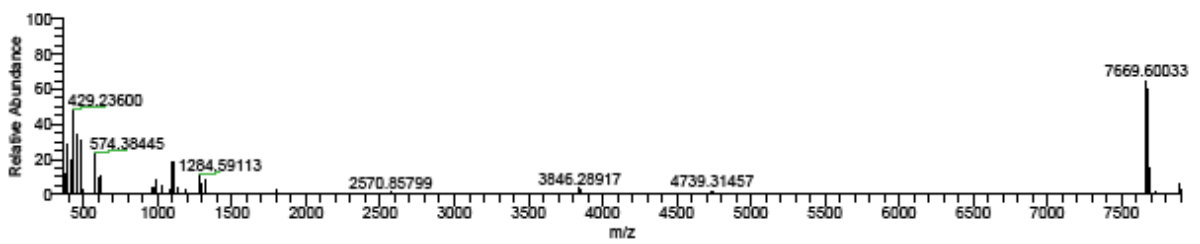
Krizkova, RK-2 14-03-10 3 #61-62 RT: 0.95-0.97 AV: 2 NL: 2.52E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



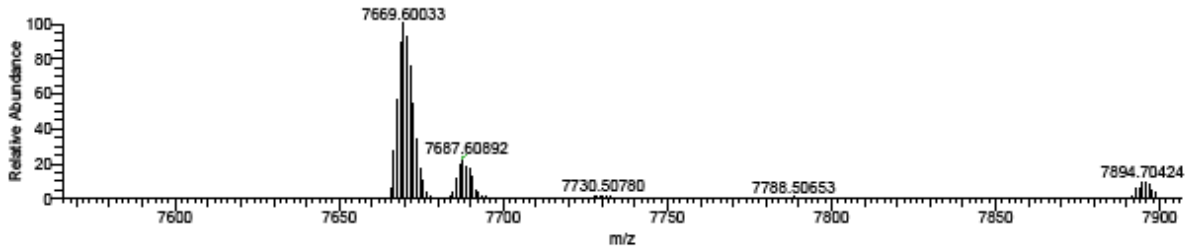
Krizkova, RK-2 14-03-10 3 #61-62 RT: 0.95-0.97 AV: 2 NL: 2.52E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



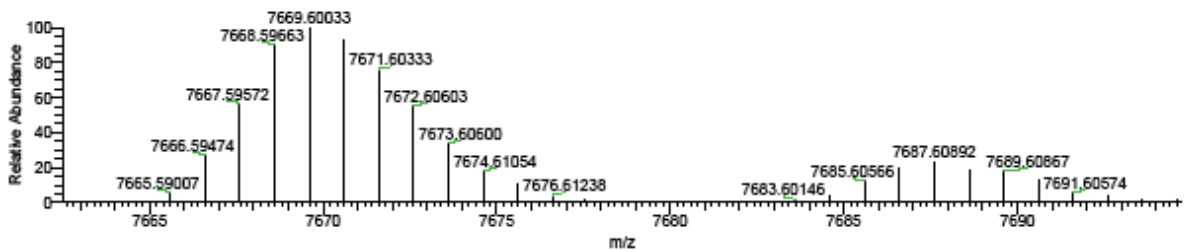
Krizkova, RK-2 14-03-10 3 XT_00001 M_140317165444 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 1.00E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



