

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Hanková

Příprava analogů insulínu pro studium interakce
s receptory insulínu

Preparation of insulin analogs for the study
of interactions with insulin receptors

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jiří Jiráček, CSc.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....

Podpis:

Poděkování

Především bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu a pochopení při tvorbě této bakalářské práce. Děkuji také RNDr. Lence Žákové, PhD. za konzultace, trpělivost a vstřícné jednání.

Poděkování patří i Ing. Květoslavě Kertisové z vědecko-servisní skupiny Hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala celému vědeckému týmu RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za veškerou pomoc a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také své rodině a svým přátelům, zvláště pak Alče a Terce, za mimořádnou podporu při studiu.

Abstrakt

Insulin jako jeden z důležitých hormonů lidského organismu se podílí na řadě metabolických procesů. Jednou z funkcí insulínu je pak regulace hladiny glukosy v krvi a jejího vstupu do tkání, ale i stimulace růstu buněk. Insulin má velmi podobnou primární i terciální strukturu s růstovými faktory IGF-1 a IGF-2, jejichž primární funkcí je regulace růstových procesů organismu. Zprostředkování účinku těchto tří hormonů na buněčné úrovni je zajištěno díky jejich specifickým receptorům (mitogenní isoformě receptoru insulínu IR-A, metabolické isoformě IR-B a receptoru pro IGF-1), což může, díky podobnosti těchto receptorů i hormonů, vést ke křížovým interakcím mezi nimi. Poruchy tohoto systému mohou vést k závažným onemocněním. Nejrozšířenějším z těchto nemocí je diabetes mellitus, ale závažné jsou i poruchy růstu a rakovinné bujení. Vytvoření takového analogu insulínu, který bude selektivní pouze pro isoformu IR-B receptoru insulínu, by mohlo vést zejména k bezpečnější léčbě diabetu.

Tato práce se zaměřuje na lepší pochopení významu jednotlivých aminokyselin na daných pozicích v A-řetězci insulínu, u kterých je předpokládáno, že jsou součástí vazebného místa hormonu pro receptory. Tyto znalosti by mohly vést k následnému lepšímu porozumění významu těchto aminokyselin ve vazbě na receptory IR-A, IR-B a IGF-1R. Další snahou by následně bylo vytvoření takových analogů insulínu, které by měly zvýšenou vazebnou selektivitu vůči receptorům.

Byly připraveny čtyři nové analogy insulínu se záměnami v pozicích A10 (isoleucin za histidin a valin), A13 (leucin za valin) a A17 (kyselina glutamová za histidin), které jsou považovány za součást tzv. vazebného místa 2 insulínu. Další dva analogy, se záměnou v pozicích A12 (serin za histidin) a A17 (kyselina glutamová za kyselinu asparagovou), se připravit nepodařilo, protože vložené mutace měly zcela negativní vliv na schopnost řetězců insulínu skládat se do nativní konformace. Všechny analogy měly více či méně snížené vazebné afinity vůči oběma isoformám receptoru insulínu, což demonstruje citlivost vazebného místa 2 vůči modifikacím. Je zajímavé, že oba analogy s valinem v pozici A13 či A10 vykazovaly vzhledem k insulínu lidskému mírně zvýšenou vazebnou specifitu vůči isoformě A receptoru insulínu.

Klíčová slova: Insulin; receptor insulínu, isoforma receptoru; analog insulínu; vazebná afinita

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování	3
Abstrakt	4
Obsah	5
Seznam zkratk a symbolů	7
1 Úvod	9
2 Cíl práce:	11
3 Teoretická část.....	12
3.1 Insulin	12
3.2 Struktura insulínu.....	13
3.3 Insulinový receptor a jeho struktura	13
3.4 Isoformy receptoru insulínu.....	14
3.5 Interakce insulínu s jeho receptorem	15
3.6 Růstové faktory IGF-1 a IGF-2	18
4 Experimentální část	20
4.1 Použité chemikálie a biologický materiál	20
4.2 Přístroje.....	22
4.3 Metodika	23
4.3.1 Syntéza A-řetězců	23
4.3.1.1 Syntéza a štěpení A-řetězce insulínu	23
4.3.1.2 Konverze na S-sulfonáty	24

4.3.1.3 Gelová chromatografie	24
4.3.1.4 RP-HPLC.....	24
4.3.2 Rekombinace řetězců insulinu	24
4.3.2.1 Redukce a oxidace	25
4.3.2.3 Gelová chromatografie	26
4.3.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	26
4.3.3 Testování vazebné afinity analogů vůči IR-A, IR-B a IGF-1R.....	26
4.3.3.1 Testování vazebné afinity analogů vůči IR-A	27
4.3.3.2 Testování vazebné afinity analogů vůči IR-B a IGF-1R	28
5 Výsledky.....	30
5.1 Syntéza A-řetězců	30
5.2 Rekombinace řetězců insulinu	32
5.3 Testování vazebné afinity analogů vůči IR-A, IR-B a IGF-1R.....	38
6 Diskuze	43
7 Závěr.....	46

Seznam zkratek a symbolů

A – absorbance

ATP – adenosintrifosfát

BSA – hovězí sérový albumin

c – molární koncentrace

DIPEA – diisopropylethylamin

DMF - N,N-dimethylformamid

DODT – triethylenglykol dimerkaptan

DTT – dithiotreitol

ε – extenční koeficient

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

FBS – fetální hovězí sérum

GH – růstový hormon

GuaHCl – guanidínhydrochlorid

HAc – kyselina octová

HBTU – hexafluorofosfát

HEPES - 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonová kyselina

HI – lidský insulin

HOBt – N-hydroxybenzotriazol

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IGF – „Insulin-like growth factor“, tj. insulinu podobný růstový faktor

IGF-1 – IGF typu 1

IGF-1R –receptor pro IGF-1

IGF-2 – IGF typu 2

IR – insulinový receptor

IR-A – isoforma A insulinového receptoru

IR-B – isoforma B insulinového receptoru

K_d – disociační konstanta

l – délka kyvety

M_r – relativní molekulová hmotnost

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi

SEM – standardní chyba průměru

TFA – kyselina trifluoroctová

TIS – triisopropylsilan

Tris – tris-(hydroxymethyl)-aminoethan

V_t – celkový objem kolony

Dále jsou využívány třípísmenné či jednopísmenné zkratky L-aminokyselin podle doporučení IUPAC-IUB(1).

1 Úvod

Insulin, IGF-1 a IGF-2 jsou hormony vycházející z podobné primární struktury, které společně se svými receptory tvoří specifický biologický systém. Insulin je důležitým hormonem regulujícím mnoho procesů v lidském těle. Tyto procesy mají jednak metabolický charakter, ale insulin může stimulovat i růst buněk. Oproti tomu příbuzné růstové faktory IGF-1 a IGF-2 s obdobnou strukturou se podílejí převážně na řízení růstových procesů. IGF-1 se projevuje jak v prenatálním období, tak i v růstu a v dospělosti. IGF-2 je důležitý v postnatálním období a v dospělosti. Účinek systému těchto tří hormonů je zprostředkován na buněčné úrovni pomocí jejich povrchových specifických receptorů. Podobnost jejich struktur má za následek křížové reakce s receptory a tím i následný částečný překryv funkcí.

Všechny tři hormony, tzn. insulin, IGF-1 a IGF-2 se mohou s různými afinitami vázat na dva různé receptory insulinu (isoformy IR-A a IR-B) a na receptor pro IGF-1(2) (IGF-1R) a vyvolávat podobné, ale ne stejné efekty(3,4). Jakákoliv porucha v systému insulinu, IGF a jejich receptorů může vést k závažným onemocněním jako je diabetes či rakovinné bujení (2). Z tohoto důvodu je důležité pochopit, jakým způsobem se vážou tyto hormony a růstové faktory na receptory insulinu a receptor pro IGF-1. Taková znalost by mohla například vést k návrhu a přípravě analogů insulinu, které by se nevázaly na IGF-1 receptor a mohly by mít použití pro bezpečnější léčbu diabetu, nebo naopak k návrhu analogů IGF, které by se nevázaly na receptory insulinu a mohly by být použity k léčbě růstových onemocnění bez nebezpečí interference s metabolismem glukosy.

Tato studie je součástí komplexního plánu, kdy budeme paralelně a systematicky modifikovat aminokyseliny příslušných vazebných míst pro receptor v insulinu, IGF-1 i IGF-2 a určovat vazebné afinity analogů vůči isoformám IR-A a IR-B receptoru insulinu a receptoru pro IGF-1. Motivací celého projektu je lépe pochopit význam jednotlivých aminokyselin v hormonech pro vazbu na receptory a případně získat takové informace, které by mohly vést k návrhu analogů se zvýšenou vazebnou selektivitou vůči receptorům. Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány aminokyseliny insulinu GluA17, LeuA13, SerA12 a IleA10, které jsou ohledně své důležitosti pro specifitu insulinu poměrně málo prozkoumány(5) a jsou pravděpodobně součástí tzv. vazebného místa 2 insulinu (Obr. 4, str. 17)(5). Tyto aminokyseliny budou zaměněny za aminokyselinu histidin, která se svým charakterem výrazně odlišuje od aminokyselin přítomných

v těchto pozicích a měla či mohla by analogům udělit velmi odlišné vlastnosti. Zároveň budou aminokyseliny GluA17, LeuA13, SerA12 a IleA10 nahrazeny za aminokyseliny podobné, tzn. Glu za Asp, Leu, Ser za Thr a Ile za Val. Cílem zde není zcela negovat interakce původních aminokyselin, ale spíše jemněji modulovat vlastnosti jednotlivých analogů. Celkem by tak mohlo být připraveno až 8 analogů insulínu, což velmi pravděpodobně nebude v možnostech této bakalářské práce. Cílem je tedy připravit alespoň některé z plánovaných analogů v závislosti na časových možnostech a technických obtížích.

2 Cíl práce:

Podle časových a technických možností připravit některé z analogů insulínu s modifikacemi AspA17, HisA17, ValA13, HisA13, ThrA12, HisA12, ValA10 a HisA10 a určit vazebné vlastnosti těchto analogů vůči oběma isoformám insulinového receptoru a případně i receptoru pro IGF-1.

3 Teoretická část

3.1 Insulin

Insulin je polypeptidový hormon hrající důležitou roli v lidském těle. Řadí se mezi takzvané pankreatické hormony podle místa jeho vzniku. Konkrétně je produkován β -buňkami Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní. Hlavním úkolem insulinu je regulace hladiny glukosy v krvi a zajištění jejího vstupu do tkáně. Dále působí jako anabolický hormon tím, že reguluje tvorbu tuků, cukrů a bílkovin, v případě tuků a cukrů i jejich ukládání. Zároveň ale potlačuje i procesy opačného charakteru. Dalšími účinky insulinu je např. řízení metabolismu aminokyselin a lipidů (Tab. 1).

Tab. 1: Stručný přehled metabolických procesů ovlivňovaných insulinem.

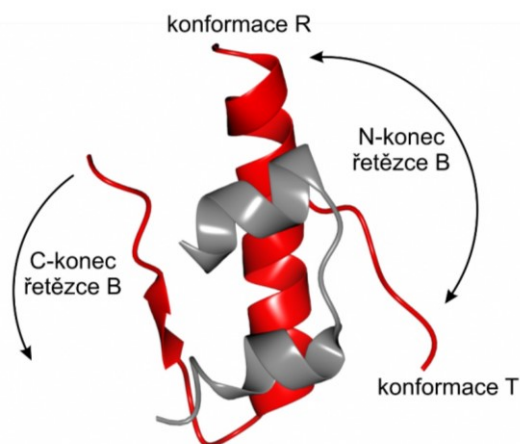
Aktivační efekt	Glykolýza, glykogensyntáza, lipogeneze, syntéza triacylglycerolů, syntéza proteinů, buněčná proliferace
Inhibiční efekt	Glukoneogeneze, glykogenolýza, lipolýza, štěpení triacylglycerolů

K sekreci insulinu dochází následkem zvýšené hladiny glukosy v plazmě, která zvýší koncentraci glukosy v okolí β -buněk pankreatu, a dále způsobí depolarizaci membrán za nahromadění ATP v β -buňkách, které reagují sekrecí insulinu ze zásobních váček do krevního oběhu. Nedostatečná produkce insulinu, resp. insulinová rezistence, se projevuje trvalým nárůstem koncentrace hladiny glukosy v krvi, která není dostatečně vstřebávána cílovými tkáněmi a následným onemocněním diabetem.

Rozlišují se dva druhy diabetu. Diabetes mellitus 1. typu je způsoben nedostatečnou produkcí hormonu v důsledku autoimunní destrukce β -buněk, zatímco diabetes mellitus 2. typu je důsledkem snížené sensitivity organismu vůči působení insulinu, který je produkován v normálním, ale často i ve zvýšeném množství. Molekulární mechanismus vzniku diabetu 2. typu je stále nejasný a je předmětem intenzivního výzkumu(6).

3.2 Struktura insulínu

Velmi důležitým předpokladem pro pochopení vlastností a působení proteinů a peptidů je znalost jejich struktury. Insulin se skládá ze dvou polypeptidových řetězců spojených dvěma disulfidovými můstky (Cys A7 – Cys B7; Cys A20 – Cys B19). A-řetězec obsahuje 21 aminokyselin. Je propojen mezi A6 a A11 třetím intrachainárním disulfidickým můstkem a je tvořen 2 α -helixy spojenými β -ohybem (Obr. 1, šedě). B-řetězec obsahuje 30 aminokyselin. V jeho centrální části je jeden hlavní α -helix, C-konec tvoří β -vlákno a N-konec může být jednak v neuspořádané konformaci T nebo helikální konformaci R (Obr. 1, červeně)(5). Předpokládá se pohyb obou konců B-řetězce při interakci s receptorem(7).

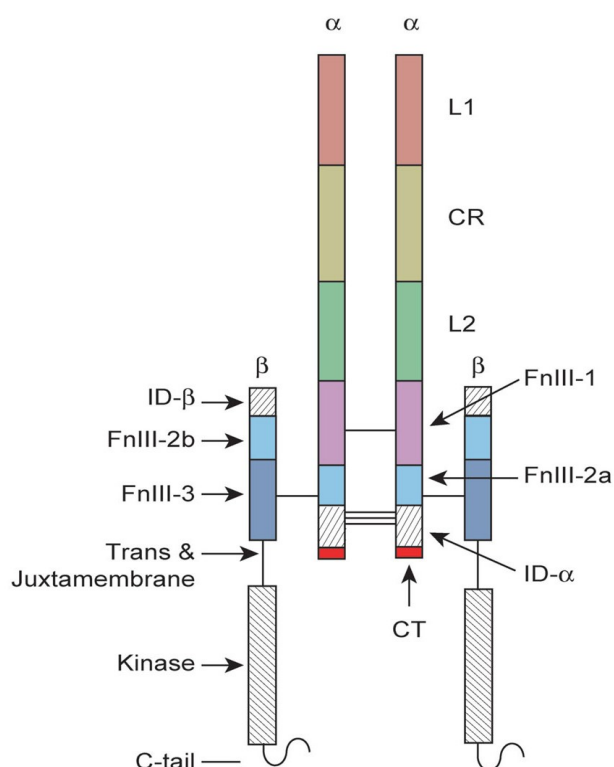


Obr. 1: Terciární struktura lidského insulínu. A-řetězec je zobrazen šedě a B-řetězec červeně. Jsou vyznačeny i obě alternativní konformace N konce řetězce B. Šipkou je i naznačen odklon konce C řetězce B od centrální části molekuly, ke kterému dochází při interakci s receptorem insulínu. Disulfidické můstky insulínu nejsou na obrázku vyznačeny.

3.3 Insulinový receptor a jeho struktura

Insulinový receptor (IR), stejně jako receptor pro IGF-1, se řadí mezi transmembránové alosterické glykoproteiny s enzymatickou aktivitou. Spadají do skupiny receptorů tyrosinkináz(8). Insulinový receptor též patří mezi takzvané α -helix receptory, které procházejí skrze membránu pouze prostřednictvím jednoho α -helixu

(v jedné podjednotce). Strukturou se jedná o tetramer tvořený dvěma α a dvěma β podjednotkami, jež propojují disulfidické můstky. Jedná se tedy vlastně o dimer dvou dimerů. Podjednotky α jsou pouze extracelulární a důležité pro vazbu insulínu. Podjednotky β , které směřují dovnitř buňky, jsou tvořeny transmembránovými helixy a obsahují aktivovatelné tyrosinkinázové domény umístěné na C-konci podjednotky β uvnitř buňky(9) (Obr. 2).



Obr. 2: Schématické zobrazení struktury receptoru insulínu a složení jeho podjednotek. Rozdílová sekvence obou isoform receptoru, tzv. α -CT peptid, je na obrázku vyznačen červeně (CT)(10).

3.4 Isoformy receptoru insulínu

Z hlediska modulární struktury je insulínový receptor kódován 22 exony a 21 introny. Následkem alternativního sestřihu krátkého exonu 11 dochází k vytvoření dvou isoform; isoforma A (IR-A, bez exonu 11) a isoforma B (IR-B, obsahující 11). Tyto rozdílné isoformy, strukturně se lišící absencí či přítomností pouhých 12 aminokyselin na C-konci podjednotek α (tzv. α -CT-peptid, Obr. 2), se liší hlavně svou afinitou vůči

růstovým faktorům IGF-1 a IGF-2. Ty sdílejí s insulinem společnou evoluci, podobnou strukturu a podobnou sekvenci. Všechny tři hormony, insulin, IGF-1 i IGF-2, se mohou s různými afinitami vázat na oba receptory insulinu a na receptor pro IGF-1 (IGF-1R) (Tab. 2). Těmito rozdílnými afinitami a dále dostupnými koncentracemi hormonů v tkáních (vedle ještě dalších faktorů) jsou regulovány biologické účinky hormonů zprostředkované příslušnými receptory.

Tab. 2: Vazebné afinity lidského insulinu, IGF-1 a IGF-2 vůči oběma isoformám receptoru insulinu a vůči IGF-1R(11).

Hormon	Vazebná afinita vůči IR-A (K_d , nM)	Vazebná afinita vůči IR-B (K_d , nM)	Vazebná afinita vůči IGF-1R (K_d , nM)
Insulin	0,2-0,6	0,6	292
IGF-1	24	224	0,2-0,3
IGF-2	2,9	36	2,3

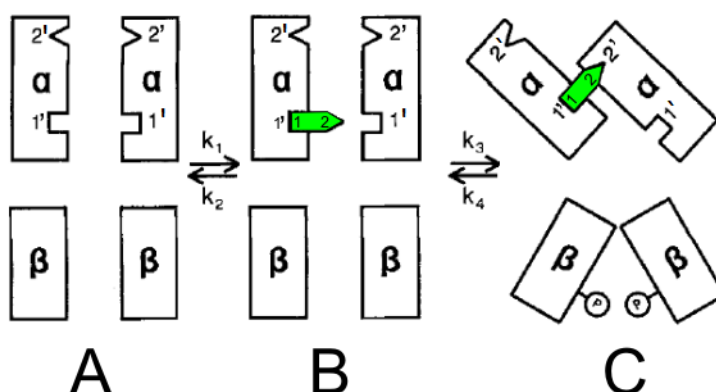
Zároveň existuje i rozdílné zastoupení isoform receptoru insulinu v tkáních. Isoforma B je zastoupena převážně v játrech, ale i svalech a tukové tkáni, což jsou tkáně, které mají insulinem zprostředkovaný vstup glukosy. Isoforma A se převážně nalézá v mozku, rakovinotvorné, lymfatické a fetální tkáni, které nemají insulinem zprostředkovaný vstup glukosy. Z toho vychází předpoklad, že isoforma B reguluje spíše metabolické procesy insulinu a isoforma A reguluje spíše růstové efekty insulinu(12,13).

3.5 Interakce insulinu s jeho receptorem

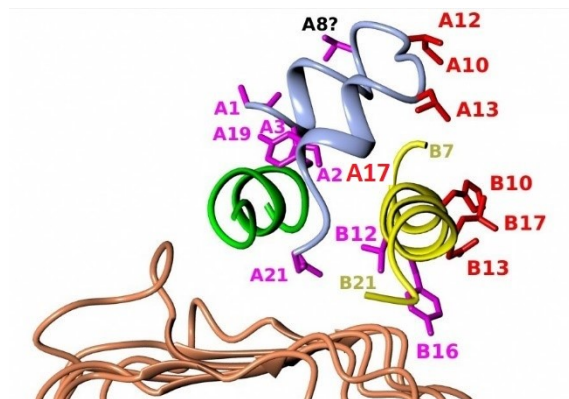
Interakce insulinu s jeho membránovým receptorem stále není přesně prostudována. Nicméně se předpokládá, že insulin se váže na obě extracelulární podjednotky α zároveň a to tak, že mezi insulinem a jeho receptorem dochází ke křížové interakci přes dvě vazebná místa receptoru 1' a 2', z nich každé je umístěné na jiné z receptorových α -podjednotek (obr. 3A, str. 16). Tato vazebná místa receptoru interagují s ekvivalentními vazebnými místy 1 a 2 v molekule insulinu (1' s 1 a 2' s 2)(10) (obr. 3B, str. 16). Tento způsob vazby způsobuje vysokou afinitu vazby insulin-receptor a rovněž konformační změnu v receptoru, která spouští aktivitu tyrosin kinázy receptoru (obr. 3C, str. 16). Poté dojde k autofosforylaci receptoru na jednotlivých tyrosinových zbytcích

β podjednotek a postupnému převedení signálu na vnitrobuněčné proteiny jejich fosforylací a tím ke spuštění aktivační kaskády a efektů insulinu.

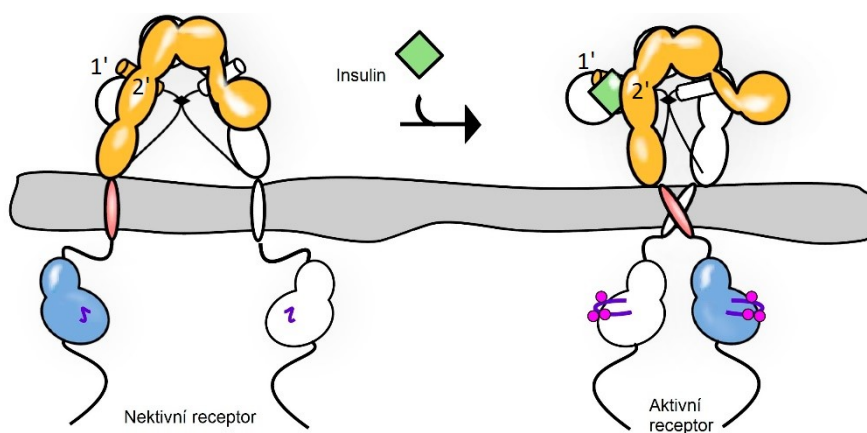
V roce 2013(14) a 2014(15) byly publikovány první komplexy insulinu s fragmentem jeho receptoru. Tyto struktury odhalily způsob, jakým spolu oba proteiny interagují prostřednictvím jejich vazebných míst 1 a 1'. Komplexy ale neodhalily způsob interakce vazebných míst 2 a 2', neboť se nepodařilo připravit komplexy s fibronektinovými doménami receptoru, které pravděpodobně tvoří vazebné místo 2' receptoru. Nicméně, na základě dříve publikovaných výsledků s analogy insulinu by vazebné místo 2 insulinu mělo být tvořeno aminokyselinami, IleA10, SerA12, LeuA13, GluA17, HisB10, GluB13 a LeuB17 a pravděpodobně i ThrA8 (Obr. 4, str. 17)(5). Vazebné místo 2 receptoru insulinu je zajímavé a důležité také proto, že po jeho interakci s vazebným místem 2 insulinu by mělo docházet ke strukturnímu pohybu receptoru a aktivaci jeho vnitrobuněčné tyrosinkinázy. Schematicky je model interakce receptoru s insulinem a aktivace receptoru rovněž zobrazena na obr. 5 (str. 17).



Obr. 3: Model znázorňující interakci insulinu se svým receptorem. (A) Samostatný insulinový receptor složený z dvou α -podjednotek a dvou β -podjednotek. (B) Počáteční vazba insulinu (zelený objekt): tzv. primární vazebné místo 1 insulinu se váže na vazebné místo 1' první podjednotky IR. (C) Insulin se svým vazebným místem 2 váže na vazebné místo 2' druhé podjednotky receptoru, to je předpokladem formování aktivního komplexu vykazujícího vysokou afinitu. Při této interakci musí dojít ke konformační změně receptoru a aktivaci (autofosforylaci) podjednotek β (16).



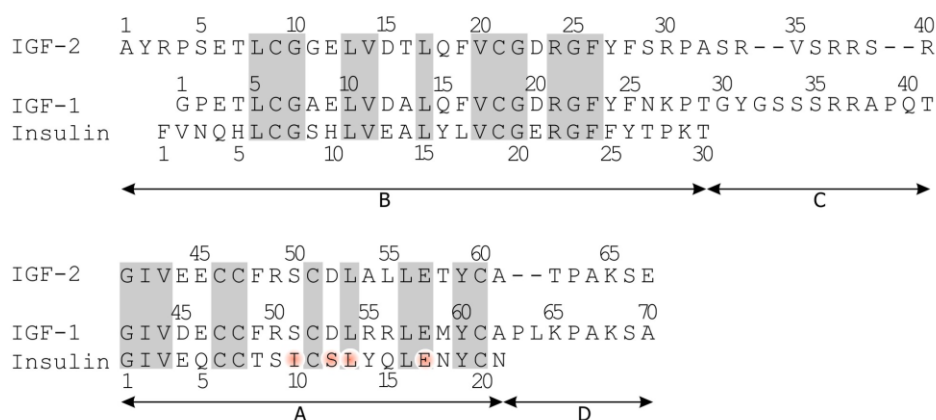
Obr. 4: Struktura insulínu při interakci s vazebným místem 1' receptoru insulínu tvořeným L1 doménou (hnědá) a α -CT peptidem (zelený). Řetězec A insulínu je zobrazen modře a řetězec B žlutě. Aminokyseliny patřící do vazebného místa 1 insulínu jsou vyznačeny fialově a některé z aminokyselin patřící do pravděpodobného vazebného místa 2 insulínu červeně. ThrA8 insulínu je označen černě, neboť není jisté, zda patří do vazebného místa 1 či 2.