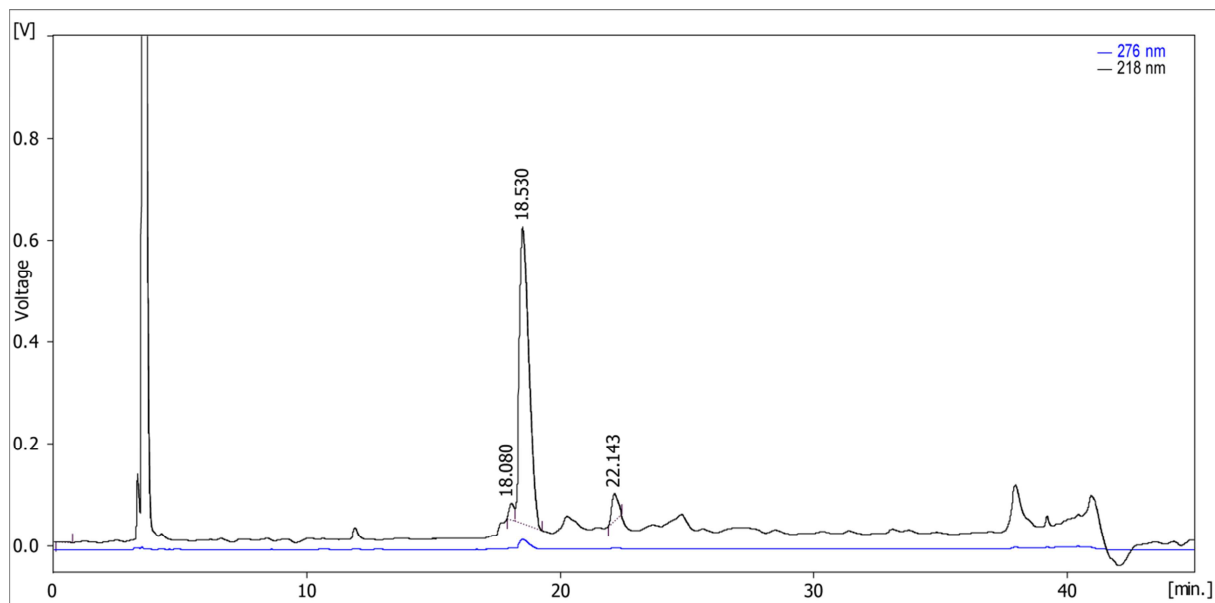
Krizkova, RK-2 14-03-10 3 XT_00001 M_140317165444 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 6.45E4
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Krizkova, RK-2 14-03-10 3 XT_00001 M_140317165444 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 6.45E4
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]

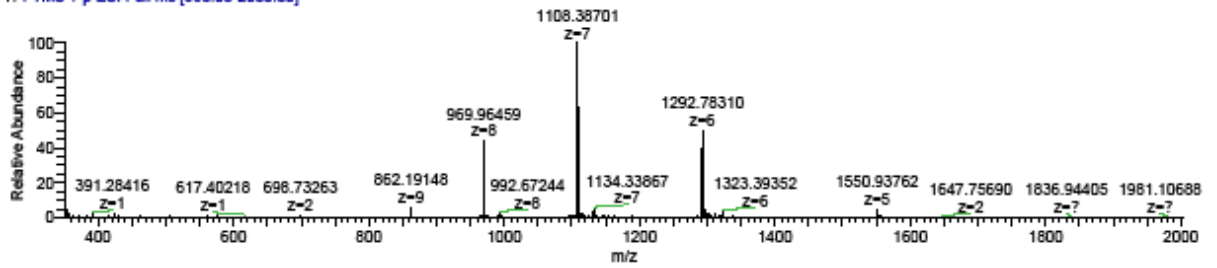


Příloha 4: Hmotnostní spektra preparovaného Gly⁻¹-IGF-II ins: Gly-Ser za Arg³⁴

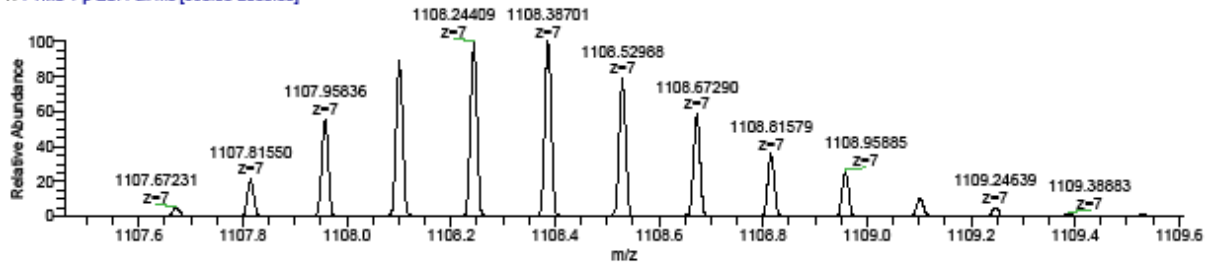


Příloha 5: Chromatografický záznam RP-HPLC preparace Gly⁻¹-IGF-II ins: Pro-Gln za Ser³⁹

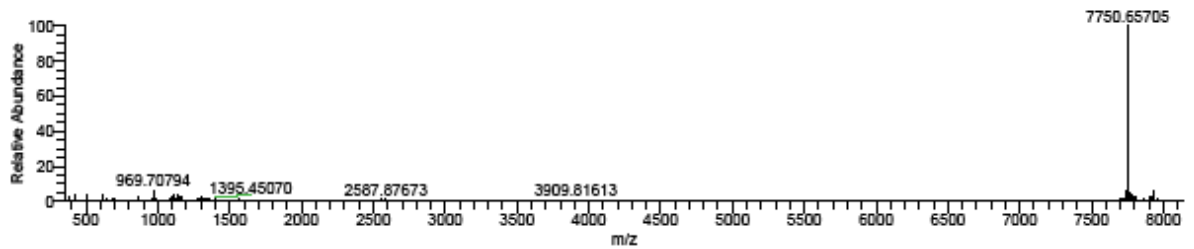
Krizkova, RK-3-14-02-20-2 #38-45 RT: 1.08-1.28 AV: 6 NL: 8.17E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



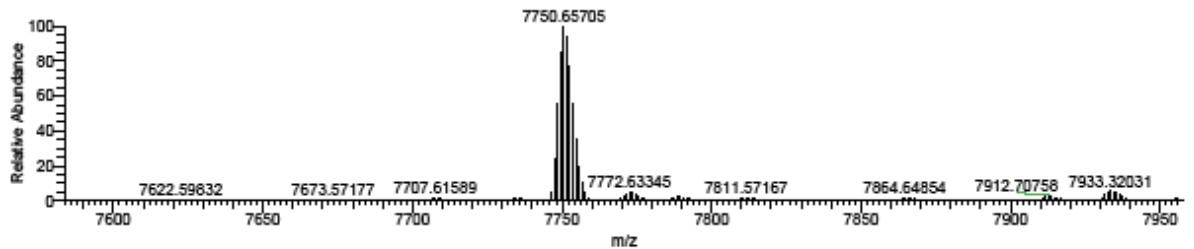
Krizkova, RK-3-14-02-20-2 #38-45 RT: 1.08-1.28 AV: 6 NL: 8.17E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



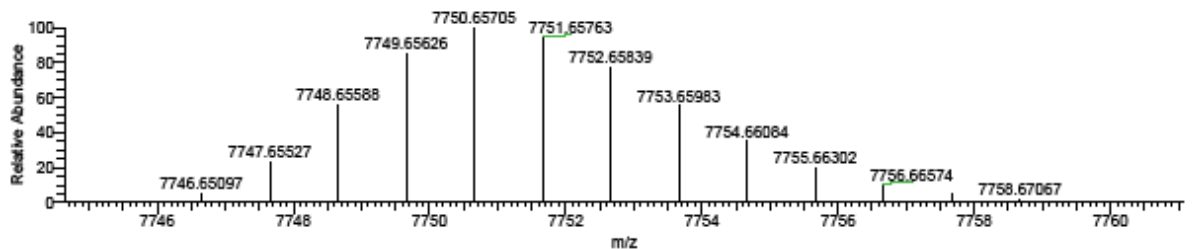
Krizkova, RK-3-14-02-20-2 XT 00001 M #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 2.39E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



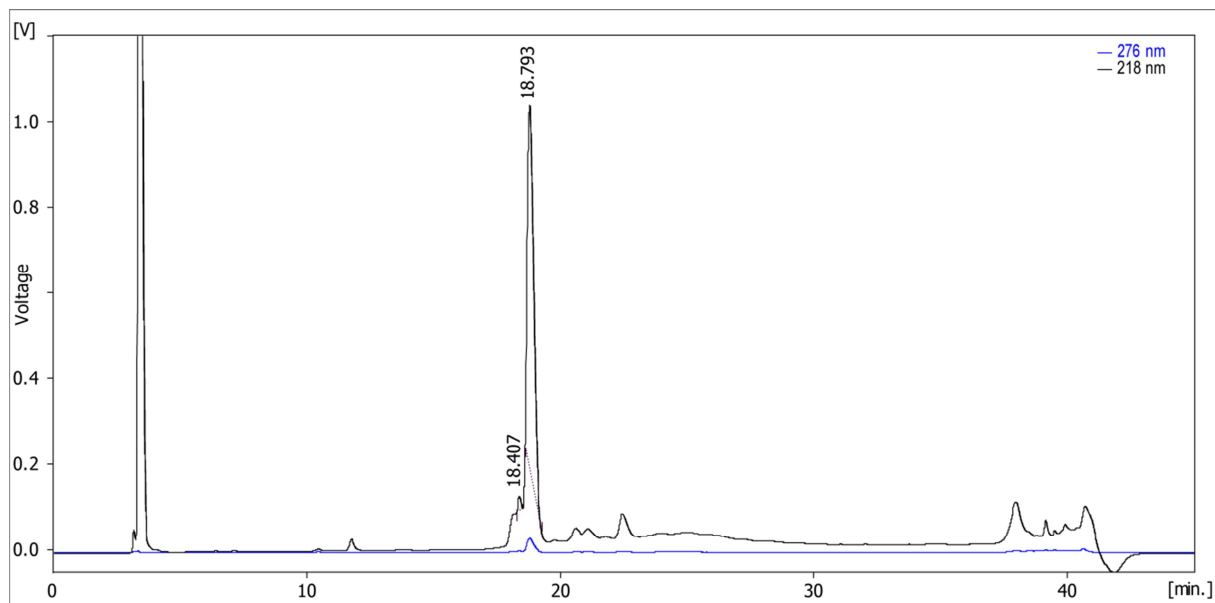
Krizkova, RK-3-14-02-20-2 XT 00001 M #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 2.39E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Krizkova, RK-3-14-02-20-2 XT 00001 M #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 2.39E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Příloha 6: Hmotnostní spektra preparovaného Gly⁻¹-IGF-II ins: Pro-Gln za Ser³⁹