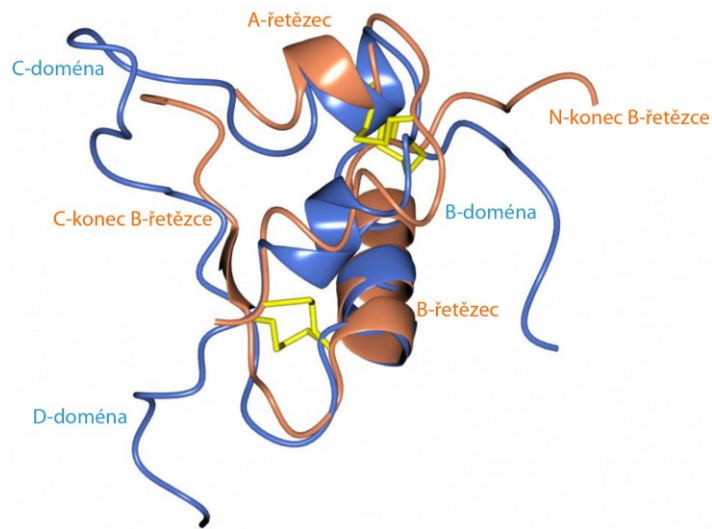
Obr. 5: Schematické zobrazení aktivace receptoru insulínu po interakci s insulínem. Upraveno podle(17). 1' a 2' označují předpokládané umístění vazebných míst 1' a 2' receptoru.

3.6 Růstové faktory IGF-1 a IGF-2

IGF-1 a IGF-2 („insulin-like growth factors“) jsou růstové faktory a hormony podobné insulinu(18). Název IGF vychází ze strukturní homologie s insulinem, oba IGF však vznikají jinde a mají i rozdílné, i když podobné funkce. Jejich produkce je vyvolávána v játrech růstovým hormonem (GH, „growth hormone“) kromě prenatálního období, kdy je produkce IGF na GH nezávislá. IGF-1 je důležitý pro vývoj plodu, pro růst organismu, vývoj kostí a svaloviny a hojení ran(19). Funkce IGF-2 jsou mnohem méně prozkoumány, předpokládají se ale důležité funkce v mozku(20). Jak IGF-1, tak IGF-2 se v plasmě váží na specifické vazebné proteiny. Ve formě navázané na tyto vazebné proteiny se nachází až 99% IGF, což vyvažuje jejich mnohonásobně vyšší koncentrace ve srovnání s koncentrací insulinu(21). Oba IGF se vážou na receptor IGF-1R s tyrosinkinázovou aktivitou, který je velmi podobný receptoru insulinu (Obr. 2, str. 14). Strukturně se IGF od insulinu částečně liší. Jsou složeny pouze z jediného řetězce obsahujícího 4 domény: A-, B-, C- a D-, z nichž A- a B-domény jsou obdobou řetězců A a B insulinu(22). Všechny tři hormony si zachovaly poměrně značnou homologii primárních sekvencí v doménách A- a B- (Obr. 6) a zároveň se navzájem podobají svými 3D strukturami (Obr. 7, str. 19).



Obr. 6: Porovnání primárních sekvencí lidského insulinu, IGF-1 a IGF-2. Homologní pozice a aminokyseliny jsou podbarveny šedě. Pozice v insulinu obměňované v této práci jsou podbarveny růžově.



Obr. 7: Porovnání 3-D struktur lidského insulinu (hnědý) a lidského IGF-2 (modrý). Disulfidické můstky jsou vyznačeny žlutě.

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a biologický materiál

acetonitril – Fischer Scientific, Leics, UK

buněčná linie IM-9 – ATCC, Manassas, USA

buněčná linie R⁺³⁹ - poskytnuty Dr. A. Belfiorem a R. Basergou, Univerzita Catanzaro, Itálie

buněčná linie R⁻/IR-B – poskytnuty Dr. A. Belfiorem a R. Basergou, Univerzita Catanzaro, Itálie

diethylether – Penta, Chrudim, ČR

diisopropylethylamin (DIPEA) - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

N,N-dimethylformamid (DMF) - Macron Fine Chemicals, Center Valley, USA

3,6-dioxa-1,8-octanedithiol (DODT) - Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japonsko

dithiotreitol (DTT) - Thermo Scientific, Rockford, USA

ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) - Lachema, Neratovice, ČR

Fmoc-chráněné aminokyseliny – Iris Biotech (Marktredwitz, Německo)

fenol – Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

fetální hovězí sérum - Gibco, USA

glukosa – Sigma, St. Louis, USA

glycin – Sigma, St. Louis, USA

guanidinhydrochlorid (GuaHCl) - Sigma, St. Louis, USA

2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU) - Novabiochem, Lucern, Švýcarsko

2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonová kyselina (HEPES) - Sigma, St. Louis, USA

N-hydroxybenzotriazol (HOBt) - Sigma, St. Louis, USA

hydrogenuhličitan amonný – Sigma, St. Louis, USA

hydroxid sodný – Penta, Chrudim, ČR

chlorid draselný – Sigma, St. Louis, USA

chlorid sodný – Penta, Chrudim, ČR

kyselina chlorovodíková – Penta, Chrudim, ČR

lidský IGF-1 značený radioizotopem ^{125}I , Perkin Elmer, Waltham, USA
lidský insulin značený radioizotopem ^{125}I , Perkin Elmer, Waltham, USA
kyselina octová 99 % (HAc) - Penta, Chrudim, ČR
L-glutamin – Gibco, USA
médiu DMEM – Gibco, USA
N-methyl-2-pyrrolidon (NMP) - Merck, Kenilworth, USA
octan sodný – Lachema, Neratovice, ČR
penicilin – Invitrogen, Kalifornie, USA
puromycin – Gibco, USA
Sephadex G10, Sephadex G 50 – Pharmacia, Uppsala, Švédsko
sířičitan sodný – Sigma, St. Louis, USA
síran hořečnatý – Fluka, Buchs, Švýcarsko
streptomycin – Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA
telecí sérum (BSA) - Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
tetrathionan sodný – Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
thioanisol – Fluka, Buchs, Švýcarsko
trifluoroctová kyselina (TFA) - Fluka, Buchs, Švýcarsko
tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris) - Sigma, St. Louis, USA
triisopropylsilan (TIS) - Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
trypsin – Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Wangova pryskyřice substituovaná Fmoc-Asn(Trt) - Wang resin, Novabiochem,
Lucern, Švýcarsko

Ostatní běžné chemikálie byly dodány firmami Merck-Sigma-Aldrich-Fluka (USA),
Invitrogen (USA) či Thermo Scientific (USA).

4.2 Přístroje

Automatizovaný syntetizátor peptidů ABI 433A (Applied Biosystems, USA)
Syntetizátor SpyderMark II (vyvíjený ve Vývojových dílnách ÚOCHB, druhý prototyp)
HPLC: čerpadlo Water 600, UV/VIS detektor Waters 2487 (Waters, USA)
Preparativní kolona pro HPLC Luna C18, 250x21,2 mm (Phenomenex, USA)
Analytická kolona pro HPLC Nucleosil 120-5-C18, 250x4 mm (Watrex, ČR)
Preparativní kolona pro HPLC Nucleosil 120-5-C18, 250x21 mm (Watrex, ČR)
Semipreparativní kolona pro HPLC Nucleosil 120-5-C18, 250x8 mm (Watrex, ČR)
Semipreparativní kolona pro HPLC Nucleodur C18 HTec, 250x10 mm (Macherey-Nagel, Německo)
Spektrofotometr Lambda 25 UV/VIS Spektrometr (Perkin Elmer, USA)
Lyofilizace FD3 Freeze Dryer (Heto Holten A/S, Dánsko)
Hmotnostní analyzátor LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA)
Přístroj na měření radioaktivity Wizard 1470 Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer, USA)
Centrifuga Trigon plus (Jouan, USA)
Centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Německo)
Peristaltická pumpa Minipuls 2 (Gilson, USA)
Peristaltická pumpa Minipuls 3 (Gilson, USA)

4.3 Metodika

4.3.1 Syntéza A-řetězců

4.3.1.1 Syntéza a štěpení A-řetězce insulinu

Řetězce lidského insulinu s mutacemi HisA17 a HisA12 byly syntetizovány na servisním pracovišti Syntéza peptidů ÚOCHB AV ČR na přístroji ABI433A v měřítku 100 μ mol na pryskyřici typu Wang (Merck) presubstituované s aminokyselinou Fmoc-Asn(Trt) s nízkou mírou substituce (LL, cca 0,3 mmol/g).

Řetězce lidského insulinu s mutacemi ValA13, HisA13, HisA12, ValA10 a HisA10 byly syntetizovány na přístroji SpyderMark II (vyvíjený ve Vývojových dílnách ÚOCHB, druhý prototyp) v měřítku 100 μ mol na stejné pryskyřici.

Syntéza byla provedena za pomoci činidel HBTU/HOBT (10 ekvivalent), DIPEA (15 ekvivalent) v N-methyl-pyrrolidonu jako rozpouštědla při laboratorní teplotě. Syntetický cyklus (45 min) byl pro každou aminokyselinu ještě jednou opakován za stejných podmínek. Chránící N-koncová skupina Fmoc byla v každém cyklu štěpena pomocí 20 % piperidinu v DMF (5 a 20 min).

Na pryskyřici připravené řetězce byly štěpeny za pomoci štěpící směsi (10 ml 91,5 % TFA, 0,25 ml H₂O, 0,25 ml thioanisol, 0,125 ml DODT, 0,25 g fenol, 0,05 ml TIS) a ponechány na pryskyřici za míchání při laboratorní teplotě 2 hod. Po uplynulé době byla směs přefiltrována přes fritu velikosti S3 do 300 ml ledového diethyletheru a proveden průplach pryskyřice 10 ml TFA do téhož etheru. Vytvořená sraženina peptidu v etheru byla přefiltrována přes fritu velikosti S4, sraženina propláchnuta 300 ml ledového etheru a vysušena. V některých případech byly peptidy štěpeny stejným způsobem, jak bylo popsáno výše, avšak štěpící směs (5 ml) byla po štěpení a odfiltrování z pryskyřice nalita do 45 ml ledového diethyletheru a centrifugována po dobu 11 minut při 8000 g při 4 °C, ether byl poté odstraněn a na sraženinu přidáno nových 45 ml studeného etheru. V mezičase byla pryskyřice propláchnuta 5 ml TFA a ta přidána k etheru na sraženině. Směs byla znova centrifugována a ether odstraněn. Propláchnutí sraženiny diethyletherem a centrifugace byly ještě jednou zopakovány. Sraženina peptidu byla krátce (cca 20 min) vysušena v exsikátoru za sníženého tlaku.

4.3.1.2 Konverze na S-sulfonáty

Suchá sraženina peptidu byla hned po vysušení rozpuštěna v 30 ml sulfitolyzační směsi (připraveno 50 ml: 0,1 M tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris), 0,25 M siřičitan sodný, 0,08 M tetrathionan sodný, 7 M guanidin hydrochlorid, pH 8,6) za účelem převedení volných -SH skupin na cysteinech na S-sulfonáty (S-SO₃H). Celá směs byla míchána 3 hod při laboratorní teplotě.

4.3.1.3 Gelová chromatografie

Po provedení sulfitolýzy bylo peptidový řetězec třeba odsolit. Proto byla směs po převedení na S-sulfonáty nanášena na kolonu Sephadexu G-10 o celkovém objemu 500 ml. Jako mobilní fáze byl použit 50 mM hydrogenuhličitan amonný. Chromatografie probíhala za laboratorní teploty a stálého tlaku. Průtok činil zhruba 0,7 ml/min (peristaltická pumpa Gilson Minipuls 2) a frakce byly zachytávány po cca 10 ml na automatickém sběrači. V jednotlivých frakcích byla po ukončení chromatografie změřena absorbance na UV/VIS spektrometru Lambda 25 při vlnové délce 276 nm. Frakce s řetězci byly spojeny a podrobeny lyofilizaci.

4.3.1.4 RP-HPLC

Následně byly lyofilizované vzorky ze sloučených frakcí rozpuštěny v 10 % kyselině octové a 80 % acetonitrilu v poměru 2:1 v koncentraci asi 10 mg/ml. Rozpuštěné vzorky byly purifikovány a čištěny na RP-HPLC na preparativní koloně Luna C18 či Nucleosil C18 za použití gradientu míchaném z mobilní fáze A (0,1 % TFA) a z mobilní fáze B (80 % acetonitril s 0,1 % TFA). Byl použit gradient následujícího složení (min/% (v/v) B): 0/10; 30/60; 31/100; 31,1/10 při průtoku 9 ml/min. Absorbance byla proměřována při vlnových délkách 276 nm a 218 nm. Jednotlivé frakce byly jímány manuálně a lyofilizovány. Identita řetězců byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie na servisním pracovišti ÚOCHB.