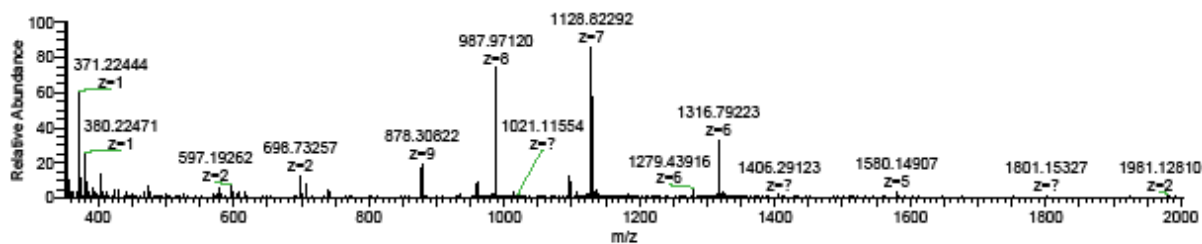


Příloha 7: Chromatografický záznam RP-HPLC preparace Gly⁻¹-IGF-II ins: Gly-Ser za Arg³⁴, Pro-Gln za Ser³⁹

ESI+

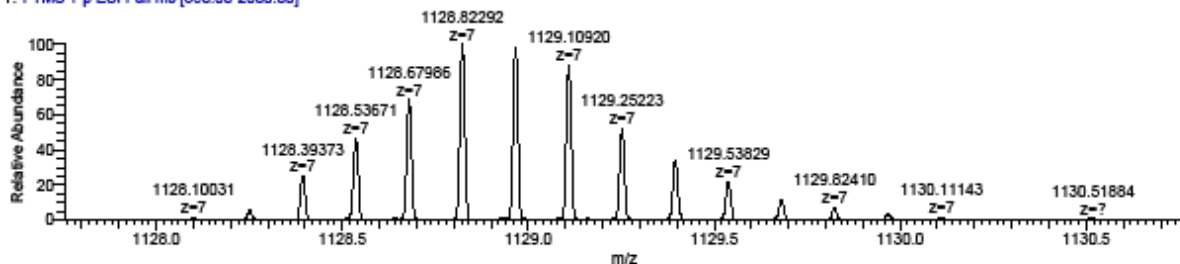
Krizkova, RK-4-14-02-27-02 #130-133 RT: 3.71-3.80 AV: 4 NL: 2.07E5

T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



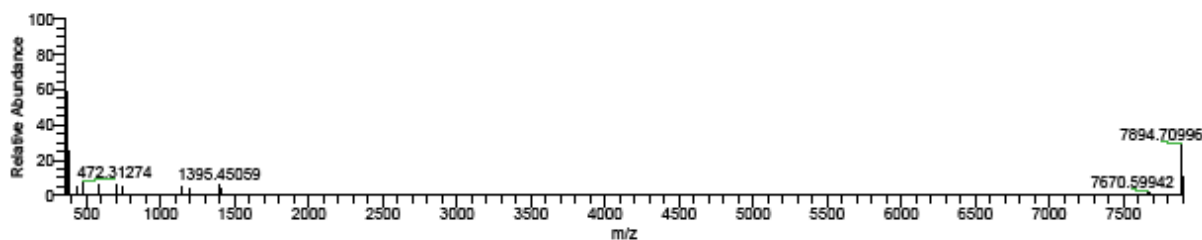
Krizkova, RK-4-14-02-27-02 #130-133 RT: 3.71-3.80 AV: 4 NL: 1.78E5