4.3.2 Rekombinace řetězců insulinu

Následovně byla provedena rekombinace purifikovaných A-řetězců s B-řetězcem vepřového. Při této metodě jsou propojeny oba řetězce insulinu A a B prostřednictvím

dvou disulfidických můstků a zároveň dochází k vytvoření třetího můstku na A-řetězci (23).

S-sulfonát řetězce B vepřového insulinu (od lidského se liší jen záměnou ThrB30 za AlaB30) byl již dříve připraven v laboratoři Dr. Jiráčka sulfitolýzou vepřového insulinu a následnou purifikací řetězců. Tato příprava nebyla součástí této práce.

4.3.2.1 Redukce a oxidace

V první části rekombinace dochází na řetězcích k redukci S-sulfonátů na thiolové skupiny. Následuje popis typického příkladu redukční fáze rekombinace řetězců insulinu.

Bylo odváženo okolo 30 mg S-sulfonátu A-řetězce a rozpuštěno v 2 ml odvzdušněného 0,1M Gly/NaOH pufru o pH 10,5. Část vzorku (cca 0,02 ml) byla 20x naředěna pufrům a byla změřena absorbance při 280 nm. Z ní byla zjištěna koncentrace vzorku dle vzorce $A = c * l * \epsilon$ za použití extinkčního koeficientu $3480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Dále bylo odváženo okolo 15 mg S-sulfonátu B-řetězce vepřového insulinu a rozpuštěno v 1 ml stejného pufru a vypočítána koncentrace roztoku podle stejného postupu jako u A-řetězce, ale za použití extinkčního koeficientu o hodnotě $3230 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Oba roztoky řetězců byly smíchány a bylo k nim přidáno takové množství 1 M roztoku DTT (aliquotovaný od firmy Pierce, katalogové číslo 20291) v pufru představující přesně 1,1 ekvivalentu celkového molárního množství S-SO₃H skupin obou řetězců v roztoku. Směs byla ponechána za míchání 1 hodinu při laboratorní teplotě v uzavřené nádobě.

V druhé části rekombinace dochází k zastavení redukce a následnému oxidativnímu vytvoření disulfidických můstků mezi cysteiny (CysA7-CysB7; CysA20-CysB19; CysA6-CysA11) insulinu. Následuje popis typického příkladu oxidativní fáze rekombinace řetězců insulinu.

Po hodině redukce bylo do roztoku obou řetězců insulinu přidáno 3 ml provzdušněného 0,1M Gly/NaOH pufru o pH 10,5. Reakční směs byla dále míchána po 3-4 dny při 4 °C za přístupu vzduchu. Po uplynulé době byla reakce zastavena přidáním 3 ml 100 % kyseliny octové.

4.3.2.3 Gelová chromatografie

Následná metodika byla provedena podle shodného postupu. Rekombinační směs byla aplikována na chromatografickou kolonu Sephadexu G-50 ($V_r = 500$ ml). Jako mobilní fáze byla použita 1 M kyselina octová, průtok kolonou činil 0,5 ml/min a chromatografie probíhala při laboratorní teplotě a stálém tlaku za použití peristaltické pumpy Gilson Minipuls 3. Frakce byly jímány po zhruba 6 ml.

U jednotlivých frakcí byly měřeny absorbance na spektrofotometru Lambda 25 při 276 nm. Frakce byly spojeny a lyofilizovány.

4.3.2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Následně byly lyofilizované vzorky ze sloučených frakcí rozpuštěny v 10 % kyselině octové s a 80 % acetonitrilu v poměru 2:1 v koncentraci asi 10 mg/ml. Rozpuštěné vzorky byly purifikovány a čištěny na semipreparativní RP-HPLC koloně Nucleosil C18 za použití gradientu míchaném z mobilní fáze A (0,1 % TFA, v/v) a z mobilní fáze B (80 % acetonitril s 0,1 % TFA, v/v) a následujícího složení (min/% (v/v) B): 0/10; 1/35, 21/45; 34/55; 36-37/90; 37.1/10 při průtoku 3 ml/min. Alternativně byla použita semipreparativní kolona Nucleodur C18 a gradient 0/10; 1/32; 21/42; 34/52; 36-37/90; 37.1/10. Absorbance byla proměřována při vlnových délkách 276 nm a 218 nm. Jednotlivé frakce byly jímány manuálně a lyofilizovány. Identita řetězců byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie.

4.3.3 Testování vazebné afinity analogů vůči IR-A, IR-B a IGF-1R

U připravených analogů insulínu byla testována afinita vůči oběma isoformám insulinového receptoru IR-A i IR-B, a i k IGF-1R. K vazebným testům vůči IR-A byla použita buněčná linie lidských lymfocytů IM-9 s vysokou mírou exprese isoformy A. K testování vazebné afinity vůči isoformě B receptoru insulínu (IR-B) a vůči IGF-1R byly použity myší embryonální fibroblasty s deletovaným genem pro myší IGF-1R a transfekované buď lidským genem pro expresi IR-B (označované jako R⁻ IR-B buňky), nebo lidským genem pro expresi IGF-1R (označované jako R⁺ buňky).

Z insulínu a připravených analogů byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 100 µg/ml v 0,1 % (v/v) kyselině octové. Koncentrace byly stanoveny

spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a s použitím extinkčního koeficientu $\epsilon_{280} = 5840 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Na všechny pokusy byl použit vazebný pufr následujícího složení: 100 mM HEPES, 100 mM chlorid sodný, 5 mM chlorid draselný, 1,3 mM síran hořečnatý, 1 mM EDTA, 10 mM glukosy, 15 mM octan sodný a 1 % (w/v) BSA, pH 7,6.

4.3.3.1 Testování vazebné afinity analogů vůči IR-A

Buněčná linie lidských lymfocytů IM-9 byla pěstována dle pokynů dodavatele ATCC (Manassas, USA; LGC Standards, Poland). Buňky byly pěstovány v inkubátoru při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % (v/v) obsahem CO₂ v mediu RPMI-1640 (10 % (w/w) fetální hovězí sérum, 100 U/ml penicilinu či streptomycinu a 2 mM Gln) a třikrát týdně „pasážovány“. Používané chemikálie byly zakoupené od společnosti Invitrogen (Carlsbad, Kalifornie, USA). V den testování byly vypěstované buňky spočítány v Bürkerově komůrce a zředěny na koncentraci 2 milióny buněk/ml.

Testování vazebné afinity probíhá jako kompetice mezi testovaným analogem a lidským insulinem radioaktivně značeným s ¹²⁵I na TyrA14 námi upravenou metodou dle De Meytse(12,24). Během testování je ve všech vzorcích zachováno konstantní množství buněk a radioaktivně značeného insulinu a postupně se zvyšuje koncentrace testované látky. V každém vzorku bylo 400 μl buněk o koncentraci 2 milióny/ml, ¹²⁵I-insulin v množství 20000 cpm (2200 Ci/mmol) a různé koncentrace testovaného analogu, přičemž celkový reakční objem byl 500 μl. Reakce byla inkubována po dobu 2,5 hod při 15 °C. Každých 30 min byly všechny vzorky promíchány.

Po skončení reakční doby byly ze všech vzorků vytvořeny duplikáty o objemu 200 μl. Následně bylo ke každému z vytvořených vzorků přidáno 200 μl vychlazeného vazebného pufru, čímž byla reakce zastavena. Vzorky byly centrifugovány (10 min, 15 000 g, 4 °C), poté byl odsát supernatant a změřena radioaktivita pelety pomocí γ-počítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, USA). Každá zkumavka byla měřena po dobu 10 min.

Získaná data byla analyzována v programu GraphPad Prism, 5.0 metodou nelineární regrese podle modelu vazby do jednoho vazebného místa (z anglického označení „one site fitting model“). Pro výpočet K_d analogu byla použita hodnota disociační konstanty K_d značeného insulinu 0,3 nM. Výsledná hodnota K_d analogu byla

vypočítána minimálně ze tří samostatných měření (tzn. vazebných křivek, tj. parciálních hodnot K_d).

4.3.3.2 Testování vazebné afinity analogů vůči IR-B a IGF-1R

Buněčné linie myších embryonálních fibroblastů transfekovaných lidským genem pro expresi IR-B (R-B) případně IGF-1R (R+) byly poskytnuty Dr. A. Belfiorem a R. Basergou a pěstovány dle jejich pokynů. Buňky byly pěstovány v inkubátoru při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % (v/v) obsahem CO₂ v médiu s vysokým obsahem glukosy (87,6 % (v/v) DMEM medium s obsahem glukosy 4,5 g/l, 10 % (w/w) FBS, 2 mM L-Gln, 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, 3 µg/ml puromycin) a třikrát týdně „pasážovány“. Dva, případně tři dny před testováním byly buňky nasazeny do 24-jamkových destiček v koncentraci 3000 respektive 1500 buněk na jamku. Před samotným pokusem bylo buňkám odebráno médium s FBS a nahrazeno čistým médiem kvůli zamezení vlivu peptidů a proteinů přítomných ve FBS.

Testování vazebné afinity probíhá stejně jako v prvním případě kompeticí mezi testovaným analogem a radioaktivně značeným lidským ¹²⁵I-insulinem (pro IR-B) případně lidským ¹²⁵I-IGF-I (pro IGF-1R) metodou dle Belfioreho(24). Během testování je ve všech vzorcích zachováno konstantní množství radioaktivně značeného insulinu či IGF-1 (50 000 cpm ¹²⁵I-insulinu o specifické aktivitě 2200 Ci/mmol pro stanovení vazebné afinity k IR-B nebo 45 000 cpm ¹²⁵I-IGF-I o specifické aktivitě 2700 Ci/mmol pro stanovení vazebné afinity k IGF-1R) a postupně se zvyšuje koncentrace testované látky. Počet buněk v jednotlivých vzorcích se pohyboval v rozmezí 24-26 000 u buněčné linie R⁻IR-B a 14-16 000 u buněčné linie R⁺.

Narostlé buňky byly 2krát omyty vazebným pufrům a do každé jamky byla pipetována reakční směs v pořadí: vazebný pufr, odpovídající koncentrace testovaného analogu a ¹²⁵I-insulin/¹²⁵I-IGF-I s aktivitou 50 000/45 000 cpm. Celkový reakční objem byl 250 µl. Reakce byla inkubována při 5 °C za stálého třepání po dobu 16 hod. Po ukončení inkubační doby byla reakční směs odsáta, buňky s navázanými analogy promyty vazebným pufrům a solubilizovány 0,1M NaOH. Roztok se solubilizovanými buňkami byl přenesen do zkumavek a byla změřena jeho radioaktivita pomocí γ-počítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, perkin Perkin Elmer, Wellesley, USA). Každý vzorek byl měřen po dobu 60 s.

Získaná data byla analyzována a vyhodnocena v programu GraphPad Prism 5.0 metodou nelineární regrese podle modelu vazby do jednoho vazebného místa (z anglického označení „one site fitting model“). Pro výpočet K_d analogu byla použita hodnota disociační konstanty K_d ^{125}I -značeného insulinu 0,3 nM a hodnota 0,2 nM pro ^{125}I -značený IGF-1. Výsledná hodnota K_d analogu byla vypočítána minimálně ze tří samostatných měření (tzn. vazebných křivek, tj. parciálních hodnot K_d).

5 Výsledky

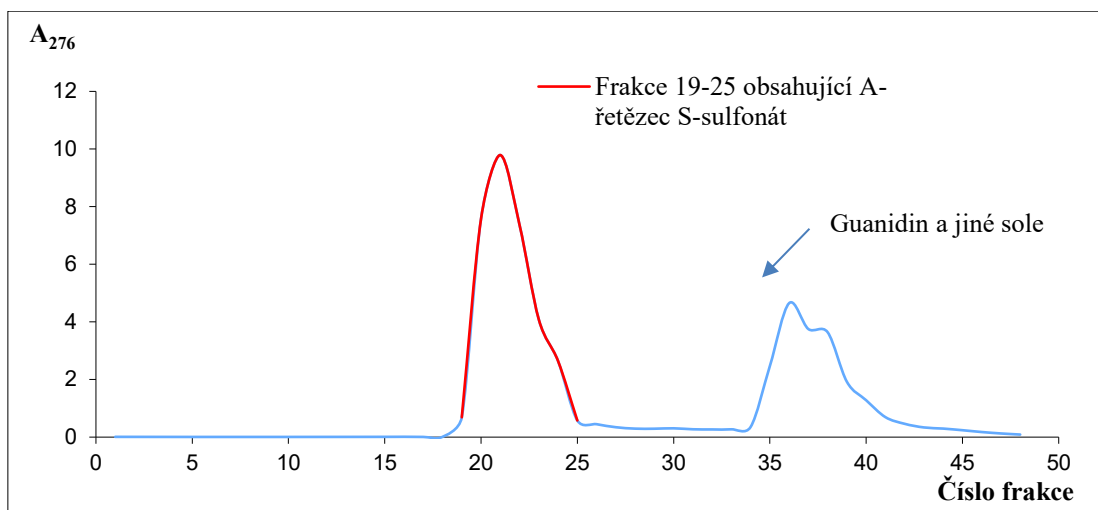
5.1 Syntéza A-řetězců

Zvolená metodika přípravy řetězců A jednotlivých analogů byla provedena za stejných podmínek, proto jsou ve výsledcích uvedeny grafy pouze jednoho reprezentativního řetězce insulínu, HisA10 A-řetězce.

Tab. 3: Přehled připravených A-řetězců a jejich výtěžků po HPLC přečištění surového materiálu připraveného v měřítku 100 μmol . Dále jsou v tabulce uvedeny teoretické a experimentální monoizotopické molekulové hmotnosti A-řetězců insulínu připravených v této práci.

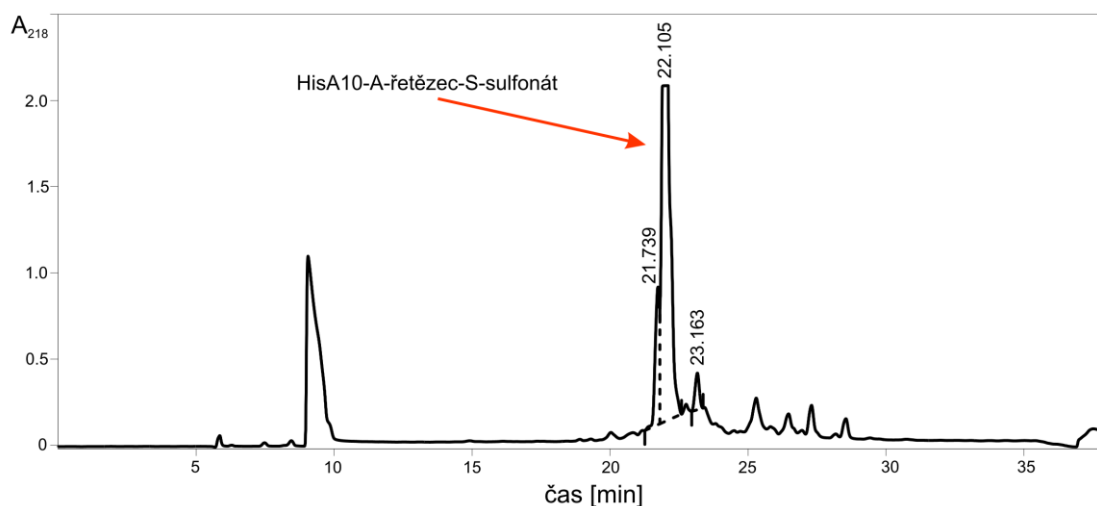
Analog	Teoretická M_r	Experimentální M_r	Výtěžek [%]
HisA10 A-řetězec	2725,80	2725,6	22
ValA10 A-řetězec	2687,81	2687,76	5 a 18
HisA12 A-řetězec	2751,87	2751,83	13
ValA13 A-řetězec	2687,81	2687,80	13
HisA17 A-řetězec	2709,96	2709,79	7
AspA17 A-řetězec	2687,81	2687,4	5 a 7

Jednotlivé modifikované A-řetězce byly syntetizovány na pevné fázi podle popisu v kapitole 4.3.1.1. Takto připravené A-řetězce byly štěpeny štěpící směsí a jejich volné -SH skupiny byly převedeny na S-sulfonáty. Následně byly surové řetězce odsoleny na gelové chromatografické koloně Sephadex G-10 a změřena absorbance jednotlivých frakcí při vlnové délce 276 nm podle podmínek popsanych v kapitole 4.3.1.3. Na základě chromatogramů (příklad na obr. 8, str. 31) byly spojeny frakce obsahující příslušný odsolený A-řetězec.



Obr. 8: Chromatogram odsolování S-sulfonátu A-řetězce insulinu s modifikací HisA10 na koloně Sephadexu G-10, $V_t = 500$ ml. Eluce byla provedena v 50 mM roztoku NH_4HCO_3 . Spojeny frakce 19-25 označené červeně.

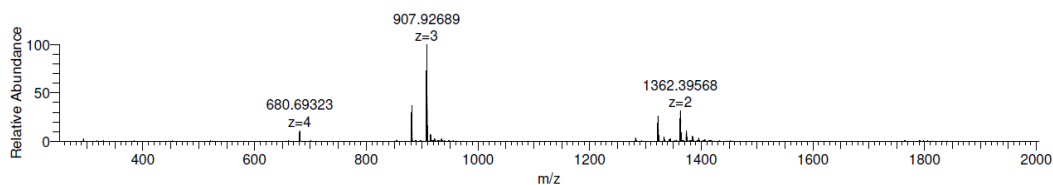
Takto vzniklé vzorky byly následně preparovány preparativním provedením RP-HPLC (Obr. 9) za podmínek popsanych v kapitole 4.3.1.4. Výtěžky jednotlivých řetězců připravených v rámci této práce byly mezi 5-22 % v závislosti na zvolené mutaci. U analogů ValA10 a AspA17 nebyl výtěžek první syntézy dostatečný, proto musela být syntéza opakována (Tab. 3, str. 30).



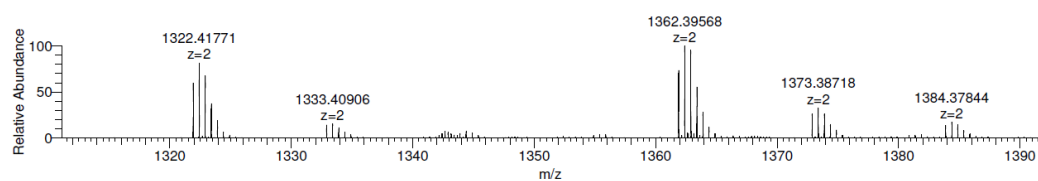
Obr. 9: RP-HPLC chromatogram S-sulfonátu A-řetězce insulinu s modifikací HisA10 na preparativní koloně Nucleosil C18 s průtokem 9 ml/min při vlnové délce 218 nm. A-řetězec byl eluován ve 22,105 min.

Vypreparované frakce ze vzorků byly vysušeny na lyofilizaci a analyzovány hmotnostní spektrometrií na servisním pracovišti UOCHB AV ČR (Obr. 10). Na základě hmotnostní spektrometrie byly identifikovány všechny námi připravované A-řetězce insulinu (Tab. 3, str. 30).

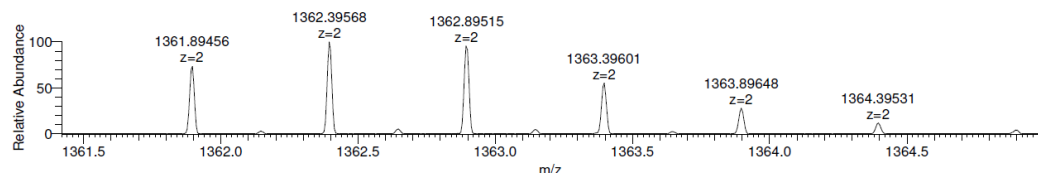
Collinsova, R1016-1-1 #15-19 RT: 0.86-1.10 AV: 5 NL: 1.68E6
T: FTMS - p ESI Full ms [250.00-2000.00]



Collinsova, R1016-1-1 #15-19 RT: 0.86-1.10 AV: 5 NL: 5.30E5
T: FTMS - p ESI Full ms [250.00-2000.00]



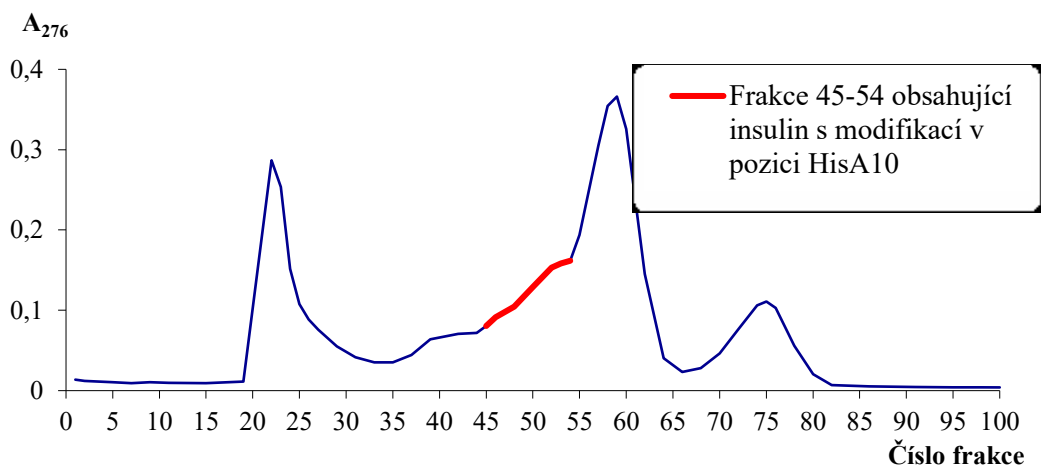
Collinsova, R1016-1-1 #15-19 RT: 0.86-1.10 AV: 5 NL: 5.30E5
T: FTMS - p ESI Full ms [250.00-2000.00]



Obr. 10: Hmotnostní spektrum S-sulfonátu A-řetězce insulinu s modifikací HisA10. Měřeno v negativním režimu. Teoretická monoisotopická M_r je 2725,80.

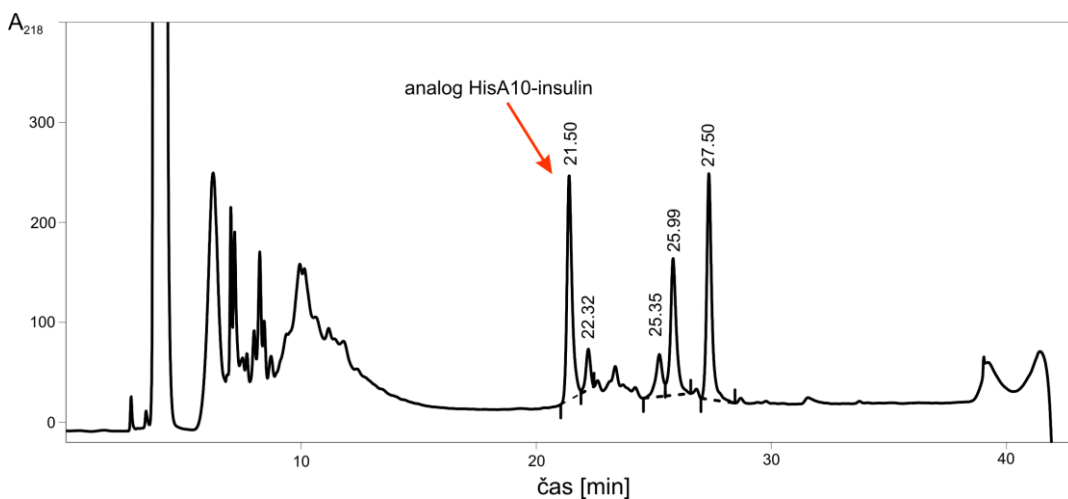
5.2 Rekombinace řetězců insulinu

Redukce a oxidace připravených A-řetězců insulinu s B-řetězcem vepřového insulinu byla provedena podle postupu popsáném v kapitole 4.3.2. Po proběhnutí reakce byla výsledná směs nanášena na kolonu Sephadexu G-50 a změřena absorbance jednotlivých frakcí podle podmínek popsáných v kapitole 4.3.2.3 při vlnové délce 276 nm. Na obr. 11, str. 33, analogu je zobrazen graf elučního profilu HisA10 insulinu.



Obr. 11: Eluční profil po rekombinaci B-řetězce vepřového insulinu s HisA10 A-řetězce. Eluce byla provedena na koloně Sephadex G-50 o objemu 500 ml za průtoku 0,5 ml/min s 1M kyselinou octovou jako mobilní fází. Byla použita peristaltická pumpa Gilson Minipuls 3. Sbíráni frakcí bylo provedeno po cca 6 ml. Absorbance byla měřena na spektrofotometru Lambda 25 při 276 nm.

Frakce z elučního profilu na Obr. 11 byly analyzovány pomocí RP-HPLC. Z části označené červeně byl izolován analog podle podmínek v kapitole 4.3.2.3. Průběh RP-HPLC purifikace je ukázán na Obr. 12. Produkt byl identifikován hmotnostní spektrometrií (Obr. 13A, str. 35) podle teoretické hodnoty M_r (Tab. 4, str. 37).