T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



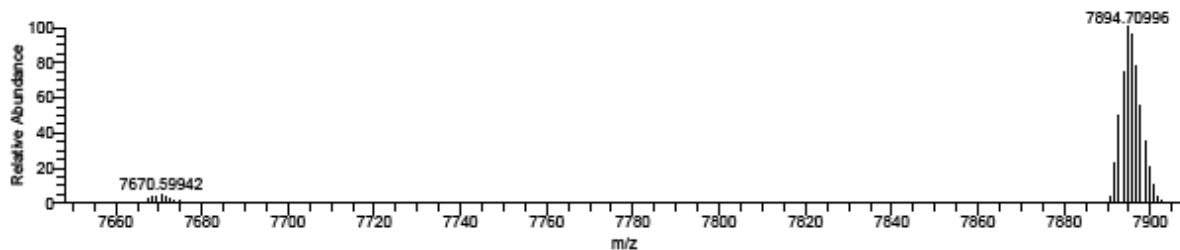
Krizkova, RK-4-14-02-27-02 XT 00001 M_140326174556 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 2.06E5

T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



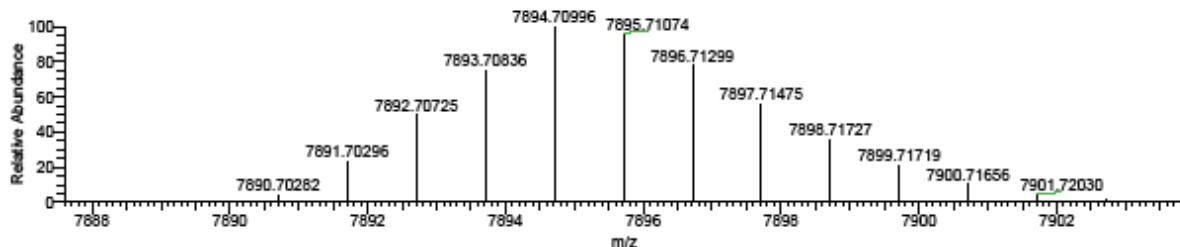
Krizkova, RK-4-14-02-27-02 XT 00001 M_140326174556 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 5.86E4

T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]

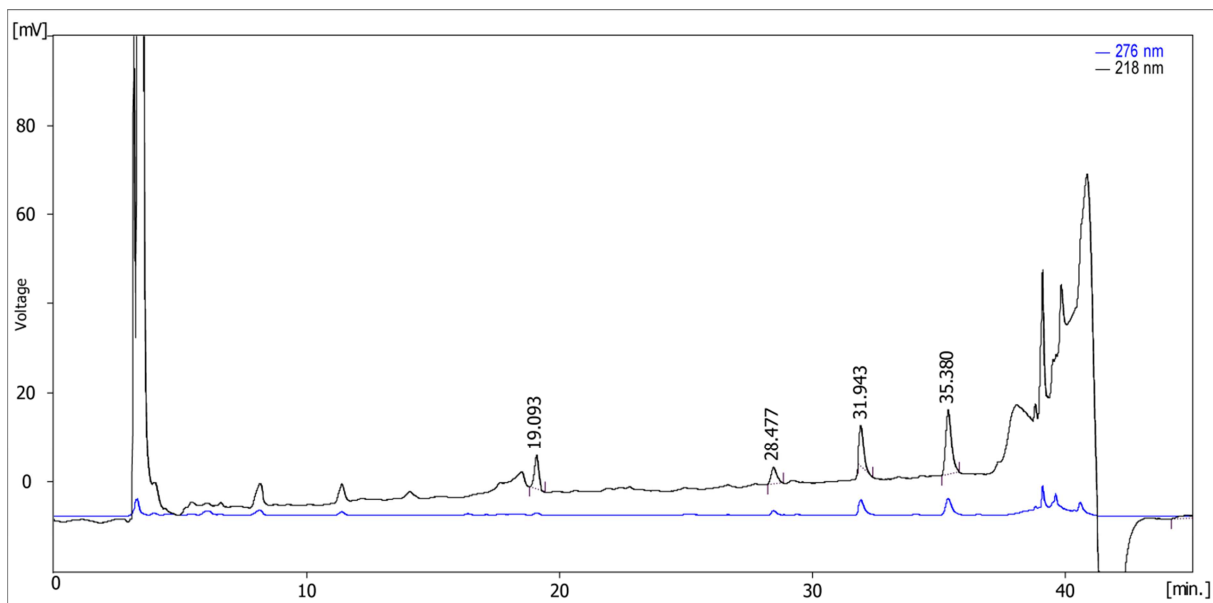


Krizkova, RK-4-14-02-27-02 XT 00001 M_140326174556 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 5.86E4

T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Příloha 8: Hmotnostní spektra preparovaného Gly⁻¹-IGF-II ins: Gly-Ser za Arg³⁴, Pro-Gln za Ser³⁹



Příloha 9: Chromatografický záznam RP-HPLC preparace (GlyAlaMet)¹-IGF-II