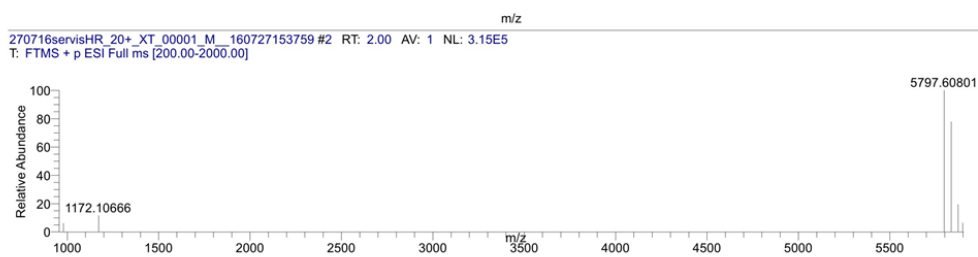
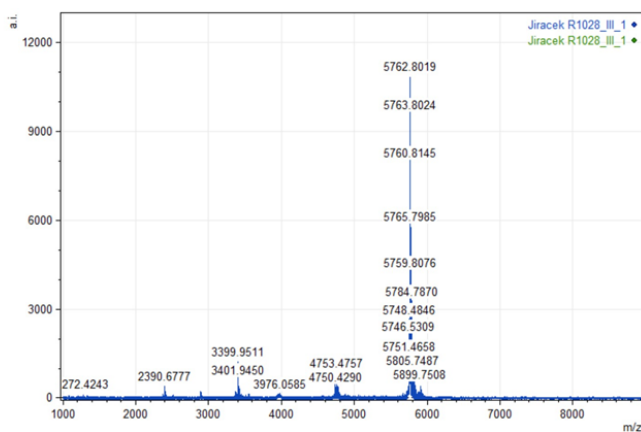
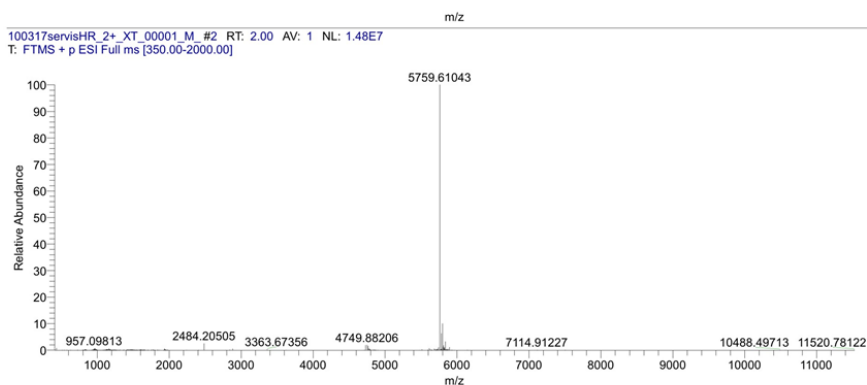
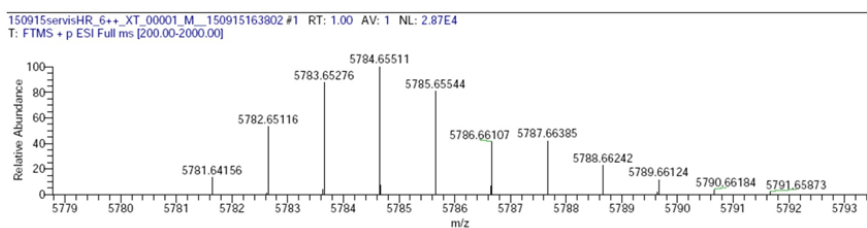


Obr. 12: RP-HPLC chromatogram rekombinačně vytvořeného analogu vepřového insulinu s modifikací HisA10. Preparace byla provedena na semipreparativní koloně Nucleosil C18. Výsledný produkt měl eluční vrchol v čase 21,5 min.

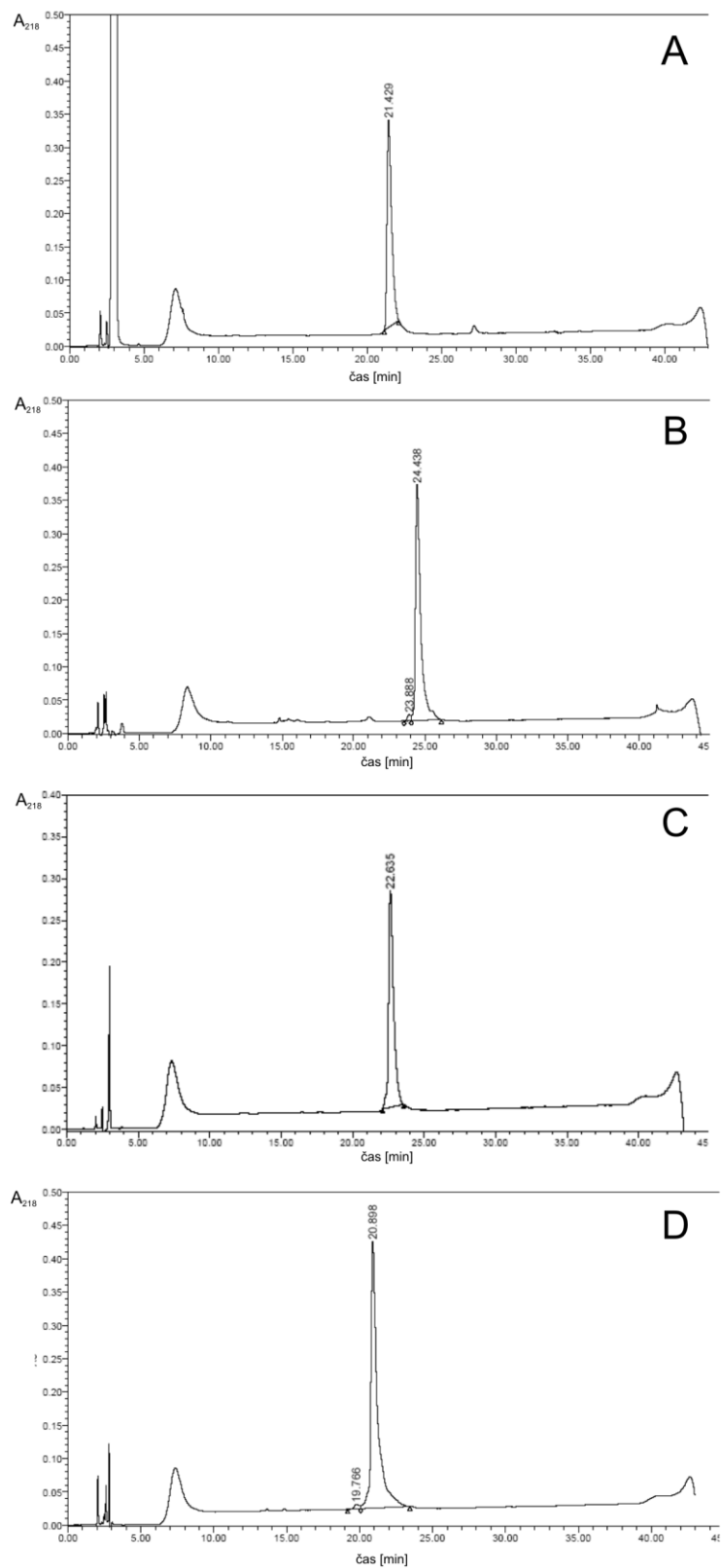
Stejným způsobem se prováděly rekombinace všech analogů z příslušných A-řetězců popsaných v kapitole 4.3.2 s B-řetězcem vepřového insulinu. Analogy

HisA10-insulin, HisA17-insulin, ValA10-insulin a ValA13 insulin se podařilo připravit v dostatečném množství potřebném pro biologické testy. Výtěžky rekombinantních reakcí těchto analogů jsou uvedeny v Tabulce 4 (str. 37). Hmotnostní spektra těchto analogů společně s analytickým provedením HPLC ukazujícím čistotu těchto analogů jsou na Obr. 13 (str. 35) a obr. 14 (str. 36). Čistota námi připravených analogů insulinu byla mezi 94-97 %.

Analogy AspA17-insulin a HisA12-insulin se nepodařilo připravit. Záznam elučního profilu z kolony Sephadexu G50 po rekombinační reakci je zobrazen na obr. 15 (str. 37).

A**B****C****D**

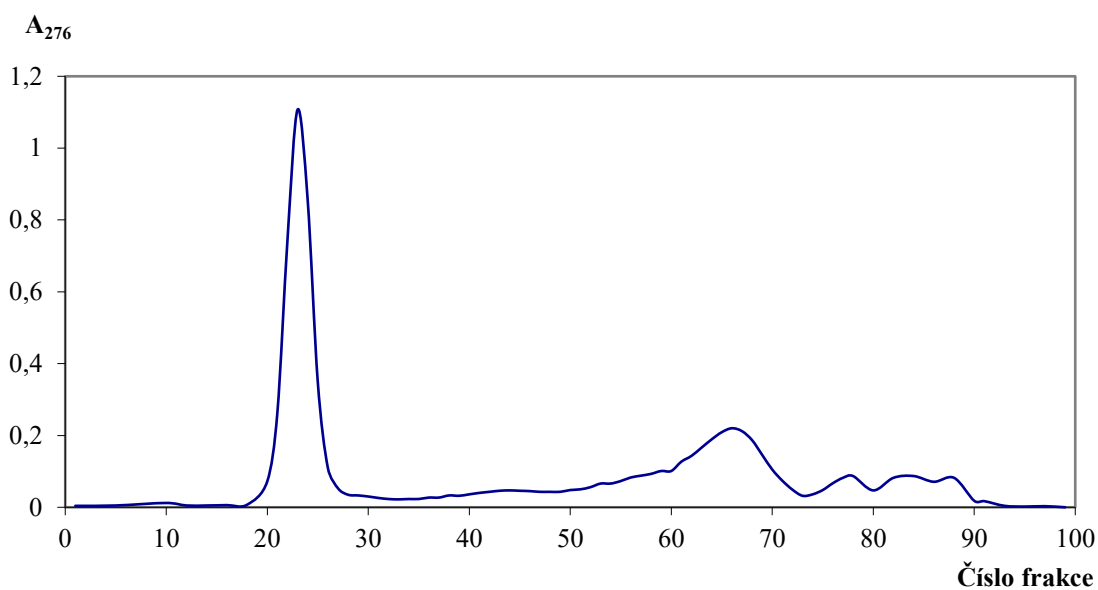
Obr. 13: Hmotnostní spektra úspěšně připravených analogů insulinu s modifikacemi HisA10 (A), ValA10 (B), ValA13 (C) a HisA17 (D).



Obr. 14: Analytické RP-HPLC chromatogramy úspěšně připravených analogů insulínu s modifikacemi HisA10 (A), ValA10 (B), ValA13 (C) a HisA17 (D) pro ověření čistoty.

Tab. 4: Přehled připravených analogů jejich teoretické a experimentálně zjištěné M_r a výtěžky vztahované k použitému množství limitujícího B-řetězce.

Analog	Teoretická M_r	Experimentální M_r	Výtěžek [%]	Výtěžek [mg]
HisA10-insulin	5797,6	5797,61	5,7	1,0
ValA10-insulin	5759,61	5760,8	5,9	1,1
HisA12-insulin	5823,65	-	0	0
ValA13-insulin	5759,61	5759,61	5,0	1,2
HisA17-insulin	5781,64	5781,64	1,2	0,2
AspA17-insulin	5759,61	-	0	0



Obr. 15. Eluční profil po neúspěšné rekombinaci B-řetězce vepřového insulinu a A-řetězce lidského insulinu s modifikací v pozici AspA17. Eluce byla provedena na koloně Sephadex G-50 ($V_t = 500$ ml) za průtoku 0,5 ml/min s 1M kyselinou octovou jako mobilní fází. Byla použita peristaltická pumpa Gilson Minipuls 3. V žádné z frakcí se pomocí RP-HPLC nepodařilo identifikovat žádaný produkt.

5.3 Testování vazebné afinity analogů vůči IR-A, IR-B a IGF-1R

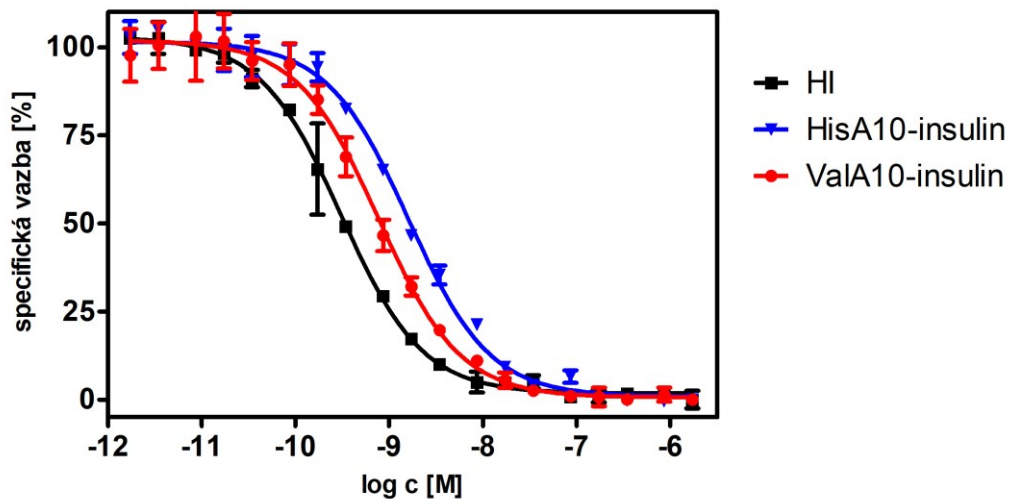
U analogů připravených v dostatečném množství byly provedeny testy vazebné afinity vůči oběma isoformám insulinového receptoru (IR-A a IR-B) a IGF-1 receptoru (IGF-1R). Byly testovány 4 připravené analogy insulinu (Tab. 5, str. 39). Pro HisA10-insulin byly změřeny vazebné afinity vůči všem třem receptorům, u analogů ValA10-insulinu a ValA13-insulinu vůči oběma isoformám IR a u analogu HisA17-insulinu jen vůči IR-A z důvodu nedostatku připraveného materiálu.

Testování vazebné afinity připravených analogů vůči IR-A (obr. 16, str. 40 a 17, str. 40) bylo provedeno na buněčné linii IM-9 podle postupu popsaném v kapitole 4.3.3.1. K testování vazebné afinity vůči isoformě B (obr. 18, str. 41 a 19, str. 41) a vůči IGF-1R (obr. 20, str. 42) byly použity myší embryonální fibroblasty s deletovaným genem pro myší IGF-1R. Testování bylo provedeno podle postupu popsaném v kapitole 4.3.3.2. Testy byly provedeny nejméně ve třech nezávislých měřeních s použitím stejné várky radioligandu a porovnány s referenční molekulou lidské insulinu či IGF-1 měřeného současně. Získaná data byla analyzována v programu GraphPad Prism, 5.0. Z nich byly následně získány hodnoty disociačních konstant K_d (Tab. 5, str. 39).

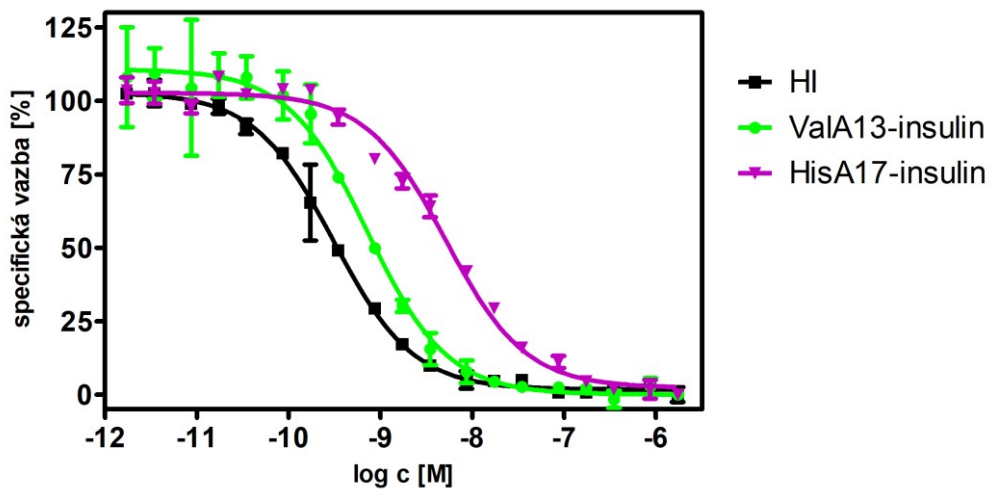
Tab. 5: Vazebné afinity připravených analogů insulínu vůči IR-A, IR-B a IGF-1R.

K_d je rovnovážná disociační konstanta. SEM je standardní chyba průměru. Data byla získána ze třech různých sérií testování měřených v různých obdobích s rozdílnou várkou radioligandu ^{125}I -HI při kterých se vazebná afinita referenčního lidského insulínu vůči IR-A pohybovala v rozmezí 0,12-0,32 nM a vůči IR-B v rozmezí 0,26-0,40 nM. (n) počet měření. Relativní vazebná afinita analogu (v %) je definována jako K_d insulínu či IGF-1 / K_d analogu x 100.

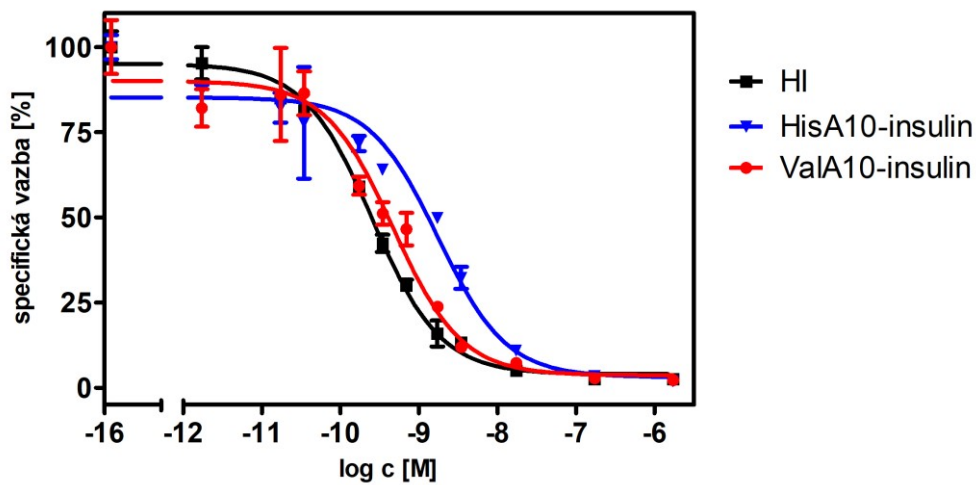
Peptid	IR-A: $K_d \pm \text{SEM}$ [nM] (n)	IR-A: Relativní vazebná afinita [%]	IR-B: $K_d \pm \text{SEM}$ [nM] (n)	IR-B: Relativní vazebná afinita [%]	IGF-1R: $K_d \pm \text{SEM}$ [nM] (n)	IGF-1R: Relativní vazebná afinita [%]
Lidský insulin	0,12-0,32 (12) ^a	100,00	0,26-0,40 (15) ^a	100,00	292 ± 31 (3)	0,082
Lidský IGF-1	-	-	-	-	0,11 ± 0,05 (5)	100,00
HisA10- insulin	0,74 ± 0,24 (4)	15,5	1,23 ± 0,25 (3)	21,3	451 ± 53 (3)	0,025
ValA10- insulin	0,44 ± 0,06 (3)	72,3	0,66 ± 0,37 (4)	52,9	-	-
ValA13- insulin	0,35 ± 0,07 (4)	91,8	0,78 ± 0,30 (3)	44,8	-	-
HisA17- insulin	3,77 ± 0,30 (3)	7,1	-	-	-	-



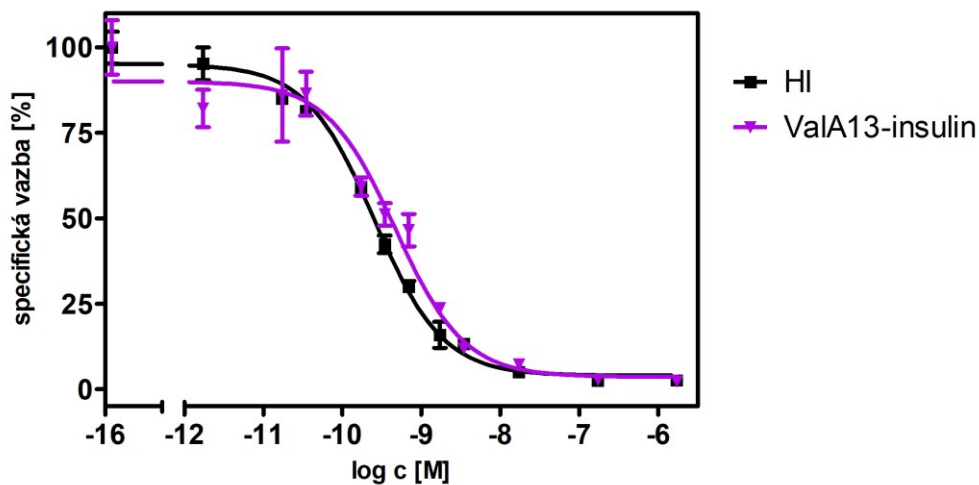
Obr. 16: Křivka specifické vazby lidského insulinu, His10-insulinu a ValA10-insulinu na IR-A. Kde c je koncentrace měřené látky. Data analyzována v programu GraphPad Prism, 5.0.



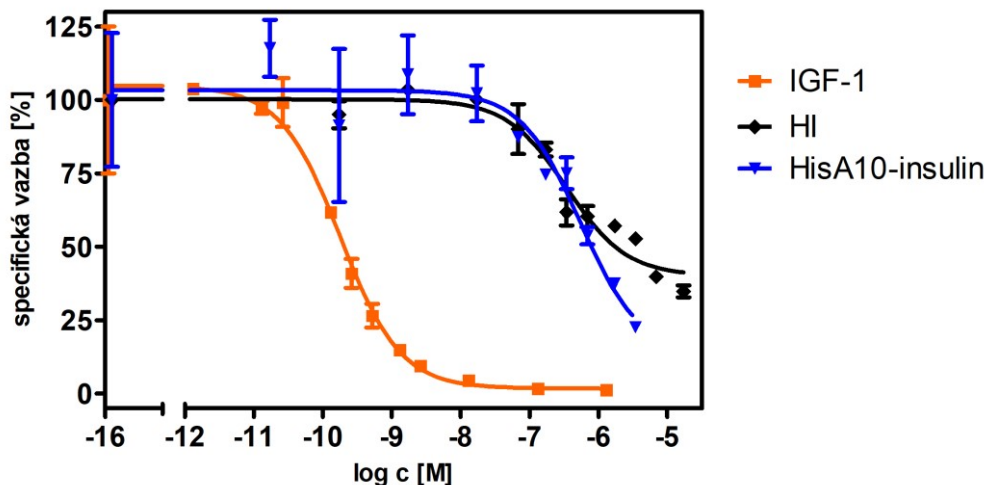
Obr. 17: Křivka specifické vazby lidského insulinu, ValA13-insulinu a HisA17-insulinu na IR-A. Kde c je koncentrace měřené látky. Data analyzována v programu GraphPad Prism, 5.0.



Obr. 18: Křivka specifické vazby lidského insulínu, HisA10-insulínu a ValA10-insulínu na IR-B. Kde c je koncentrace měřené látky. Data analyzována v programu GraphPad Prism, 5.0.



Obr. 19: Křivka specifické vazby lidského insulínu a ValA13-insulínu na IR-B. Kde c je koncentrace měřené látky. Data analyzována v programu GraphPad Prism, 5.0.



Obr. 20: Křivka specifické vazby lidského insulinu, IGF-1 a HisA10-insulinu na IGF-1R, kde c je koncentrace měřené látky. Data analyzována v programu GraphPad Prism, 5.0.

Vazebné afinity jednotlivých analogů byly porovnány s lidským insulinem, (Tab. 5, str. 39). Analog HisA10 byl jediných analogem testovaným vůči všem třem receptorům. U všech měl sníženou afinitu vzhledem k insulinu lidskému. Vůči IR-A a IR-B měl zhruba pětinovou afinitu (16 a 21%), vůči IGF-1R měl afinitu asi třetinovou v porovnání s lidským insulinem.

Záměna isoleucinu a leucinu v pozicích A10 a A13 za valin měla poměrně malý vliv na afinitu vůči IR-A: 72 % a 92 %. Oproti tomu afinita vůči IR-B klesla na zhruba polovinu: 53 % a 45 %, čímž se ukázal negativní vliv kratšího řetězce valinu na vazbu k isoformě B insulinového receptoru. Poslední testovaný analog, HisA17-insulin měl nejnižší afinitu vůči IR-A ze všech připravených analogů. Jeho afinita byla pouze 7 %. Kvůli malému připravenému množství tohoto analogu z důvodu obtížné rekombinační reakce (Tab. 4, str. 37) nebyl tento analog dále testován ani vůči IR-B ani IGF-1R.

6 Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo připravit analogy insulínu se záměnami aminokyselin v oblasti důležité pro vazbu na receptor insulínu a určit vazebné afinity těchto analogů vůči oběma isoformám receptoru, IR-A a IR-B, a případně i vůči receptoru pro IGF-1 (IGF-1R). Tato práce je součástí komplexnější studie probíhající v laboratoři Dr. Jiráčka v ÚOCHB AVČR, zaměřující se na pochopení mechanismu interakcí mezi insulínem, IGF-1, IGF-2 a jejich receptory, IR-A, IR-B a IGF-1R. Součástí projektu je snaha porozumět úloze jednotlivých aminokyselin ve specifických pozicích všech tří hormonů na vazebnou selektivitu vůči receptorům. Díky podobnosti primárních sekvencí a 3D struktur insulínu a obou IGF (Obr. 6, str. 18) tak mohou být studovány ekvivalentní pozice hormonů paralelně a definován tak jejich vliv na vazebné afinity vůči receptorům. Důkladné pochopení role jednotlivých aminokyselin jednotlivých hormonů na vazebné afinity by mohlo vést k návrhu takových analogů hormonů, které by byly selektivnější ve vazbě vůči jednotlivým receptorům. Takové látky, např. analogy insulínu selektivně se vážící na IR-B, by mohly najít uplatnění např. při léčbě diabetu.

V této práci jsme se zaměřili na tzv. vazebné místo 2 insulínu (kap. 3.5: Obr. 3, str. 16), o kterém se předpokládá, že interaguje s takzvaným vazebným místem 2' receptoru insulínu. Interakce těchto částí obou proteinů, insulínu a receptoru, nebyla ještě strukturně prostudována a vazebné místo 2 insulínu bylo předběžně lokalizováno jen na základě mutace jednotlivých aminokyselin (kap. 3.5). Nicméně se předpokládá, že právě interakce vazebných míst 2 a 2' vytváří vysoce afinitní komplex a vede k aktivaci receptoru. V této studii se jednalo o analogy insulínu s modifikací na A-řetězci insulínu, konkrétně v pozicích IleA10, SerA12, LeuA13, GluA17, které nejsou ještě příliš prozkoumány. Plánem studie bylo původní aminokyseliny nahradit za aminokyselinu histidin, která se svým charakterem (velikost postranního řetězce, parciální aromatický charakter, schopnost vytvářet vodíkové vazby) výrazně liší od původních aminokyselin v A-řetězci a mohla by novým analogům (HisA10, HisA12, His A13 a HisA17) udělit nečekané vlastnosti. V minulosti byly zajímavé výsledky již učiněny s histidinem v pozici B24 insulínu (5,25).

Druhým plánem této studie bylo původní aminokyseliny IleA10, SerA12, LeuA13 a GluA17 nahradit za aminokyseliny podobné, tzn. Ile za Val (ValA17), Ser za Thr (ThrA12), Leu za Val (ValA13) a konečně Glu za Asp (AspA17). Ideou bylo jemně modulovat vlastnosti analogů ve smyslu posílení (např. afinity vůči IR-B) či potlačení (např. afinita vůči IR-A či IGF-1R). V současné době probíhají ve skupině Dr. Jiráčka práce na charakterizaci analogů IGF-1 a IGF-2 modifikovaných v ekvivalentních pozicích. Tyto studie ještě ale nebyly uzavřeny a nejsou součástí této bakalářské práce.

Z časových důvodů se v rámci této bakalářské práce nepodařilo připravit všech 8 modifikovaných A řetězců insulínu a řetězce ThrA12 a HisA13 nebyly prozatím připraveny. V jejich přípravě se bude pokračovat mimo rámec této práce. Z připravených A-řetězců (HisA10, ValA10, HisA12, ValA13, HisA17, AspA17) poskytly zejména řetězce modifikované v pozici A17 nižší výtěžky než řetězce ostatní (Tab. 3, str. 30). Je zde ale těžké usuzovat, proč by modifikace v této pozici měly mít výraznější vliv na kvalitu syntézy na pevné fázi či následující sulfitylyzační krok. Je možné, že se jedná jen o důsledek náhodných manipulací při syntéze.

Jednotlivé analogy byly připraveny rekombinační reakcí analogu lidského S-sulfonátu A-řetězce s vepřovým S-sulfonátem B-řetězce. B-řetězec insulínu se liší od lidského jen přítomností Ala v poloze B30 na rozdíl od ThrB30 v insulínu lidském. Tato modifikace nemá žádný vliv na vazebnou afinitu (26), proto mohl být vepřový insulín vhodným zdrojem řetězce B pro syntézy.

Výtěžek rekombinačních reakcí analogů insulínu se v naší laboratoři obvykle pohybují okolo 10 %. V případě rekombinace řetězců lidského insulínu, ale také v případě některých záměn, okolo 0 % či až 25 %, a to v závislosti na poloze mutace (27). Výtěžky v této práci (Tab. 4, str. 37) se pohybovaly o okolo 5 až 6 % pro oba analogy s modifikací v poloze A10 a pro ValA13-insulín. Analog HisA12 se vůbec nepodařilo připravit a z obou analogů modifikovaných v pozici A17 pouze HisA17-insulín s velmi nízkým výtěžkem. I když chybí data pro analogy ThrA12 a HisA13 (nebyly připraveny), můžeme konstatovat, že v porovnání s lidským insulínem, modifikace každé z pozic zde má negativní vliv na přirozenou schopnost řetězců formovat disulfidické můstky. Je zajímavé, že nejmenší negativní vliv byl pozorován u pozice A10, která je těsně vedle cysteinu v poloze A11 a kde by se dal spíše očekávat opak. Nicméně zdá se důležité, že

všechny modifikované pozice leží v málo flexibilní části insulínu v blízkém okolí cysteinů v polohách A11 a A20 a tím pádem příslušných disulfidů.

Výsledky testování vazebné afinity jednotlivých analogů byly porovnány s lidským insulínem, v případě testování vůči IGF-1R i s IGF-1 (Kap. 5.3: Tab. 5, str. 39). Analog HisA10 byl jediným analogem testovaným vůči všem třem receptorům a vůči všem receptorům měl sníženou afinitu. Oba analogy ValA10-insulín a ValA13-insulín mají snížené vazebné afinity vůči oběma isoformám receptoru insulínu, nicméně se znatelně citelnějším snížením vůči isoformě B. Poslední testovaný analog, HisA17-insulín měl nejnižší afinitu vůči IR-A ze všech připravených analogů. Jeho afinita byla pouze 7 %. Kvůli nedostatku materiálu nebyl tento analog testován ani na IR-B, ani na IGF-1R.

Celkově je zřejmé, že záměna původních aminokyselin v pozicích A10 či A17 za histidin měla v zásadě velmi negativní vliv ve vazbě na jednotlivé receptory, ať už IR-A, IR-B nebo IGF-1R. U analogů ValA10 a ValA13 byly záměny Ile za Val a Leu za Val tolerovány mnohem lépe a je zajímavé, že hlavně isoformou A. V tomto případě se tedy zdá, že záměny vedly k mírnému zvýšení vazebné selektivity ve prospěch IR-A.

Pro detailnější závěry o příčinách a vlivu jednotlivých mutací na afinitu insulínu bude nutné se pokusit připravit a otestovat zbývající dva analogy, které nebyly z časových důvodů připraveny v rámci této práce; HisA13-insulín a ThrA12-insulín. Nicméně se zdá, že pozice tzv. vazebného místa 2 insulínu substituované v této práci, A10, A12, A13 a A17 jsou velmi citlivé vůči záměnám, a to spíše v negativním smyslu tzn., že způsobují redukci vazebných aktivit. To je zajímavé zjištění, neboť je známo, že záměna Thr v pozici A8 za His vede k velmi výraznému zvýšení vazebné afinity vůči IR-A. Podobných zvýšení vazebných afinit bylo dosaženo v rámci modifikací pozic B24-B26 insulínu(26). Není ovšem zcela jasné, jestli pozice A8 patří do vazebného místa 2, či vazebného místa 1 a pozice B24-B26 patří zcela jistě do vazebného místa 1(5). Na základě těchto výsledků se tedy zdá, že vazebné místo 2 je mnohem více citlivé vůči změnám než vazebné místo 1. V budoucnu bude rovněž zajímavé porovnat výsledky dosažené v této bakalářské práci s výsledky studií s IGF-1 a IGF-2, které probíhají paralelně. Tzn. zjistit, zda se prokáže podobný negativní či jiný dopad ekvivalentních mutací i na tyto dva příbuzné hormony.

7 Závěr

V této bakalářské práci byly připraveny čtyři nové analogy insulínu se záměnami v pozicích A10, A13 a A17, které jsou považovány za součást tzv. vazebného místa 2 insulínu. Další dva analogy, se záměnou v pozicích A12 a A17, se připravit nepodařilo, protože vložené mutace měly zcela negativní vliv na schopnost řetězců insulínu skládat se do nativní konformace. Všechny analogy měly více či méně snížené vazebné afinity vůči oběma isoformám receptoru insulínu, což demonstruje citlivost vazebného místa 2 vůči modifikacím. Je zajímavé, že oba analogy s valinem v pozici A13 či A10 vykazovaly mírně zvýšenou vazebnou specifitu vůči isoformě A receptoru insulínu vzhledem k insulínu lidskému. Celkově můžeme konstatovat, že v této studii bylo vykonáno velmi nadstandardní množství práce a bylo dosaženo zajímavých výsledků, které budou součástí širší studie o roli tzv. vazebného místa 2 v insulínu a hormonech IGF-1 a IGF-2 při interakci s receptory insulínu a receptoru pro IGF-1.

Použitá Literatura

1. Anonymous. Abbreviations and Symbols. *Eur J Biochem.* 1977;74(1):1–6.
2. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* leden 2014;6(1):a009191.
3. Siddle K. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances. *Front Endocrinol.* 2012;3:34.
4. Cai W, Sakaguchi M, Kleinridders A, Gonzalez-Del Pino G, Dreyfuss JM, O'Neill BT, et al. Domain-dependent effects of insulin and IGF-1 receptors on signalling and gene expression. *Nat Commun.* 27. březen 2017;8:14892.
5. De Meyts P. Insulin/receptor binding: The last piece of the puzzle? *BioEssays.* 1. duben 2015;37(4):389–97.
6. Jonietz E. Cause and effect. *Nature.* 17. květen 2012;485(7398):S10–1.
7. Dodson E, Dodson G, Hubbard R, Reynolds C. Insulins Structural Behavior and Its Relation to Activity. *Biopolymers.* 1983;22(1):281–91.
8. McKern NM, Lawrence MC, Streltsov VA, Lou M-Z, Adams TE, Lovrecz GO, et al. Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature.* 14. září 2006;443(7108):218–21.
9. De Meyts P. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays.* prosinec 2004;26(12):1351–62.
10. De Meyts P, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: Implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov.* říjen 2002;1(10):769–83.
11. Krizkova K, Chrudinova M, Povalova A, Selicharova I, Collinsova M, Vanek V, et al. Insulin-Insulin-like Growth Factors Hybrids as Molecular Probes of Hormone:Receptor Binding Specificity. *Biochemistry (Mosc).* 31. květen 2016;55(21):2903–13.
12. Vikova J, Collinsova M, Kletvikova E, Budesinsky M, Kaplan V, Zakova L, et al. Rational steering of insulin binding specificity by intra-chain chemical crosslinking. *Sci Rep.* 21. leden 2016;6:19431.
13. Bedinger DH, Adams SH. Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. *Mol Cell Endocrinol.* 5. listopad 2015;415(C):143–56.
14. Menting JG, Whittaker J, Margetts MB, Whittaker LJ, Kong GK-W, Smith BJ, et al. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature.* 10. leden 2013;493(7431):241-U276.
15. Menting JG, Yang Y, Chan SJ, Phillips NB, Smith BJ, Whittaker J, et al. Protective hinge in insulin opens to enable its receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19. srpen 2014;111(33):E3395–404.

16. Schaffer L. A Model for Insulin Binding to the Insulin-Receptor. *Eur J Biochem.* 1. květen 1994;221(3):1127–32.
17. Kavran JM, McCabe JM, Byrne PO, Connacher MK, Wang Z, Ramek A, et al. How IGF-1 Activates its Receptor. *Elife.* 25. září 2014;3:e03772.
18. Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* říjen 2005;16(4–5):421–39.
19. Adams TE, Epa VC, Garrett TPJ, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci.* červenec 2000;57(7):1050–93.
20. Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, et al. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature.* 27. leden 2011;469(7331):491-U63.
21. Dynkevich Y, Rother KI, Whitford I, Qureshi S, Galiveeti S, Szulc AL, et al. Tumors, IGF-2, and Hypoglycemia: Insights From the Clinic, the Laboratory, and the Historical Archive. *Endocr Rev.* prosinec 2013;34(6):798–826.
22. Gauguin L, Klaproth B, Sajid W, Andersen AS, McNeil KA, Forbes BE, et al. Structural basis for the lower affinity of the insulin-like growth factors for the insulin receptor. *J Biol Chem.* 1. únor 2008;283(5):2604–13.
23. Chance RE, Hoffmann JA, Kroeff EP, Johnson MG, Schirmer EW, Bromer WW. The production of human insulin using recombinant DNA technology and a new chain combination procedure. *Pierce Chem Co.* 1981;
24. Frasca F, Pandini C, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, et al. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol.* květen 1999;19(5):3278–88.
25. Zakova L, Kletvikova E, Veverka V, Lepsik M, Watson CJ, Turkenburg JP, et al. Structural Integrity of the B24 Site in Human Insulin Is Important for Hormone Functionality. *J Biol Chem.* 12. duben 2013;288(15):10230–40.
26. Zakova L, Kazdova L, Hanclova I, Protivinska E, Sanda M, Budesinsky M, et al. Insulin analogues with modifications at position B26. Divergence of binding affinity and biological activity. *Biochemistry (Mosc).* 27. květen 2008;47(21):5858–68.
27. Kosinova L, Veverka V, Novotna P, Collinsova M, Urbanova M, Moody NR, et al. Insight into the Structural and Biological Relevance of the T/R Transition of the N-Terminus of the B-Chain in Human Insulin. *Biochemistry (Mosc).* 3. červen 2014;53(21):3392–402.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka