

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Petra Halušková

*Syntéza a charakterizace peptidu 5 z *Drosophila melanogaste* podobného
insulinu*

*Synthesis and Characterisation of the Insulin-like Peptide 5 from *Drosophila
melanogaster**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Žáková, PhD.
Konzultant: prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Lenky Žákové, PhD. a všechny použité informační zdroje a literaturu jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Žákové, PhD. za odborné vedení, velkou trpělivost a neocenitelné rady v průběhu tvorby této práce, a odborné konzultantce Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za vstřícnost a ochotu. Moje díky patří určitě i RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. za cenné rady a pomoc hlavně v experimentální části práce, stejně jako celému kolektivu skupiny Dr. Jiráčka na ÚOCHB AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposledním řadě bych chtěla poděkovat své rodině za nekonečnou podporu a lásku.

Abstrakt

V přírodě pozorujeme mnoho evolučně konzervovaných proteinů a mechanismů a jedním z nich je insulin a jeho signální dráha. Mnoho částí této dráhy je velice podobných jak v organismu člověka, tak v nižších organismech, jako je například muška octomilka obecná, *Drosophila melanogaster*. Insulin je jednou z nejvíce zkoumaných molekul na světě, v těle působí zejména jako hormon, ale díky evoluční příbuznosti a podobnosti s IGF dokáže působit i jako růstový faktor. Dodnes není znám přesný mechanismus vazby této molekuly na insulinový receptor a ani přesně jak insulin nebo peptidy podobné insulinu ovlivňují regulaci metabolismu, buněčnou proliferaci, buněčný růst a tím i velikost orgánů i velikost celého těla. Studium rodiny peptidů podobných insulinu a jejich signální dráhy v bezobratlých by mohlo být, díky vysoké evoluční konzervovanosti, využito pro pochopení celé řady metabolických pochodů u vyšších živočichů.

Pro náš výzkum jsme vybrali dlouhodobě používaný modelový organismus mušku *Drosophila melanogaster*. Z celkově sedmi peptidů *D. melanogaster* podobných insulinu jsme se v této studii pokusili připravit analog peptidu 5 (DILP5) složeného z řetězce A lidského insulinu a řetězce B DILP5. V řetězci B byly zároveň všechny methioniny vyměněny za aminokyselinu norleucin. Cílem práce bylo prozkoumat schůdnost celkové chemické syntézy tohoto analogu. Ze získaných výsledků je možné usuzovat, že tento protein se podařilo připravit, avšak nepodařilo se ho připravit v dostatečném množství a izolovat ho z reakční směsi. Nicméně skutečnost, že protein vznikl v poprvé použité rekombinační reakci přes S-sulfonátové formy jednotlivých řetězců by mohlo být příslibem pro další pokusy přípravy analogů insulinu podobných peptidů

Klíčová slova: insulin, peptidy podobné insulinu, *Drosophila melanogaster*, celková chemická syntéza, evoluční konzervovanost, DILP5

Abstract

Many evolutionary conserved proteins and mechanisms have been observed in nature, one of them is insulin and its signal pathway. Importantly, many parts of this pathway in humans are similar to those found in lower organisms, such as fruit fly (*Drosophila melanogaster*). Insulin is one of the most studied complex molecules; it acts primarily as a hormone but it can also act as a growth factor due to its evolutionary congeniality and similarity to the IGF. It has long been unclear how insulin binds to its receptor and how insulin or insulin-like proteins influence regulation of metabolism, cell proliferation, cell growth and also the size of organs and the whole body. Examining insulin-like peptide superfamily and its signal pathway in invertebrates may thus be used to better understand many metabolic processes in vertebrates thanks to high evolutionary conservation.

In this thesis, we tried to prepare an analogue of insulin like peptide 5 (DILP5) of *Drosophila melanogaster* by a total chemical synthesis. This analogue is composed of A-chain of human insulin and B-chain of DILP5. In B-chain all methionins were replaced by amino acid norleucine using a chain combination method through S-sulfonate forms of each chain. The results show that this protein can be successfully prepared, however, the amount was not sufficient and it was not possible to separate the product from the reaction mixture. Nevertheless, the fact that the protein was prepared, for the first time, could be promising for future efforts to prepare insulin-like analogues.

Key words: insulin, insulin-like peptides, *Drosophila melanogaster*, total chemical synthesis, evolutionary conservation, DILP5

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Seznam použitých zkratk	7
1. ÚVOD.....	9
1.1 Rodina peptidů podobných insulinu.....	9
1.2 Insulin.....	11
1.2.1 Struktura insulinu.....	12
1.2.2 Biosyntéza a regulace sekrece insulinu	13
1.2.3 Účinky insulinu na organismus.....	14
1.3 Peptidy podobné insulinu přítomné v druhu <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.3.1 Struktura peptidů podobných insulinu v druhu <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.3.2 Účinky peptidů z <i>Drosophila melanogaster</i> podobných insulinu na organismus mušky a jejich exprese	15
1.3.3 Peptid 5 z <i>Drosophila melanogaster</i> podobný insulinu.....	17
1.4 Insulinový receptor.....	19
1.5 Receptor pro peptidy v druhu <i>Drosophila melanogaster</i> podobné insulinu	21
1.6 Příprava molekul podobných insulinu	22
1.6.1 Celková chemická syntéza proteinů podobných insulinu.....	22
1.6.2 Semisyntéza proteinů podobných insulinu	23
1.6.3 Rekombinantní příprava proteinů podobných insulinu	23
2. CÍL PRÁCE.....	24
3. MATERIÁL	25
4. METODY	26
4.1 Štěpení vepřového insulinu	26
4.1.1 Sulfitolýza vepřových insulinových řetězců.....	26
4.1.2 Oddělení vepřových insulinových řetězců gelovou chromatografií	26
4.2 Příprava řetězce B peptidu 5 z <i>Drosophila melanogaster</i> podobného insulinu....	27
4.2.1 Štěpení peptidu 5 z <i>Drosophila melanogaster</i> podobného insulinu z Wangovy prskyřice	27
4.2.2 Konverze peptidu 5 z <i>Drosophila melanogaster</i> podobného insulinu na S-sulfonáty.....	27

4.2.3	Odsolení peptidu 5 z <i>Drosophila melanogaster</i> podobného insulinu gelovou chromatografií	28
4.2.4	Preparace řetězců peptidů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	28
4.3	Rekombinace řetězce A lidského insulinu a řetězce B peptidu 5 z <i>Drosophila melanogaster</i> podobného insulinu	29
4.3.1	Redukce sloučenin v rekombinační reakci	29
4.3.2	Oxidace sloučenin v rekombinační reakci	30
4.4	Identifikace produktů reakcí hmotnostní spektrometrií	30
5	VÝSLEDKY	31
5.1	Příprava řetězce A lidského insulinu	31
5.2	Příprava řetězce B peptidu 5 z <i>Drosophila melanogaster</i> podobného insulinu	34
5.3	Rekombinace řetězce A lidského insulinu a řetězce B peptidu 5 z <i>Drosophila melanogaster</i> podobného insulinu	36
6	DISKUSE	41
7	SOUHRN	44
8	REFERENCE	45

Seznam použitých zkratek

ACN – acetonitril

AKH – adipokinetický hormon

Boc – *tert*-butyloxykarbonylová skupina

DCM – dichlormethan

DILP – protein z *Drosophila melanogaster* podobný insulinu

Dipea – *N,N*-diisopropylethylamin

DIR – insulinový receptor z *Drosophila melanogaster*

DMF – dimethylformamid

DTT – dithiotreitol

EDT – ethandithiol

Fmoc – 9-flourenylmethoxykarbonylová skupina

GLUT4 – glukosový transportér 4

Gly/NaOH pufr – glycinový pufr

GuaHCl – guanidin-hydrochlorid

HBTU – hexaflourofosfát 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronia

HOBt – 1-hydroxybenzotriazol

IGF – růstový faktor podobný insulinu

IGFBP – protein vážící růstový faktor podobný insulinu

IMP-L2 – imaginal morphogenesis protein-Late 2

IR – insulinový receptor

IUB – Mezinárodní biochemická unie (z angl. *International Union of Biochemistry*)

IUPAC – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (z angl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

Pbf – pentametyldihydrobenzofuran

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (z angl. *Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography*)

*t*Bu – *tert*-butylová skupina

TFA – trifluoroctová kyselina

TIS – triisopropylsilan

Tris – tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Trt – tritylová skupina

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

1. ÚVOD

Insulin byl objeven v roce 1922 Frederickem Bantingem a Charlesem Bestem v laboratoři Johna McLeoda v Torontu jako látka způsobující lidskou metabolickou nemoc diabetes mellitus. V roce 1923 Banting s McLeodem získali za tento objev Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. Krátce poté se zjistilo, že tento hormon má širokou fylogenetickou distribuci a do poloviny sedmdesátých let dvacátého století byl insulin izolován a sekvenován ze všech tříd obratlovců (2). V poslední době díky technikám využívajícím rekombinantní DNA byli identifikovány geny molekul podobných insulinu také v bezobratlých, jako je hmyz, měkkýši nebo hlístice (3). Tyto objevy jasně potvrdily, že insulin je evolučně starý hormon přítomný ve všech živočiších.

1.1 Rodina peptidů podobných insulinu

Rodina peptidů podobných insulinu je skupinou evolučně příbuzných peptidů, které mají různorodý vliv na organismus jako hormony či růstové faktory. Do této rodiny patří molekuly s podobnou sekundární a terciární strukturou. Ta se vyznačuje přítomností tří disulfidických můstků, které utvářejí kostru molekuly, dále pak α -šroubovicovou částí v B-doméně, po které následuje variabilně dlouhý řetězec a následně A-doména s dvěma šroubovicemi. Domény jsou orientovány proti sobě přes disulfidické vazby (4).

U savců do rodiny peptidů podobných insulinu řadíme insulin, růstové faktory I a II podobné insulinu (dále IGF-I a IGF-II, z angl. *Insulin-like Growth Factor*), relaxin, bombyxin, Leydigův peptid podobný insulinu (3) a další peptidy podobné insulinu například z háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*) z kmene hlístic nebo octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*). Je velice pravděpodobné, že se všechny peptidy podobné insulinu vyvinuly ze společného předka. Například v primární struktuře lidský insulin, a oba růstové faktory (IGF-I, IGF-II) sdílejí 50% aminokyselinovou identitu v řetězcích A a B (5), a jejich biologické účinky na buněčné úrovni jsou velmi podobné a občas se prolínají.

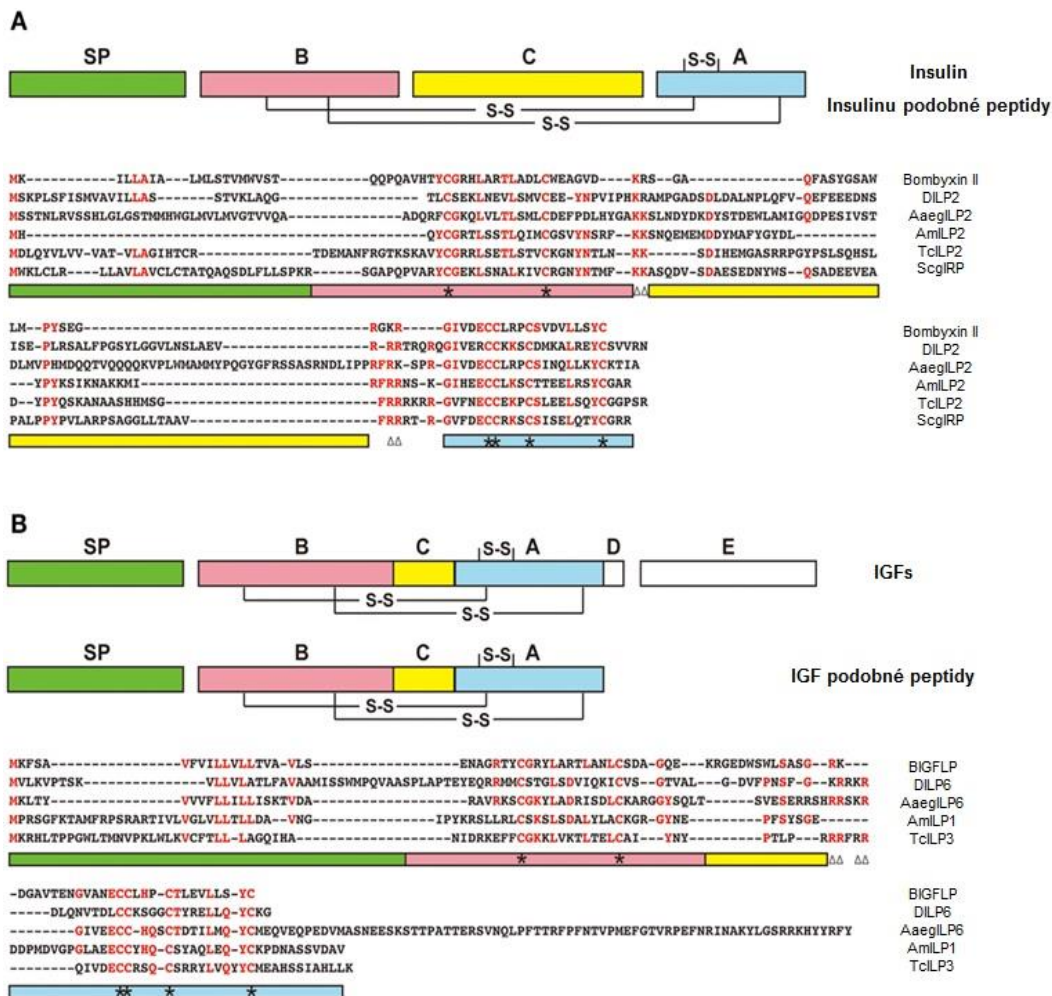
V organismech ostatních obratlovců mimo savců je o působení insulinu méně známo, je ale obecné přesvědčení s množstvím důkazů, že se chová primárně jako hormon regulující metabolismus (6). Strukturně byly peptidy podobné insulinu vysoce

konzervovány po celou evoluci obratlovců. Obrázek 1 ukazuje podobnost lidského insulínu s insulíny jiných obratlovců.

		CPH PC1		CPH PC2
ČLOVĚK	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR	EAEDLQVGGVELGGGPGAGSLOPLALEGSLQ	KR	GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN
VELKÉ OPICE	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR	EAEDLQVGGVELGGGPGAGSLOPLALEGSLQ	KR	GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN
MAKAK	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRR	EAEDPQVGGVELGGGPGAGSLOPLALEGSLQ	KR	GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN
KRÁLÍK	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKSR	EVEELQVGGAEELGGGPGAGGLQPSALELALQ	KR	GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN
PES	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKARR	EVEDLQVRDVELAGAPGEGGLQPLALEGALQ	KR	GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN
KŮŇ	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKAXX	EAEDPQVGEVELGGGPGGLGGLQPLALAGPQQ	XX	GIVEQCCTGI CSLYQLENYCN
PRASE	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKARR	EAENPQAGAVELGGGLGG--LQALALEGPPQ	KR	GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN
KŘEČEK	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKSR	GVEDPQVAQLLEGGGPGADDLQTLALEVAQQ	KR	GIVDQCCTSI CSLYQLENYCN
POTKAN II	FVKQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPMSRR	EVEDPQVAQLLEGGGPGAGDLQTLALEVARQ	KR	GIVDQCCTSI CSLYQLENYCN
MYŠ II	FVKQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPMSRR	EVEDPQVAQLLEGGGPGAGDLQTLALEVAQQ	KR	GIVDQCCTSI CSLYQLENYCN
KOČKA	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKARR	EAEDLQGGDAELGEAPGAGGLQPSALEAPLQ	KR	GIVEQCCASVCSLYQLEHNYCN
POTKAN I	FVKQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKSR	EVEDPQVPQLEGGGPEAGDLQTLALEVARQ	KR	GIVDQCCTSI CSLYQLENYCN
MYŠ I	FVKQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKSR	EVEDPQVEQLLEGGSP--GDLQTLALEVARQ	KR	GIVDQCCTSI CSLYQLENYCN
HOVĚZÍ	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKARR	EVEGPQVGALELAGGPG----AGGLEGGPPQ	KR	GIVEQCCASVCSLYQLENYCN
OVCE	FVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKARR	EVEGPQVGALELAGGPG----AGGLEGGPPQ	KR	GIVEQCCAGVCSLYQLENYCN
	Řetězec B insulínu	C-peptid		Řetězec A insulínu

Obr. 1: Porovnání primárních sekvencí aminokyselin molekul insulínu v různých obratlovcích. Oranžově jsou vyznačeny aminokyseliny, které jsou totožné u více druhů. U všech molekul je uveden i tzv. C-peptid, který je „vyštěpován“ proteasami. Převzato a upraveno z (7).

Prvním peptidem podobným insulínu purifikovaným z bezobratlého organismu byl BombyxinA2 (8). Tento protein byl izolován z mozku bource morušového. Sekvenací se potvrdilo, že se jedná o peptid podobný insulínu obsahující řetězce A a B spojené disulfidickými můstky s 30% aminokyselinovou identitou s insulínem. Obecně mají peptidy podobné insulínu bezobratlých dvouřetězcovou strukturu, která je podobná insulínu obratlovců, avšak funkcí se podobají spíše proteinu IGF (jsou mitogenní růstové faktory). Zatím se neobjevily peptidy bezobratlých podobné insulínu, které by působily dominantně jako regulační hormony metabolismu (3). Většina genomů bezobratlých obsahuje více než jeden peptid podobný insulínu. *Drosophila melanogaster* jich má 7 (9), *Caenorhabditis elegans* až 40 (10) a *Bombyx mori* jich má 5 (11). Na obrázku 2 (str. 11) jsou porovnány sekvence aminokyselin insulínu a peptidů podobných IGF u šesti různých hmyzů.



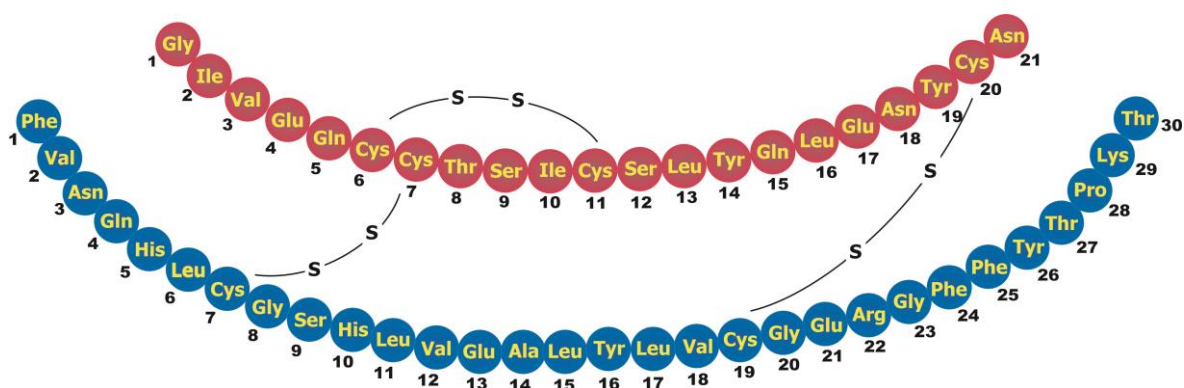
Obř. 2: Sekvence aminokyselin hmyzích peptidů podobných insulinu (A) a IGF (B). Porovnaný jsou peptidy z *B. mori* (bombyxin-II a BIGFLP), *D. melanogaster* (DILP2 a 6), *A. aegypti* (AaegILP2 a 6), *A. mellifera* (AmILP2 a 1), *T. castaneum* (TcILP2 a 3), a *Schistocercagregaria* (ScgIRP). Vysoce konzervované aminokyseliny jsou vyznačeny červeně. Obdělňiky pod sekvencí představují předpokládané domény: signální peptid zelenou, B-doména růžovou, C-doména žlutou a A-doména modrou barvou. Hvězdičky označují cysteiny a trojúhelníčky teoretické místa štěpení. Převzato a upraveno z (11).

1.2 Insulin

Insulin je jednou z nejprozkoumanějších molekul organismů. Už od přelomu 19. a 20. století se lidé zajímali o výzkum diabetu, což poté vedlo k mnoha objevům. Roku 1922 se poprvé podařilo izolovat čistý insulin F. Bantingovi a Ch. Bestovi z hovězího pankreatu. První krystal této molekuly připravil J. J. Abel v roku 1926 a určil romboedrický tvar krystalu (12). Primární struktura insulinu byla určena anglickým biochemikem F. Sangerem roku 1951 (13,14), jeho trojrozměrná struktura pak v roce 1969 rentgenostrukturní analýzou skupinou D. Crowfootové Hodgkinové (15,16).

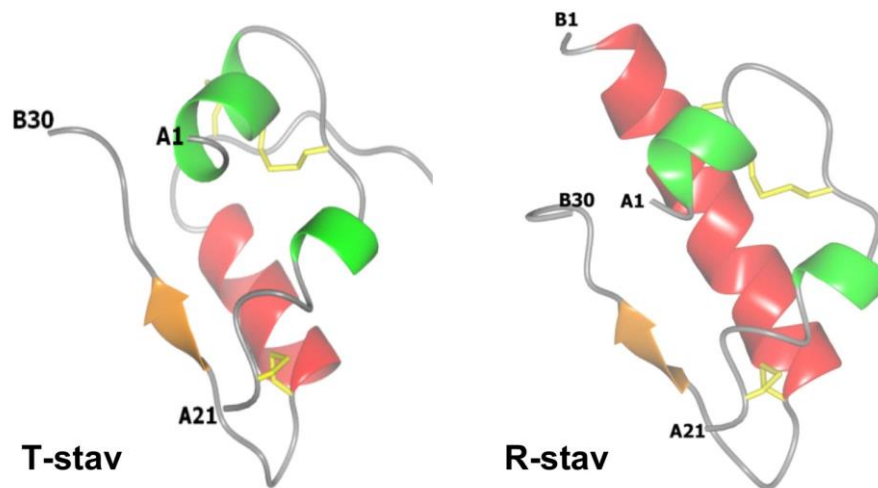
1.2.1 Struktura insulinu

Insulin je globulární protein složený z 51 aminokyselin o celkové relativní molekulové hmotnosti 5808. Je uspořádan do dvou řetězců A a B. Řetězec A obsahuje 21 aminokyselin a má mírně kyselý charakter. Řetězec B je z 30 aminokyselin a jeho charakter je spíše bazický. V insulinu jsou mezi zbytky cysteinů v polohách A7-B7 a A20-B19 dva disulfidické můstky spojující řetězce A a B. V řetězci A se nachází třetí intramolekulární disulfidický můstek mezi cysteiny v polohách A6-A11 (13) (Obr. 3). Molekula insulinu obsahuje jak úseky, které mohou podléhat mutacím, tak vysoce evolučně konzervované úseky, které tvoří strukturně a funkčně důležitou část insulinu. Jejich změna většinou zásadně ovlivňuje funkci a tvorbu insulinu, či jeho interakci s receptorem (17).



Obr. 3: Primární struktura lidského insulinu. Řetězec A je označen červeně, řetězec B modře. Převzato z (18).

Jednotlivé části insulinu vytváří v prostoru téměř všechny sekundární struktury proteinů. V řetězci A jsou dvě α -šroubovice v poloze A2-A8 a A13-A19 spojené β -otáčkou A9-A12. V řetězci B dominuje centrální α -šroubovice B9-B19, po které následuje β -otáčka B20-B23, na niž navazuje C-konec řetězce B tvořící β -strukturu skládaného listu. N-konec řetězce B nemá pevně definovaný tvar. V závislosti na vnějších podmínkách se může objevovat ve dvou strukturních stavech T a R (Obr. 4). Ve stavu T (z angl. *tense*, napnutý) zbytky B1-B8 nevytváří žádnou uspořádanou strukturu a jsou ve formě volně nataženého řetězce, odděleného β -otáčkou od centrálního helixu B9-B19. Ve stavu R (z angl. *relax*, uvolněný) N-konec tvoří prodlouženou α -šroubovici B1-B19 (Obr. 4, str. 13). Kromě kovalentních vazeb a vodíkových můstků je molekula insulinu stabilizována hydrofobními interakcemi, které jsou typické pro globulární proteiny (17, 19).



Obr. 4: Monomer insulínu ve stavu T a R. Zelenou jsou vyznačeny α -šroubovice řetězce A, červenou centrální α -šroubovice řetězce B a oranžovou β -struktura skládaného listu řetězce B. Disulfidické můstky jsou označeny žlutou. Převzato z (20).

Insulin vytváří různé kvartérní struktury. Nejčastěji ho nalezneme ve formě hexameru, v němž je hormon skladován v pankreatu. Nejdříve však insulin ve vyšších koncentracích dimerizuje a poté, za přítomnosti Zn^{2+} iontů, dochází spojením tří dimerů k tvorbě hexamerů. Hexamer je stabilizován ionty Zn^{2+} a imidazolovými skupinami histidinů B10 a třemi molekulami vody (17,19,21).

1.2.2 Biosyntéza a regulace sekrece insulínu

Ve všech obratlovcích je insulin produkován endokrinními β -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu. Jejich transkripčním produktem je preproinsulin, z něhož odštěpením 24 aminokyselin dlouhé signální sekvence vzniká proinsulin, molekula sigmoidního tvaru s dvěma disulfidickými můstky. Proinsulin je skladován v sekrečních granulích Golgiho aparátu β -buněk a obsahuje řetězce A a B insulínu, mezi kterými je tzv. C-peptid (z angl. *connection peptide*). V *trans* cisternách Golgiho aparátu a v nově se tvořících granulích se mění proinsulin na vlastní insulin. To se děje díky dvěma enzymům – endopeptidase, která „vyštěpí“ C-peptid, a exopeptidase, která odstraní dvě bazické aminokyseliny na C-konci řetězce B insulínu (22).

Sekrece je regulována mechanismem exocytosy. Sekreční granule „zrají“, pak se oddělí od Golgiho aparátu a putují za pomoci cytoskeletu k buněčné membráně, kde dojde k jejich splnutí a vylití obsahu granulí do extracelulárního prostoru, tedy do krevního řečiště. V granulích je insulin ve formě hexameru. Po uvolnění do krve se díky

změně pH interakce s ionty Zn^{2+} destabilizují a insulin se rozpadá na dimery a posléze na monomery, které jsou aktivní formou insulinu. Samotná exocytosa je řízena především hladinou glukosy v krvi, která složitou signalizační drahou přes různé iontové kanály ovlivňuje spuštění nebo zastavení sekrece insulinu (22).

1.2.3 Účinky insulinu na organismus

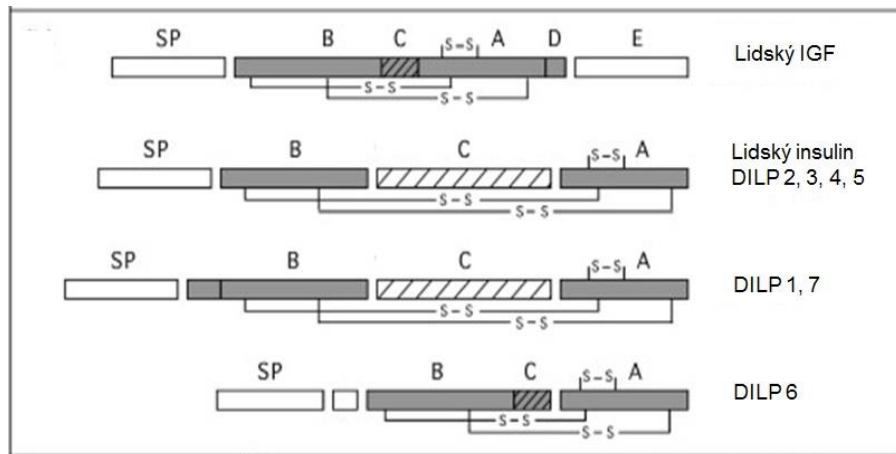
U savců jsou anabolické účinky insulinu dobře dokázané (23). Sekrece insulinu z β -buněk je odpovědí na vzrůst hladiny glukosy v krvi po jídle. Hlavní úlohou insulinu je tedy snížení koncentrace glukosy v krvi zprostředkováním jejího transportu do svalových a tukových buněk prostřednictvím glukosového přenašeče, zejména přenašeče GLUT4. Insulin v jaterních buňkách podporuje tvorbu glykogenu a triacylglycerolů a naopak působí inhibičně na klíčový enzym glukoneogeneze fosfoenolpyruvátkarboxykinasu (PEPCK). V tukové tkáni vedle glukosy podporuje insulin i transport volných mastných kyselin a lipogenezy. Tento hormon také zvyšuje transport aminokyselin a proteosyntézu v játrech a svalech (24).

1.3 Peptidy podobné insulinu přítomné v druhu *Drosophila melanogaster*

Insulinová signální dráha má nenahraditelnou úlohu v regulaci metabolismu, růstu, stresové rezistenci a délce života jak u lidí, tak u *D. melanogaster* (25-33), a tato dráha je také vysoce evolučně konzervovaná (10,34-36). V druhu *Drosophila melanogaster* bylo identifikováno sedm různých peptidů podobných insulinu (DILP1-7, z angl. *Drosophila Insulin-like Peptide*) (9), ale zatím se ví pouze o jednom receptoru (DIR) pro tyto peptidy.

1.3.1 Struktura peptidů podobných insulinu v druhu *Drosophila melanogaster*

Proteosyntézou genů *dilp 1-7* vznikají 107 až 156 aminokyselin dlouhé prekursorové proteiny, jež jsou strukturně podobné preproinsulinu obsahujícímu signální peptid, řetězec B, C-peptid a řetězec A. Vzniklé DILP jsou více podobné insulinu než IGF-I nebo IGF-II, což ukazuje obrázek 5 (str. 15), a všechny jsou ligandem pro jeden receptor DIR (9). Konečné molekuly mají strukturu typickou pro rodinu peptidů podobných insulinu – řetězec B obsahující jednu α -šroubovici, která tvoří kostru molekuly společně s dvěma α -šroubovicemi v řetězci A (4). Dále dva intermolekulární disulfidické můstky spojující oba řetězce a nadto jeden intramolekulární můstek v řetězci A.



Obr. 5: Schéma předpokládané struktury peptidů druhu *Drosophila melanogaster* podobných insulinu 1-7 a porovnání s lidským insulinem a IGF. Domény jsou označeny písmeny. Místa mezi doménami reprezentují pravděpodobná místa proteolytického štěpení (37) v průběhu štěpení peptidů. Tmavě označené části jsou aktivní peptidy sestávající se z jednoho polypeptidového řetězce (IGF) nebo dvou řetězců (DILP 1-7 a lidský insulin). Převzato a upraveno z (9).

Ze všech peptidů mušky *D. melanogaster* podobných insulinu, je nejvíce podobný lidskému insulinu DILP2 s 35% sekvenční homologií a DILP5 s 27,8% sekvenční homologií (9).

1.3.2 Účinky peptidů z *Drosophila melanogaster* podobných insulinu na organismus mušky a jejich exprese

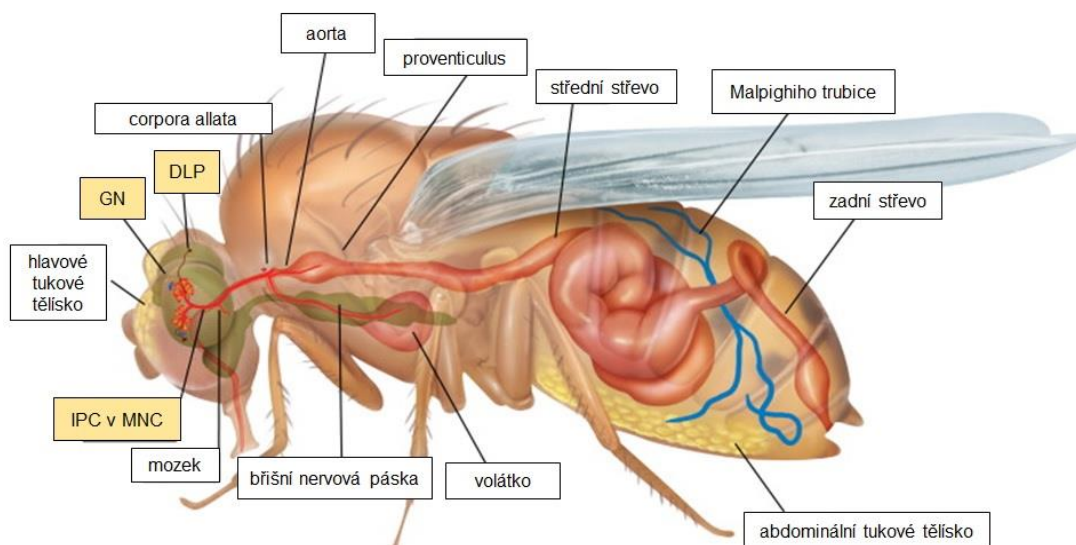
Zdá se, že peptidy druhu *Drosophila* podobné insulinu (DILPs) společně s adipokinetickým hormonem (AKH) působí v mušce podobně jako insulin a glukagon v organismu člověka, a udržují metabolismus v homeostasi. DILP snižují hladinu sacharidů (zejména disacharidu trehalosy, jež se vyskytuje v bezobratlých živočichů) v hemolymfě, zatímco AKH zvyšuje množství trehalosy tím, že stimuluje glykolýzu. Hormony ovlivňují také homeostasi lipidů, přesněji lipolýzu (27,30,38-42). Odstranění buněk produkujících DILPs lokalizovaných v mozku vede k nedokonalému růstu, zvýšení hladiny sacharidů, zvýšení ukládání lipidů, snížení plodnosti a zvýšení rezistence na stres (27,30).

Na aktivitu některých peptidů octomilky obecné podobných insulinu má vliv protein IMP-L2 (z angl. *Imaginal Morphogenesis Protein-Late 2*), který působí jako vazebný protein, podobně jako IGFBP1-6 (z angl. *IGF-binding Protein*) na IGF-I a IGF-II v extracelulárním prostoru (43). IGFBP1-6 prodlužují poločas života proteinů IGF, modulují jejich aktivitu a přístupnost (44). IMP-L2, který se vyskytuje v *D. melanogaster*, inhibuje růst a jeho nadměrná exprese redukuje ve veliké míře velikost mušky. Na druhou stranu ztráta funkce tohoto proteinu vyvolá zvětšení těla. V případě hladovění je IMP-L2 potřebný, protože tlumí funkci peptidů podobných insulinu a pomáhá přežít larvám (45). IMP-L2 se váže na DILP2 a DILP5 (45,51). Kvartérní struktura IMP-L2 je znázorněna na obrázku 6.



Obr. 6: Prostorová struktura proteinu IMP-L2. Dvě podjednotky jsou označeny různými barvami. Převzato a upraveno z (46).

Každý gen *dilp* je exprimován v specifickém čase a na specifickém místě. Například DILP4 se tvoří v embryonálním středním střevě a mesodermu (9), viz Obr. 7 (str. 17), DILP6 převážně v tukovém tělísku larev i dospělců, přičemž exprese je vysoce regulována při přechodu mezi larvou a kuklou (47). DILP7 se tvoří ve specifických neuronech, které inervují reprodukční trakt samiček (48,49), a jejichž inaktivace vede k sterilitě mušek. To naznačuje, že by DILP7 v druhu *Drosophila* mohl mít stejnou funkci jako relaxin u člověka (48). DILP1, 2, 3 a 5 jsou exprimovány v středních neurosekrečních buňkách lokalizovaných v mozku larvy (9,30,50), v dospělé mušce jsou detekovatelné jen DILP2, 3 a 5 (27).



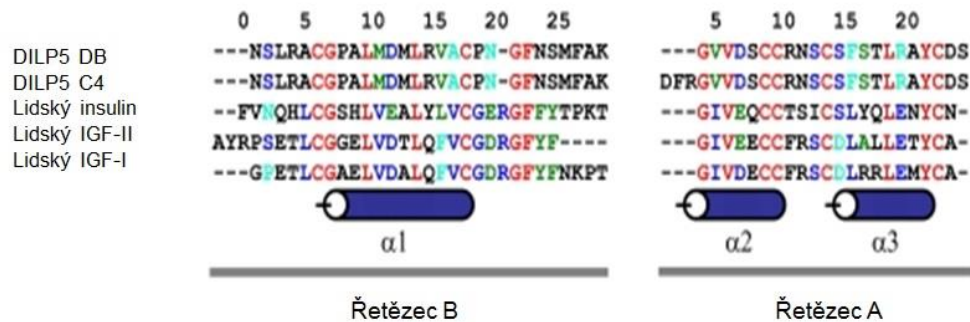
Obr. 7: Anatomie mušky *Drosophila melanogaster*. Buňky produkující insulin (IPC) jsou obklopeny středními neurosekrečními buňkami (MNC) a produkují DILP1, 2, 3 a 5. Peptidy DILP jsou sekretovány z mozku do „corpora allata“ (endokrinní žlázy s juvenilními hormony), „proventriculu“ (žláznatý žaludek) a volátka. DILP7 se tvoří v neuronech břišní nervové pásy, DILP5 navíc v Malpighiho trubici. Tukové tělíska, abdominální i hlavové, produkují DILP6. Neurony sekretující kyselinu γ -aminomáselnou (GN) a dorsální laterální peptidergické neurony (DLP) ovlivňují výdej peptidů podobných insulinu druhu *Drosophila* z MNC. Převzato a upraveno z (51).

1.3.3 Peptid 5 z *Drosophila melanogaster* podobný insulinu

DILP5 má významný biologický vliv na organismus mušky. Protein snižuje hladinu trehalosy v hemolymfě mušky. Trehalosa je primárním cukrem v bakteriích, houbách, rostlinách a bezobratlých, tedy i v rodu *Drosophila* (52). Během omezeného příjmu potravy je mRNA *dilp5* mezi sedmi proteiny podobnými insulinu DILP nejvíce metabolizována (50,53), což naznačuje, že DILP5 by mohl být specializován na kontrolu metabolismu.

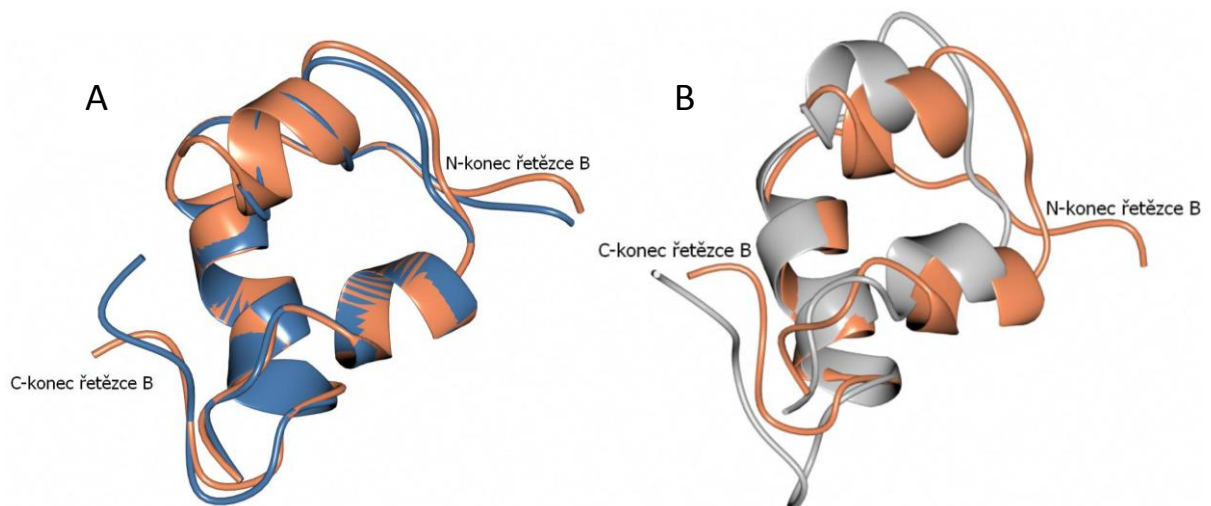
DILP5 byl prvním peptidem druhu *D. melanogaster* podobným insulinu, jehož krystalická struktura byla popsána (52). Byly připraveny dvě formy DILP5, DB a C4, které se liší absencí nebo přítomností sekvence Asp-Phe-Arg na N-konci řetězce A. Porovnání těchto dvou forem s lidským insulinem a IGF je znázorněno na obrázku 8 (str. 18). Struktura obou je velice podobná savčímu insulinu (19) a jeho terciární struktura je charakteristická pro celou rodinu peptidů podobných insulinu. Největší rozdíl je ve více

neuspořádané struktury C-konce řetězce B, což má důsledek na dimerizaci a na mechanismus vazby na receptor (52).



Obr. 8: Porovnání aminokyselinové sekvence DILP5 s lidskými IGF a insulinem. Červeně jsou vyznačeny konzervované aminokyseliny, modře aminokyseliny s podobnou funkční skupinou, zeleně podobné substituce a tyrkysově málo podobné aminokyseliny. Řetězce A a B DILP5 a lidského insulinu sdílejí 23 a 43% sekvenční identitu (v tomto pořadí). A- a B-domény IGF-II mají 32 a 43% identitu sekvence s DILP5, zatímco IGF-I sdílí 28 a 48% sekvenční homologii (v tomto pořadí). Číslování a sekundární struktury patří DILP5. Převzato a upraveno z (52).

Přestože mezi DILP *D. melanogaster* a lidským insulinem je veliká evoluční vzdálenost, oba se váží na receptor toho druhého, i když s mnohem nižší afinitou než má přirozený ligand. Peptid 5 z octomilky obecně podobný insulinu se váže na lidský insulinový receptor mnohem slaběji kvůli tomu, že tento receptor má dvě vazebná místa pro molekulu insulinu (bližší popsáno v kapitole 1.4), a DILP5 má aminokyseliny klíčové pro interakci s lidským insulinovým receptorem zaměněny. Jsou to zejména aminokyseliny v polohách B12, B16 a B23-B26. K tomuto efektu taktéž přispívá zmíněná neuspořádanost C-konce B-domény (Obr. 9, str. 19). Vysoká afinita peptidu 5 z *D. melanogaster* podobného insulinu ke svému receptoru v mušce na druhou stranu naznačuje, že této interakce se účastní navíc aminokyselinové zbytky, které nejsou součástí kontaktu lidského insulinu se svým receptorem (52).



Obr. 9: Překryv (A) dvou forem DILP5 – DB oranžově, C4 modře; (B) lidského insulínu v šedé barvě a DB DILP5 v oranžové. Obrázek vytvořen v programu CCP4mg. PDB kódy DILP5 jsou 2WFV pro DB, 2WFU pro C4 a 1MSO pro lidský insulin. Převzato z PDB databáze.

1.4 Insulinový receptor

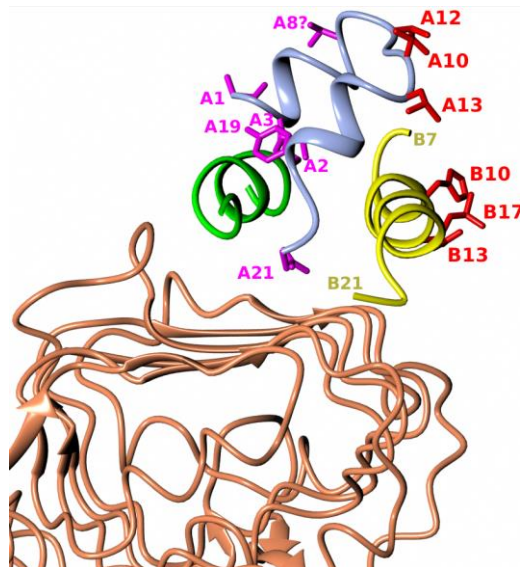
Insulin se v cílových buňkách váže na insulinový receptor (IR). Jedná se o transmembránový glykoprotein ze skupiny tyrosinkinásových receptorů, jenž je složen z dvou α a dvou β podjednotek navzájem spojených disulfidickými můstky. α Podjednotky jsou extracelulární, β podjednotky jsou částečně extra- i intracelulární. Spojením dvou heterodimerů čtyřmi disulfidickými můstky vzniká heterotetramer schopný vázat insulin (54-56).

Na podjednotkách IR rozeznáváme několik domén – dvě velké extracelulární homologní L1 a L2 domény (leucin-rich 1 a 2), mezi nimiž je menší CR (cystein-rich) doména, dále tři domény fibronektinu typu III (Fn0, Fn1 a Fn2), za kterými následuje transmembránová doména (TM) a nakonec intracelulární tyrosinkinásová doména (TK). Poslední zmiňovaná je nejvíce evolučně konzervovaná část receptoru a její homologie s jinými peptidy s rodiny peptidů podobných insulinu může být až 85%. TK má enzymovou tyrosinkinásovou aktivitu (54-56) a fosforylací svých tyrosylových zbytků spouští kaskádu signalizačních dějů vedoucích k snížení hladiny cukrů v krevním řečišti.

Přestože jsou insulin se svým receptorem jedny z nejvíce zkoumaných molekul, dodnes se nepodařilo plně objasnit jejich vzájemnou interakci. Nedávné studie však dokázaly podpořit hypotézu indukovaného přizpůsobení, podle které po prvotním kontaktu

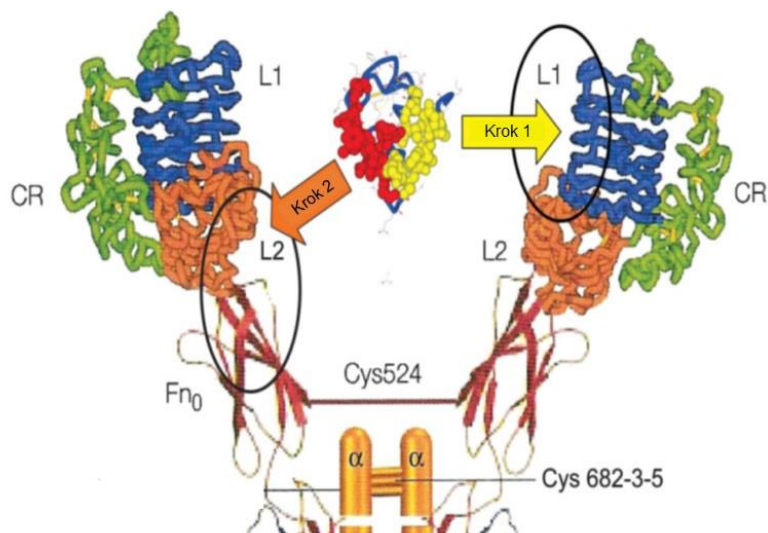
dochází ke konformačním změnám v insulinu i v jeho receptoru (57-61). S vazebným místem IR se zřejmě nejdříve dostane do kontaktu C-konec řetězce B insulinu (aminokyseliny B23-B26), který se následně odkloní od hydrofobního jádra molekuly, díky čemuž se odhalí aminokyseliny na N-konci řetězce A (57), které jsou klíčové pro interakci a které tak mohou dále reagovat s IR.

Díky rentgenostrukturní analýze se podařilo identifikovat aminokyseliny, které jsou v přímém kontaktu s primárním vazebným místem insulinového receptoru (Obr. 10). Z řetězce A jsou to GlyA1, IleA2, ValA3, TyrA19, AspA21 a v řetězci B LeuB6, GlyB8, ValB12, TyrB16, GlyB23, PheB24, PheB25 a TyrB26 (57). Tyto aminokyseliny jsou v molekule insulinu evolučně konzervovány.



Obr. 10: Interakce lidského insulinu se svým receptorem. Jsou zobrazeny aminokyseliny insulinu zúčastňující se kontaktu s receptorem. Upraveno podle (57).

Na insulinovém receptoru jsou dvě vazebná místa pro insulin – primární s vyšší vazebnou afinitou tvořené pravděpodobně doménami L1-CR-L2 a sekundární vazebné místo s nižší afinitou tvořené asi doménami Fn0-Fn1-Fn2. Je možné, že molekula insulinu se na první vazebné místo váže asymetricky. Hypoteticky část insulinu může interagovat s L1 doménou a druhá část molekuly s L2 doménou druhé α -podjednotky heterodimeru receptoru, jak je naznačeno na obrázku 11 (str. 21) (62).



Obr. 11: Schematické znázornění dvoukrokové vazby insulínu na receptor. Znázorněny jsou dvě α -podjednotky receptoru L1 (modrá)-CR (zelená)-L2 (červená) doména a F_n0 doména, obsahující insulín vázící části, společně s disulfidickými můstky. Insulín ve středu má první vázící se část označenou žlutě a druhou označenou červeně. Dvě šipky naznačují postupný proces interakce s jednotlivými doménami. Převzato a upraveno z (62).

1.5 Receptor pro peptidy v druhu *Drosophila melanogaster* podobné insulínu

Existence homologu savčího insulinového receptoru v druhu *D. melanogaster* poprvé naznačil Petruzzeli v roce 1985. Identifikoval glykoprotein, který vázal hovězí insulín specificky s afinitou 15 nM (63). Jeho sekvence cDNA je podobná sekvenci savčího receptoru pro insulín a IGF-I (33% homologie), až na podstatné N- a C-koncové prodloužení (64,65). Jedná se o heterotetramer složený ze dvou α podjednotek obsahujících ligand vázící domény a dvou transmembránových β podjednotek, které mají cytoplasmatickou tyrosinkinasonou doménu (64). Insulinový receptor octomilky obecně je tedy velice podobný strukturou a funkcí lidskému insulinovému receptoru včetně schopnosti spustit podobnou signální dráhu.

Veliké množství mRNA insulinového receptoru je exprimováno v nervové tkáni hmyzu během vývinu. Souvisí to s funkcí samotných DILP, které jsou v tomto stádiu nezbytné (viz kap. 1.3.2). Zjistilo se však, že DIR ovlivňuje velikost buněk a orgánů, a to ve dvou směrech – regulací proliferace buněk a také jejich velikosti (9).

1.6 Příprava molekul podobných insulinu

1.6.1 Celková chemická syntéza proteinů podobných insulinu

Počátkem 60. let 20. století byla vyvinuta metoda přípravy insulinových analogů celkovou chemickou syntézou (66,67), která umožňuje substituci modifikovanými nebo nekódovanými aminokyselinami na jakémkoliv místě molekuly insulinu. Možnost substituce nepřírozenými aminokyselinami představuje hlavní výhodu této metody oproti rekombinantní přípravě insulinu v geneticky modifikovaných organismech. Nevýhodou na druhé straně je finanční, časová a metodická náročnost.

Celková chemická syntéza má několik částí. Nejprve se připraví jednotlivé insulinové řetězce A a B metodou syntézy na pevné fázi od C-konce proteinu dle Merrifielda (68). C-koncová aminokyselina je připevněna na polymerním nosiči (např. pryskyřice) svým karboxylem. K ochráněné aminoskupině se postupně připojují další aminokyseliny svým volným C-koncem a chráněnou α -aminoskupinou. K dočasné ochraně α -aminoskupin se používá acidolabilní *tert*-butyloxykarbonylová skupina (Boc) nebo 9-fluorenylmethyloxykarbonylová skupina (Fmoc), kterou je možné odštěpit v bazickém prostředí (69,70). Po připojení aminokyseliny se odstraní N- α -chránicí skupina a použitím kondenzačních činidel se může připojit další aminokyselina s N-chráněným koncem. Po ukončení syntézy celého aminokyselinového řetězce je peptid odštěpen z polymerního nosiče a následně jsou odštěpeny chránicí skupiny postranních řetězců aminokyselin. Ty se používají v případě, že postranní řetězec obsahuje funkční skupiny.

Rozhodujícím krokem syntézy je spojení obou řetězců vytvořením správných disulfidických můstků. Řetězec A obsahuje čtyři a řetězec B dva cysteiny, a proto mohou vytvořit různé kombinace disulfidických můstků, přičemž jen jedna je správná a biologicky aktivní. Často používaná a jednoduchá je metoda oxidační rekombinace dle Chance et al. (70), která využívá schopnosti řetězců insulinu spontánně vytvářet správnou terciární strukturu. Oba řetězce jsou syntetizovány ve formě S-sulfonátů, které jsou stálé vůči oxidaci a nehrozí nežádoucí reakce. Následně stoichiometrickou redukcí S-sulfonátů na volné thiolové skupiny a oxidací vzdušným kyslíkem se postupně formují disulfidické můstky. Tato metoda poskytuje uspokojivé výtěžky insulinu, kolem 10% (70), přičemž nezreagované či špatně zformované řetězce lze recyklovat, tj. převést znovu na formu S-sulfonátů, přečistit na HPLC a znova použít.

1.6.2 Semisyntéza proteinů podobných insulinu

Dalším způsobem přípravy molekul podobných insulinu je semisyntetická metoda, která se ale většinou omezuje na modifikace v C-koncové části řetězce B. Základem je odštěpení C-koncové části řetězce B insulinu proteasou, jako například trypsin nebo pepsin, a následné připojení požadovaného modifikovaného peptidu stejnou proteasou za pozměněných reakčních podmínek (např. rozdílné pH, přítomnost organického rozpouštědla, aj.) (71).

1.6.3 Rekombinantní příprava proteinů podobných insulinu

Velmi požívanou metodou je rekombinantní příprava proteinů. Jde o biosyntézu pomocí mikroorganismů jako jsou bakterie *E. coli* nebo kvasinky *S. cerevisiae*, do kterých je vpraven a následně exprimován uměle připravený plazmid s genetickým kódem pro požadovaný protein. Touto metodou lze připravit analogy insulinu, ovšem jen s přirozenými substituovanými aminokyselinami. Hlavním využitím je však průmyslová výroba lidského insulinu, jenž umožňuje získávat protein relativně levně a ve velkém množství (72).

2. CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce byla syntéza a charakterizace analogu peptidu 5 z druhu *Drosophila melanogaster* podobného insulínu (DILP5) celkovou chemickou syntézou s rekombinací jednotlivých řetězců přes jejich S-sulfonátové formy. Analog DILP5 se skládá z řetězce A lidského insulínu a řetězce B z DILP5 a zároveň má vyměněny všechny methioniny v polohách B14, B16 a B28 za aminokyselinu norleucin.

3. MATERIÁL

acetonitril – Scharlau Chemie, Sentmenat, Španělsko
diethylether – Penta, Chrudim, ČR
N,N-dimethylformamid – Fluka, Buchs, Švýcarsko
dithiotreitol – Thermo Scientific, Rockford, USA
ethandithiol – Fluka, Buchs, Švýcarsko
fenol – Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Fmoc-chráněné aminokyseliny – Novabiochem, Lucern, Švýcarsko
glycin – Sigma, St. Louis, USA
guanidinhydrochlorid – Sigma, St. Louis, USA
kyselina chlorovodíková – Penta, Chrudim, ČR
hexafluorofosfát 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronia – Sigma-Aldrich,
Steinheim, Německo
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonová kyselina – Sigma, St. Louis, USA
hydrogenuhličitan amonný – Sigma, St. Louis, USA
hydroxid sodný – Penta, Chrudim ČR
kyselina octová 99% - Penta, Chrudim. ČR
Sephadex G10, Sephadex G50 – Pharmacia, Uppsala, Švédsko
tetrathionan sodný – Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
trifluorooctová kyselina – Fluka, Buchs, Švýcarsko
thioanizol – Fluka, Buchs, Švýcarsko
triisopropylsilan – Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
tris-(hydroxymethyl)-aminomethan – Sigma, St. Louis, USA
Wangova pryskyřice – Wang resin, Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko

4. METODY

4.1 Štěpení vepřového insulinu

Vepřový insulin firmy Spofa byl ve formě komplexu se zinkem. 1 g vepřového insulinu byl rozpuštěn v 70 ml 0,25 M HCl. Směs se postupně za vzniku sraženiny přilévala do 1 litru vychlazeného acetonu (4°C). Roztok se míchal přes noc ve 4°C. Suspenze se centrifugovala při 2000 g a 4°C 20 minut. Sraženina se rozpustila v 20 ml 10% kyseliny octové a lyofilizovala se.

4.1.1 Sulfitolyza vepřových insulinových řetězců

Řetězce insulinu zbavené zinku s volnými thiolovými skupinami byly převedeny sulfitolyzačním pufrém (100 mM Tris, 7 M GuaHCl, 250 mM Na₂SO₃, 80 mM Na₂S₄O₆, na pH 8,6 upraveno HCl) do formy S-sulfonátů. Sraženina řetězců insulinu byla rozpuštěna v 30 ml pufru a míchaná 3 hodiny při laboratorní teplotě.

4.1.2 Oddělení vepřových insulinových řetězců gelovou chromatografií

Směs řetězců byla nanášena na nízkotlakou chromatografickou kolonu Sephadexu G10 ($V_T = 1000$ ml). Mobilní fází byl 50 mM NH₄HCO₃, rychlost průtoku 0,7 ml/min, frakce byly jímány po 15 minutách automatickým sběračem a chromatografie byla prováděna za laboratorní teploty. Po ukončení byla proměřena absorbance jednotlivých frakcí při vlnové délce 276 nm na spektrofotomeru Lambda 25 od firmy Perkin Elmer. Frakce, které vykazovaly přítomnost řetězců, byly slity a lyofilizovány.

Lyofilizát byl rozpuštěn v 10 ml 50 mM NH₄HCO₃ a směs nanášena na kolonu Sephadexu G50 ($V_T = 750$ ml). Mobilní fází byl 50 mM NH₄HCO₃. Frakce byly jímány za stejných, výše zmiňovaných podmínek. Byla měřena absorbance jednotlivých frakcí při vlnové délce 276 nm. Frakce obsahující A, respektive B řetězec vepřového insulinu, byly spojeny a lyofilizovány.

Přítomnost řetězců A a B vepřového insulinu byla ověřena analyticky na HPLC a jednotlivého řetězce byly identifikovány hmotovou spektroskopií.

4.2 Příprava řetězce B peptidu 5 z *Drosophila melanogaster* podobného insulinu

Řetězec B proteinu DILP5 byl syntetizován v servisním pracovišti Syntéza peptidů ÚOCHB AV ČR na automatizovaném syntetizátoru ABI 433A firmy Applied Biosystems. Řetězce se připravují metodou syntézy na pevné fázi podle Merrifielda (64). α -Aminoskupiny byly chráněny funkční skupinou 9-fluorenyl-methoxykarbonyl (Fmoc), který lze odštěpit v bazickém prostředí. Postranní funkční skupiny jednotlivých aminokyselin byly chráněny skupinami Boc, *t*Bu, Trt a Pbf odštěpitelnými v kyselém prostředí. Pro syntézu byla použita Wangova pryskyřice předem substituovaná aminokyselinou threonin. Celá syntéza byla prováděna v měřítku 0,1 mmol.

Jednotlivý kondenzační cyklus trval 30 minut a byl proveden dvakrát, přičemž v každém cyklu bylo přidáno 10-násobné množství dané Fmoc-chráněné aminokyseliny. Použitými kondenzačními činidly byly HBTU, HOBt a Dipea v DMF. Fmoc skupina byla po každém kroku odstraněna 30% piperidinem v DMF. Po dokončení syntézy byl produkt promyt a vysušen pomocí DCM.

4.2.1 Štěpení peptidu 5 z *Drosophila melanogaster* podobného insulinu z Wangovy pryskyřice

Syntetizovaný řetězec B proteinu DILP5 byl odštěpen z Wangovy pryskyřice štěpící směsí: 92% (v/v) TFA, 2,2% (v/v) deionizované vody, 2,2% (v/v) thioanisolu, 1% (v/v) EDT, 2,2% (w/w) fenolu a 0,4% (v/v) TIS. Štěpící směs byla přidána k řetězcům a míchána 2 hodiny za laboratorní teploty. Následně byla směs přefiltrována přes fritu velikosti S3 do 200 ml vychlazeného diethyletheru. Vzniklá sraženina peptidu byla přefiltrována přes fritu velikosti S4, propláchnuta 3-krát 50 ml studeným diethyletherem a vysušena.

4.2.2 Konverze peptidu 5 z *Drosophila melanogaster* podobného insulinu na S-sulfonáty

Volné SH-skupiny cysteinů syntetizovaného peptidu byly převedeny na formu S-sulfonátů pomocí 25 ml sulfitolyzačního pufru (viz kap. 4.1.1). Směs byla míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě a poté odsolena na koloně Sephadexu G10.

4.2.3 Odsolení peptidu 5 z *Drosophila melanogaster* podobného insulinu gelovou chromatografií

Peptid v sulfitolyzačním roztoku byl odsolen na nízkotlaké chromatografické koloně Sephadexu G10 ($V_T = 1000$ ml). Chromatografie probíhala při laboratorní teplotě, rychlost průtoku byla 0,7 ml/min, frakce byly jímány automatickým sběračem každých 15 minut a mobilní fáze byl 50 mM NH_4HCO_3 . Stálý tlak a průtok zabezpečovala peristaltická pumpa Gilson Miniplus 3. Po ukončení gelové chromatografie byla měřena absorbance frakcí při vlnové délce 258 nm na spektrofotometru Lambda 25 firmy Perkin Elmer. Frakce obsahující peptid byly spojeny a lyofilizovány.

Přítomnost řetězce B DILP5 v lyofilizátu byla ověřena hmotovou spektroskopií. Lyofilizát byl postupně rozpouštěn ve směsi 10% kyseliny octové a 80% ACN (2:1) a přečišťován na preparativní koloně na RP-HPLC (viz kap. 4.2.4).

4.2.4 Preparace řetězců peptidů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) byla prováděna na přístrojích firmy Waters (čerpadlo Waters 600, UV/VIS detektor Waters 2487). Data byla zpracována chromatografickým programem Clarity Lite firmy Data Apex.

Analytické využití RP-HPLC

Pro analýzu reakční směsi a ověření čistoty řetězců nebo výsledné molekuly byla pro analytické provedení RP-HPLC použita analytická kolona Nucleosil 120-5-C18 o rozměrech 250 x 4 mm firmy Macherey-Nagel. Gradientová eluce (Tab. 1, str. 29) byla prováděna při průtoku 1 ml/min a v roztoku o zvyšující se koncentraci ACN v deionizované vodě obsahující 0,1% TFA. Absorbance eluátu se měřila při vlnových délkách 218, 276 nebo 258 nm.

Preparativní využití RP-HPLC

Po primárním odsolení řetězců gelovou chromatografií byly peptidy následně přečištěny a izolovány preparativním provedením RP-HPLC. K tomuto účelu byla použita semipreparativní kolona Nucleosil 100-7-C18 o rozměrech 250 x 8 mm a preparativní kolona Nucleosil 120-5-C18 o rozměrech 250 x 21 mm, obě od společnosti Macherey-Nagel. Gradientová eluce (Tab. 1) byla prováděna při průtoku 3 ml/min a 9 ml/min roztokem o zvyšující se koncentraci ACN v deionizované vodě, která obsahovala 0,1% TFA. Detekce látek byla prováděna na základě absorpce záření při vlnových délkách 218, 276 nebo 258 nm.

Tab. 1: Gradientové eluce použité při RP-HPLC řetězce B DILP5. Gradient 1 byl použit pro analytické stanovení, gradient 2 pro preparaci řetězců a gradient 3 pro semipreparaci.

gradient 1	
čas / min	0 1 21 34 36 37 37,1
Obsah 80% ACN / %	10 35 45 55 90 90 10
gradient 2	
čas / min	0 30 31
Obsah 80% ACN / %	10 100 10
gradient 3	
čas / min	0 1 21 34 36 37 37,1
Obsah 80% ACN / %	10 35 45 55 90 90 10

4.3 Rekombinace řetězce A lidského insulinu a řetězce B peptidu 5 z *Drosophila melanogaster* podobného insulinu

Při rekombinaci dochází k propojení dvou řetězců molekuly insulinu (resp. analogu nebo podobné molekuly) A a B dvěma disulfidickými můstky a vytvoření třetího disulfidického můstku v řetězci A. Rekombinační reakce je složena ze dvou částí: redukce a oxidace. V průběhu první části se redukují S-sulfonátové skupiny řetězců na thiolové skupiny, které jsou v druhé části pomalu oxidovány vzdušným kyslíkem za vzniku disulfidických můstků.

4.3.1 Redukce sloučenin v rekombinační reakci

Řetězec A lidského insulinu a řetězec B proteinu DILP5 byly rozpuštěny v odvzdušněném 0,1 M Gly/NaOH pufru o pH 10,5 a smíchány v hmotnostním poměru A:B = 2:1. Přesné koncentrace řetězců byly předem stanoveny spektrofotometricky

při vlnové délce 280 nm pro řetězec A (ϵ je $3480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 257,5 nm pro řetězec B (ϵ je $390 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) na spektrofotometru Lambda 25 firmy Perkin Elmer a podle ní bylo vypočteno přesné množství DTT odpovídající 1,1 ekvivalentu S-sulfonátových skupin. Do 3 ml reakční směsi obsahující řetězce A a B bylo přidáno přesné množství DTT rozpuštěného v 0,1 M Gly/NaOH pufru. Směs byla ponechána za stálého míchání 1 hodinu za laboratorní teploty bez přístupu kyslíku.

4.3.2 Oxidace sloučenin v rekombinační reakci

Redukce byla ukončena přidavkem 1,5násobku objemu provzdušněného 0,1 M Gly/NaOH pufru o pH 10,5. Směs byla ponechána za stálého míchání a přístupu vzdušného kyslíku v chladové místnosti při 4°C čtyři dny. Oxidace byla ukončena přidáním několika ml 99% kyseliny octové, dokud nedošlo k zakalení a opětovnému vyčerení směsi.

Po ukončení oxidace byla směs nanesena na chromatografickou kolonu Sephadexu G50 ($V_T = 240 \text{ ml}$). Gelová chromatografie probíhala za laboratorní teploty, průtoku 0,5 ml/min a stálého tlaku, což bylo zabezpečeno peristaltickou pumpou Gilson Minipuls 3. Mobilní fází byla 1 M kyselina octová a frakce byly jímány každých 12 minut.

Následně byla měřena absorbance jednotlivých frakcí při vlnové délce 258 nm na spektrofotometru Lambda 25 (Perkin Elmer). Frakce vykazující přítomnost proteinu byly spojeny a lyofilizovány. Lyofilizát byl rozpuštěn v roztoku 25% (v/v) ACN v deionizované vodě. Semipreparativním provedení RP-HPLC byla výsledná molekula čištěna a její identita ověřena hmotnostní spektrometrií.

4.4 Identifikace produktů reakcí hmotnostní spektrometrií

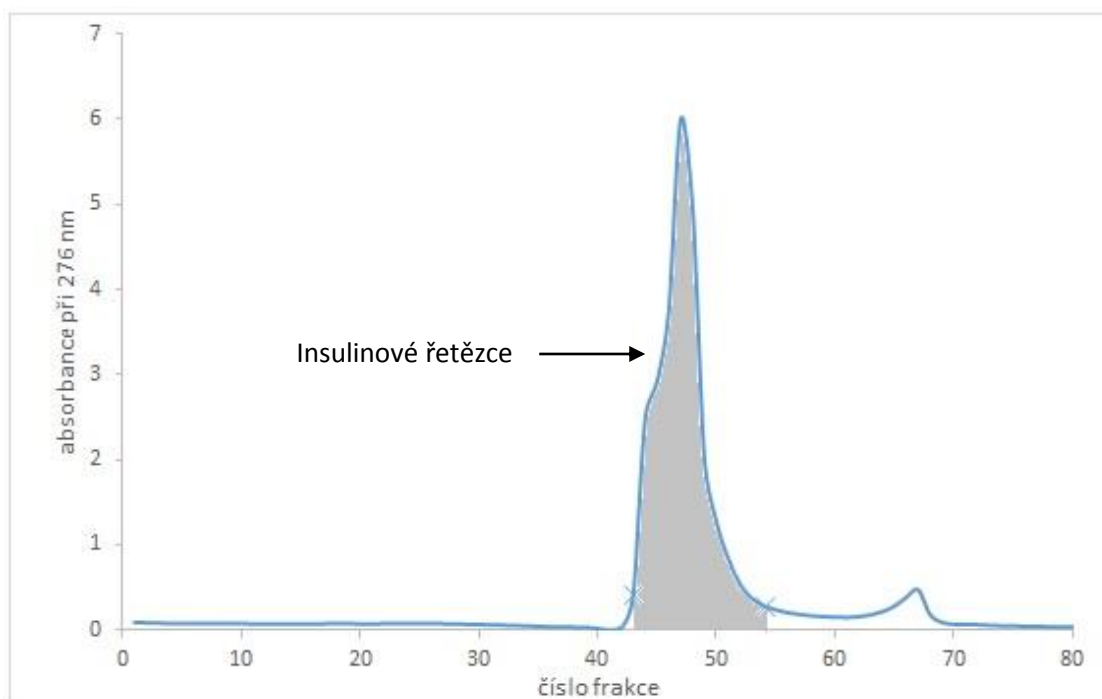
Identifikace jednotlivých řetězců vepřového insulinu, řetězce B DILP5 i výsledné molekuly složené z řetězce A lidského insulinu a řetězce B DILP5 byla provedena hmotnostní spektrometrií v Laboratoři hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR přístrojem LTQ Orbitrap XL firmy Thermo Fisher Scientific. Jde o hybridní spektrofotometr, který pracuje s Fourierovou transformací a kombinuje metody lineární iontové pasti a orbitrapu (elektrostatická past).

5 VÝSLEDKY

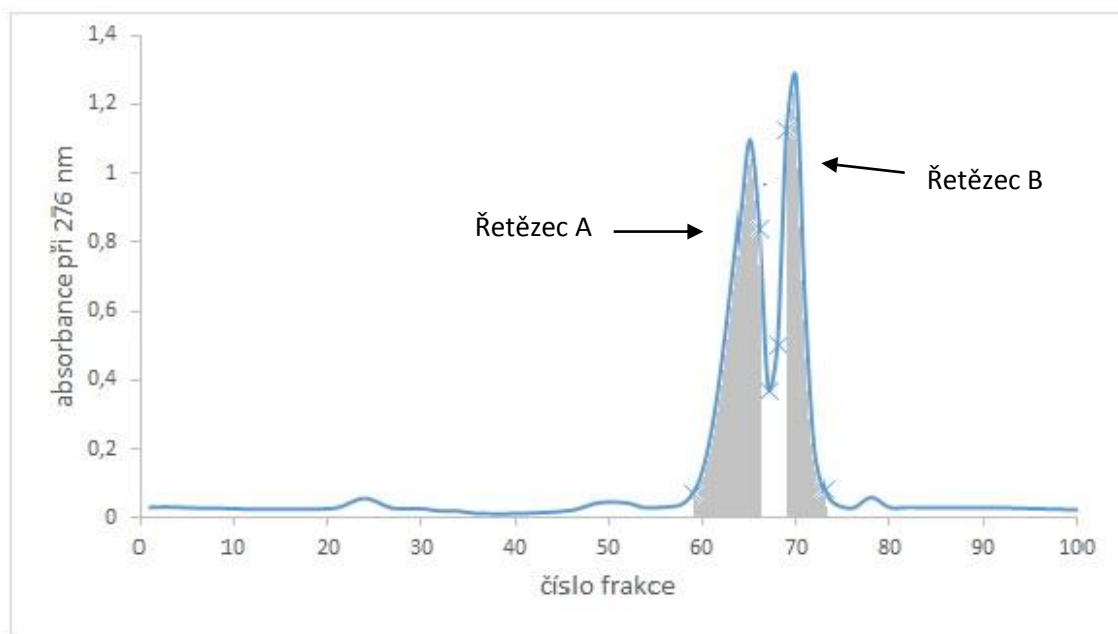
5.1 Příprava řetězce A lidského insulinu

Řetězec A byl připraven z vepřového insulinu zbavením zinku, rozdělením řetězců a následným převedením na S-sulfonáty sulfitolyzačním pufrem.

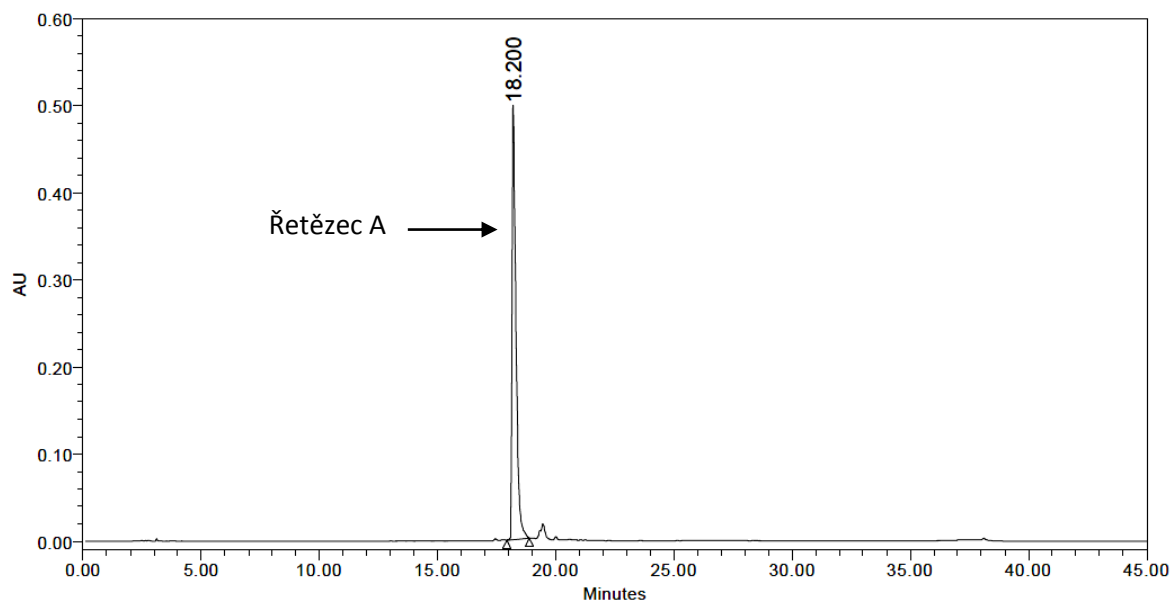
Směs byla po sulfitolyze rozdělena gelovou chromatografií na koloně Sephadexu G10 ($V_T = 1000$ ml). Přesné podmínky jsou popsány v kapitole 4.1.2. Poté byla měřena absorbance frakcí při vlnové délce 276 nm (Obr. 12). Frakce obsahující insulinové řetězce (43-54) byly spojeny a lyofilizovány. Následně byla směs řetězců A a B vepřového insulinu nanesena na chromatografickou kolonu Sephadexu G50 ($V_T = 750$ ml) za stejných podmínek. Měřením absorbance při vlnové délce 276 nm bylo potvrzeno rozdělení řetězců vepřového insulinu (Obr. 13, str. 32). Spojeny a lyofilizovány byly frakce 59-66, 67-68 a 69-73. Pro identifikaci a čistotu byla provedena analytická RP-HPLC (Obr. 14, str. 32; Obr. 15, str. 33) a hmotnostní spektrometrie (Obr. 16, str. 34). V Tab. 2 (str. 33) jsou uvedeny teoretické a experimentálně získané molekulární hmotnosti získaných insulinových řetězců.



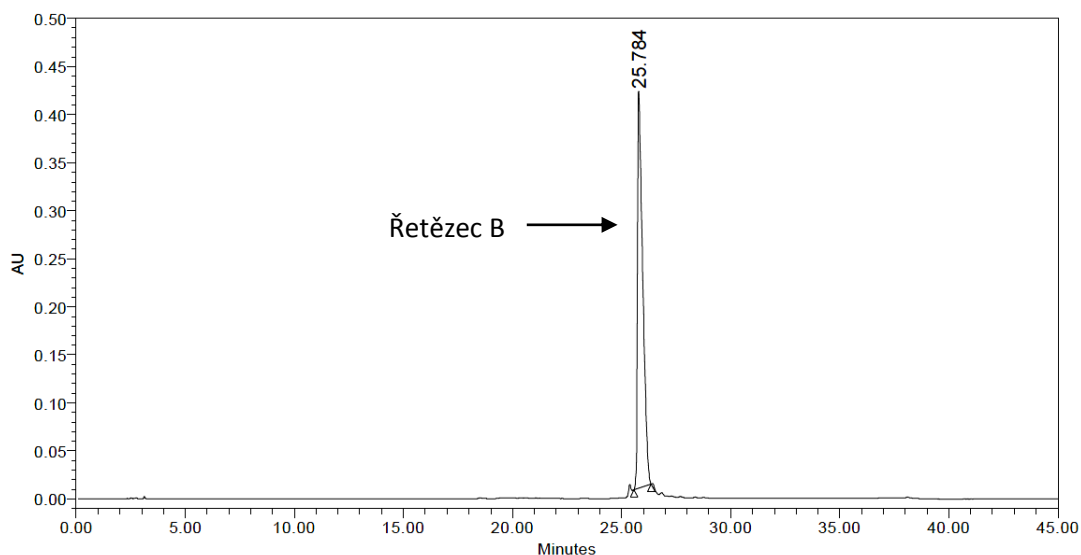
Obr. 12: Odsolení S-sulfonátů řetězců insulinu na koloně Sephadexu G10.



Obr. 13: Rozdělení S-sulfonátů řetězců A a B vepřového insulinu na koloně Sephadexu G50.



Obr. 14: RP-HPLC frakce 65 obsahující řetězec A vepřového insulinu. Provedeno na analytické koloně Nucleosil 120-5-C18 firmy Macherey-Nagel.

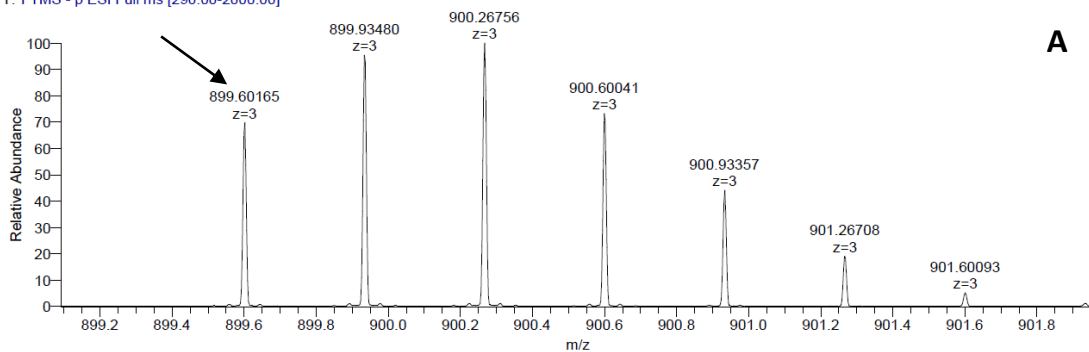


Obr. 15: RP-HPLC frakce 70 obsahující řetězec B vepřového insulinu. Provedeno na analytické koloně Nucleosil 120-5-C18 firmy Macherey-Nagel.

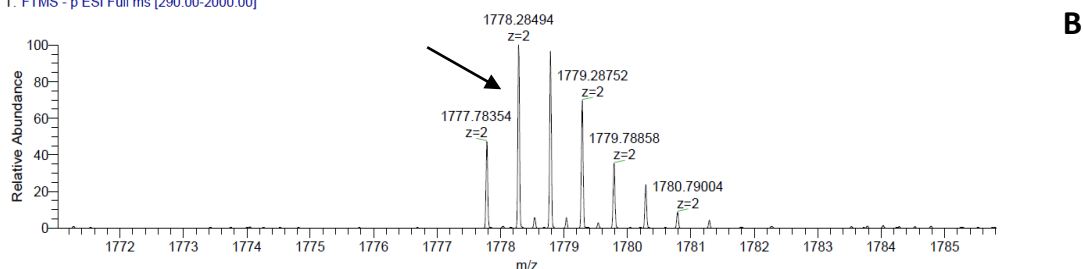
Tab. 2: Molekulová hmotnost získaného peptidu, $[M]_{\text{teor}}$ označuje předpokládanou vypočtenou monoizotopickou molekulovou hmotnost, $[M]_{\text{exp.}}$ označuje experimentálně získanou monoizotopickou molekulovou hmotnost.

<i>Peptid</i>	$[M]_{\text{teor}}$	$[M]_{\text{exp}}$
Řetězec A vepřového insulinu S-sulfonátu	2701,80	2701,83
Řetězec B vepřového insulinu S-sulfonátu	3557,59	3557,57

Zakova, R480-I, neg #34-48 RT: 0.93-1.31 AV: 15 NL: 9.06E6
T: FTMS - p ESI Full ms [290.00-2000.00]



Zakova, R480-II, neg #51-55 RT: 1.39-1.50 AV: 5 NL: 5.01E5
T: FTMS - p ESI Full ms [290.00-2000.00]

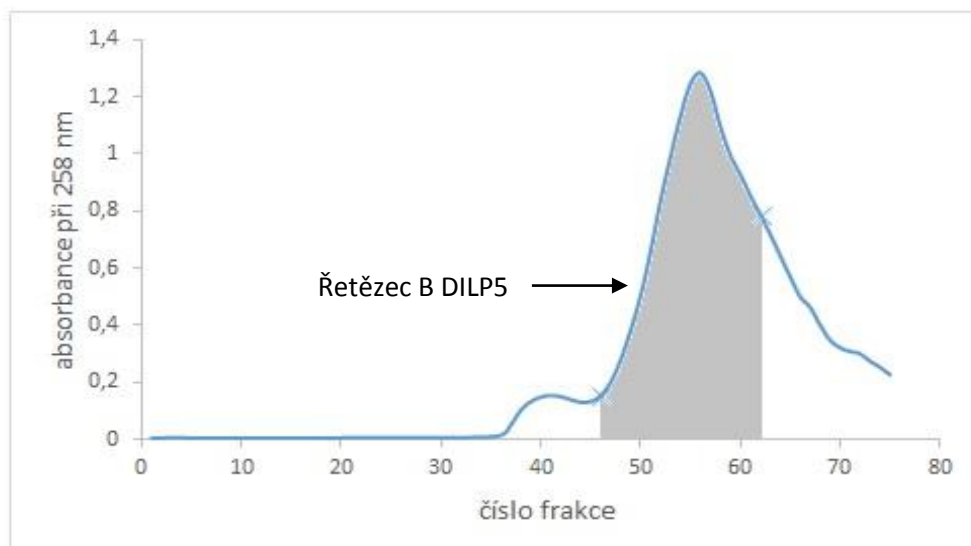


Obr. 16: Hmotnostní spektra řetězců vepřového insulinu ve formě S-sulfonátů: (A) řetězec A; (B) řetězec B. Šípky ukazují na monoizotopický signál podílu m/z produktů.

5.2 Příprava řetězce B peptidu 5 z *Drosophila melanogaster* podobného insulinu

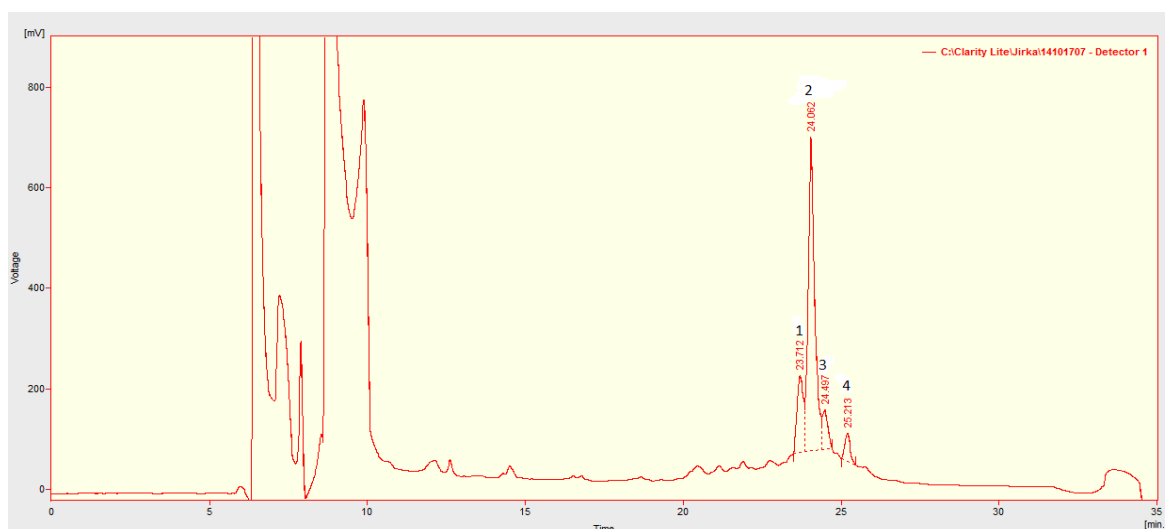
Řetězec B DILP5 byl po syntéze na pevné fázi odštěpen z Wangovy pryskyřice, zbaven chránících skupin a nakonec převeden na formu S-sulfonátu sulfitolizačním puřem.

Směs byla následně rozdělena a odsolena gelovou chromatografií na koloně Sephadexu G10 ($V_T = 1000$ ml) za podmínek popsanych v kapitole 4.2.3. Poté byla měřena absorbance jednotlivých frakcí při 258 nm (Obr. 17, str. 35). Frakce 46-62 byly slity a lyofilizovány.



Obr. 17: Odsolení S-sulfonátu B-řetězce DILP5 na koloně Sephadexu G10.

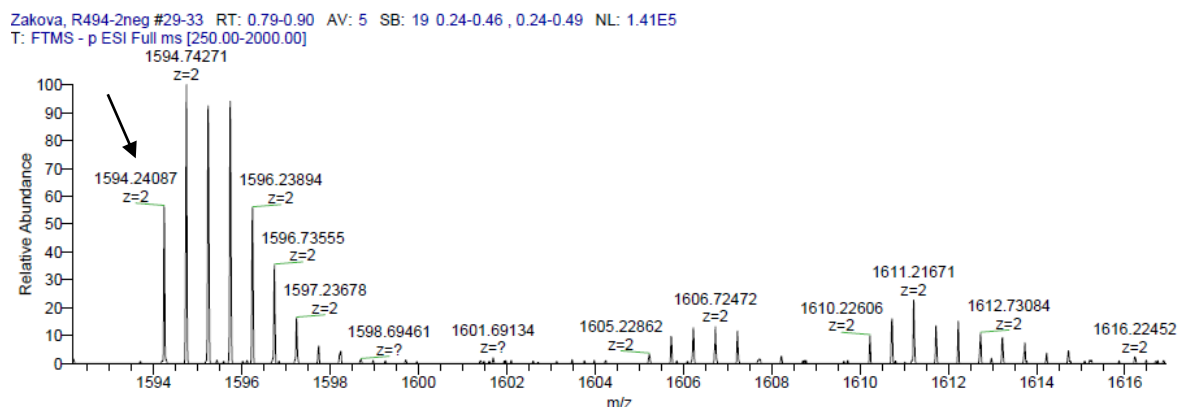
Dalším krokem bylo přečištění řetězce B DILP5 preparativním provedením RP-HPLC na koloně Nukleosil 120-5-C18 firmy Waters. Přesné podmínky separace jsou uvedeny v kapitole 4.2.4. Na obrázku 18 jsou vyznačeny čtyři píky, které byly sbírány. Pomocí hmotnostní spektrometrie se zjistilo, že řetězec B DILP5 ve formě S-sulfonátů obsahuje eluční vrchol č. 2 (Tab. 3, str. 36; Obr. 19, str. 36).



Obr. 18: RP-HPLC směsi obsahující řetězec B DILP5 na preparativní koloně Nucleosil 120-5-C18 firmy Macherey-Nagel.

Tab. 3: Molekulová hmotnost připraveného peptidu, $[M]_{\text{teor}}$ označuje předpokládanou vypočtenou monoizotopickou molekulovou hmotnost, $[M]_{\text{exp.}}$ označuje experimentálně získanou monoizotopickou molekulovou hmotnost.

<i>Peptid</i>	$[M]_{\text{teor}}$	$[M]_{\text{exp}}$
Řetězec BDILP5-S-sulfonát	3189,52	3190,48

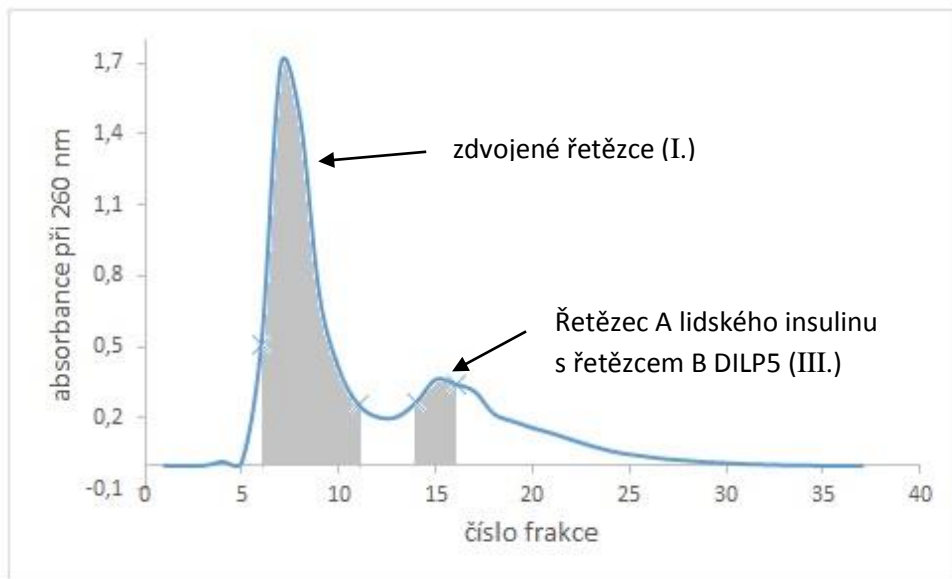


Obr. 19: Hmotnostní spektrum vzorku druhého elučního vrcholu obsahujícího řetězec B DILP5. Šípka ukazuje na monoizotopický signál m/z produktu.

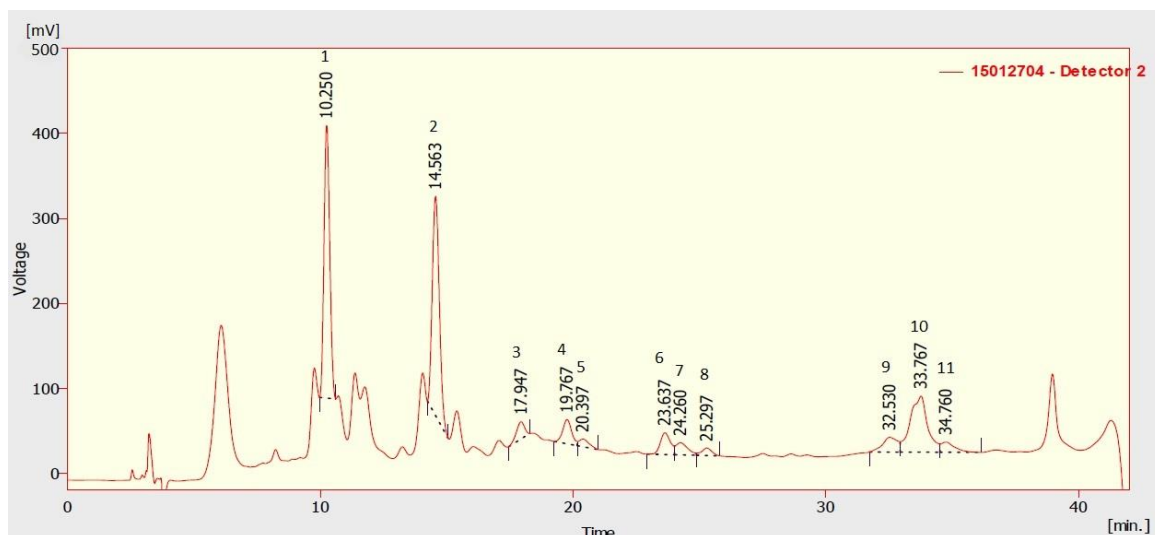
5.3 Rekombinace řetězce A lidského insulinu a řetězce B peptidu 5 z *Drosophila melanogaster* podobného insulinu

Připravený řetězec A lidského insulinu a řetězec B DILP5 ve formě sulfonátů byly podrobeny redukčním a následně oxidačním reakcím. Po ukončení rekombinace byla směs nanášena na kolonu Sephadexu G50 ($V_T = 240$ ml) v 1 M kyselině octové a složky byly separovány. Přesné podmínky jsou popsány v kapitole 4.3.2. Obsah frakcí byl detekován spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm (Obr. 20, str. 37). Frakce v skupinách I. (6-11), II. (12-13), III. (14-16) a IV. (17-20) byly lyofilizovány. Skupina III. (frakce 14-16) byla rozpuštěna v roztocích 0,1% TFA a 80% ACN v 0,1% TFA v poměru 2:1 a následně preparovaná pomocí RP-HPLC na semipreparativní koloně C18 (viz kap. 3.5; Obr. 21, str. 38). Všechny vyznačené eluční vrcholy byly sbírány a následně analyzovány hmotnostní spektrofotometrií. Byla spočtena teoretická relativní hmotnost proteinu (Tab. 4, str. 38) a díky této informaci se hmotnostní spektrometrií potvrdila přítomnost

rekombinovaného proteinu ve třech posledních elučních vrcholech (Obr. 22, str. 39). Následným analytickým provedením RP-HPLC (Obr. 23, str. 39) se rozdělil eluční vrchol číslo 10 na čtyři různé frakce a hmotnostní spektroskopii jednotlivých frakcí se potvrdila přítomnost jak produktu, tak i dvou dalších peptidů (Obr. 24, str. 40), které se přes analytické provedení RP-HPLC nepodařilo oddělit.



Obr. 20: Separace složek směsi po rekombinační reakci na koloně Sephadexu G50 v 1 M kyselině octové. Protein složený z řetězce A lidského insulínu a řetězce B DILP5 obsahovaly frakce 14-16.

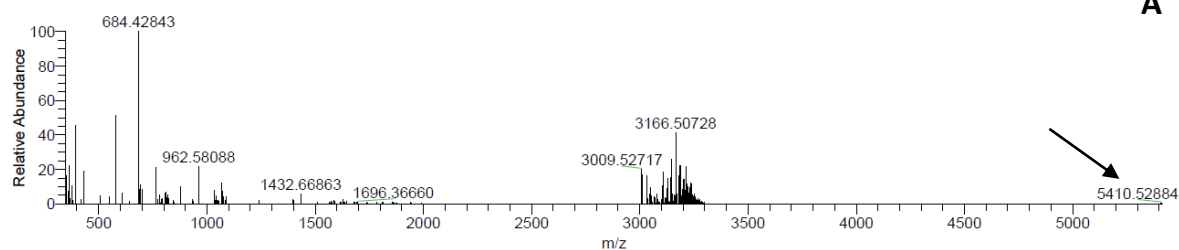


Obr. 21: RP-HPLC spojených frakcí po rekombinační reakci řetězce A lidského insulinu a řetězce B DILP5 po předchozím odsolení gelovou chromatografií. Provedeno na semipreparativní koloně Nucleosil 100-7-C18 firmy Macherey-Nagel.

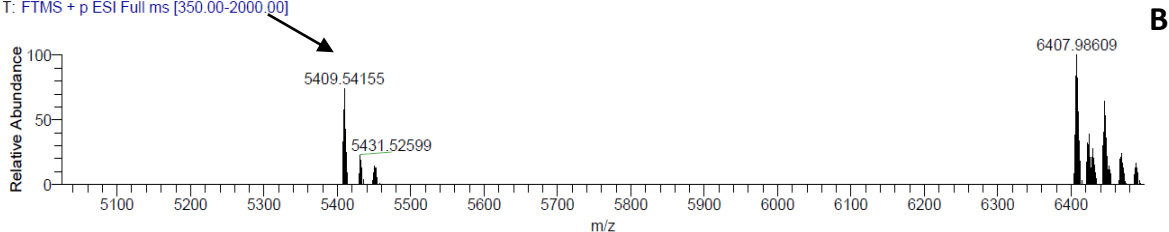
Tab. 4: Molekulová hmotnost připraveného proteinu, $[M]_{\text{teor}}$ označuje předpokládanou vypočtenou průměrnou molekulovou hmotnost, $[M]_{\text{exp}}$ označuje experimentálně získanou průměrnou molekulovou hmotnost.

<i>Rekombinant řetězce A lidského a řetězce B DILP5 insulinu</i>	$[M]_{\text{teor}}$	$[M]_{\text{exp}}$
Eluční vrchol 9	5409,26	5410,53
Eluční vrchol 10		5409,54
Eluční vrchol 11		5410,53
Frakce 2 elučního vrcholu 10 (viz Obr. 23)		5409,55

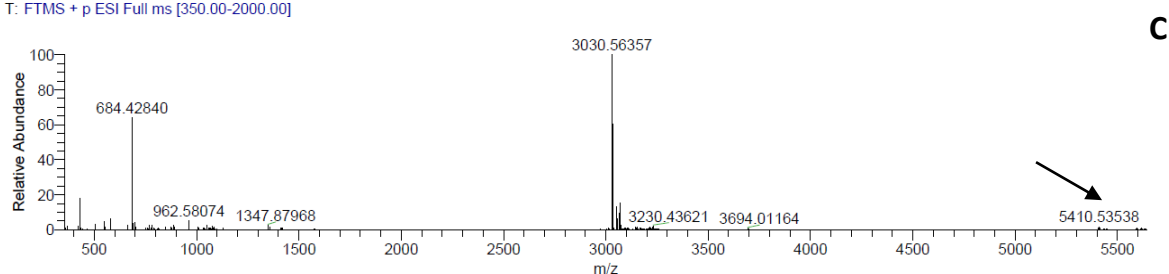
Zakova, R1008-III-9_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 1.18E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



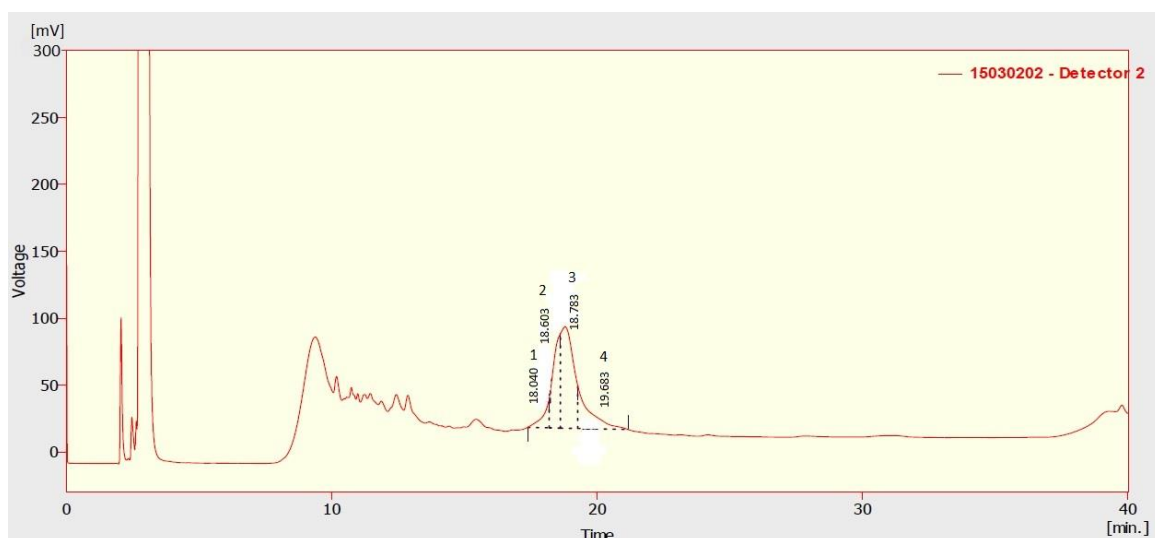
Zakova, R1008-III-10_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 1.65E4
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



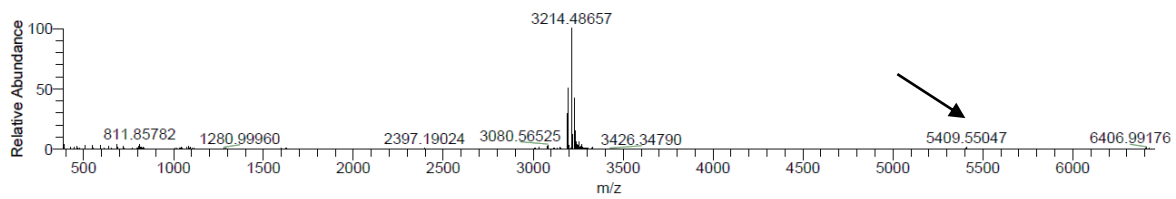
Zakova, R1008-III-11_XT_00001_M_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 3.97E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Obr. 22: Hmotnostní spektra elučních vrcholů vykazujících přítomnost připraveného proteinu: (A) eluční vrchol č.9, (B) eluční vrchol č.10, (C) eluční vrchol č.11. Šípky ukazují na signál průměrného podílu m/z produktů.



Obr. 23: RP-HPLC elučního vrcholu číslo 10 (viz Obr. 21, str. 38) na semipreparativní koloně Nucleosil 100-7-C18 Macherey-Nagel.



Obr. 24: Hmotnostní spektrum druhé sbírané frakce (viz Obr. 23, str. 39) s modifikovaným insulinem. Šípka ukazuje na průměrný podíl m/z produktu.

6 DISKUSE

V této bakalářské práci byl navržen analog peptidu 5 z mušky *Drosophila melanogaster* podobného insulinu (DILP5), skládajícího se z řetězce A lidského insulinu a řetězce B peptidu 5 podobného insulinu. Analog měl zároveň všechny methioniny v řetězci B DILP5 (polohy B14, B16, B28) vyměněny za aminokyselinu norleucin. Norleucin se často používá jako analog methioninu, jeho struktura je téměř isosterická s methioninem, ale neobsahuje síru. Výhodou je, že norleucin se nemůže oxidovat na sulfoxid jako methionin. Takto připravený analog by byl zajímavý z hlediska studia vazby na insulinový receptor, interakce s vazebným proteinem IMP-L2 a možnosti spuštění signalizační kaskády

v savčích buňkách obsahujících insulinový receptor. Dalším důležitým cílem bylo ověřit možnost celkové chemické syntézy DILP5.

I přes intenzivní výzkum různých hormonů a růstových faktorů, jež hrají roli v růstu buněk, buněčném dělení a buněčné smrti, je v této oblasti výzkumu mnoho nejasností. Stále se například neví, čím je ovlivněn růst a velikost jednotlivých orgánů i celého těla a jakou roli v tomto hrají zejména insulin, růstový hormon a jeho mediátory, IGF-I a II. Genetické studie na nižších živočiších jako jsou hmyz, hlístice nebo měkkýši, jež mají mnoho metabolických i mitogenních procesů evolučně konzervovaných a tudíž velmi podobných člověku, by mohly na mnoho otázek odpovědět. Právě *Drosophila melanogaster* (octomilka obecná), jež patří k velmi dobře prozkoumaným živočichům, se už mnoho let používá jako modelový organismus ve výzkumu regulace metabolických a mitogenních procesů. Právě díky vysoké evoluční konzervovanosti základních biologických procesů se v octomilce dají studovat základy různých lidských nemocí, jako jsou diabetes, obezita nebo rakovina (31). Mimoto výzkum na *D. melanogaster* pomohl vývoji mnoha různých technik genetické manipulace a jiných metodologií.

Insulin/IGF signální dráha (IIS) hraje podstatnou roli v růstu, reprodukci, metabolismu, resistenci proti stresu a délce života. Tato dráha je evolučně velmi konzervovaná a mnoho jejích částí je velmi podobných jak v člověku, tak v *D. melanogaster*. *Drosophila melanogaster* má 7 peptidů podobných insulinu (DILP1-7), jež mají různé funkce v různých stádiích života a v různých částech mušičího organismu, ale

má pouze jeden receptor, jež stojí na počátku celé signalizační dráhy. Savci mají běžně jeden insulin a dva IGF, ale tři různé receptory (dvě isoformy insulinového receptoru IR-A a IR-B a IGF-1R), které ovlivňují spuštění buď metabolické nebo mitogenní dráhy. S insulinem nejpodobnější jsou DILP1-5, kdežto DILP6 a DILP7 jsou více podobné IGF-I nebo relaxinu. Největší sekvenční homologii s lidským insulinem mají DILP2 (35%) a DILP5 (27,8%).

Tato práce se zaměřila na DILP5, který je zodpovědný za vstřebávání cukrů z hemolymfy v *D. melanogaster* a má tudíž podobnou funkci jako insulin v savcích. Je také schopen snížit hladinu cukru u potkanů *in vivo* a je schopen se vázat do jisté míry také na lidský insulinový receptor (52). DILP5 je také schopen se vázat na vazebný protein IMP-L2 (45). Dvě varianty DILP5 se podařilo rekombinantní připravit a jejich krystalová struktura byla určena v roce 2011 (52). Dosud však nebyl připraven žádný analog DILP5, stejně jako nebyl připraven žádný analog jakéhokoliv jiného DILP. Kombinovaný analog lidského insulinu a DILP5 by mohl ukázat, které části DILP5 nebo insulinu jsou zodpovědné za vazbu na daný insulinový receptor a jak by takový analog mohl ovlivnit signalizační dráhy uvnitř buňky, případně jak ovlivňují procesy přímo v mušce *in vivo*. Analog jsme připravovali rekombinační reakcí obou řetězců a skládal se z řetězce A lidského insulinu a řetězce B DILP5. Všechny methioniny původně přítomné v řetězci B DILP5 (B12, B16, B28) byly zaměněny za norleucin, aby se zabránilo vzniku methionin-sulfoxidů, které jsou špatně oddělitelné vysokotlakou kapalinovou chromatografií. Řetězec A lidského insulinu byl získán redukcí vepřového insulinu, jehož řetězec A je identický s lidským. Řetězec B DILP5 byl získán celkovou chemickou syntézou na pevné fázi. Oba řetězce byly převedeny na formu S-sulfonátů a poté byly spojeny rekombinační reakcí. Výtěžek rekombinační reakce byl velmi nízký, a i když se nám podařilo identifikovat produkt v rekombinační směsi, nebyli jsme schopni ho oddělit od vedlejších produktů reakce i při opakovaných pokusech o přečištění. Rekombinační reakce insulinu dává obecně nižší výtěžky (okolo 10%), ale její výhodou je, že řetězce lze znovu recyklovat, vyčistit, převést na S-sulfonáty a znovu použít. Dosud byly všechny insulinu podobné peptidy připraveny pouze rekombinantní v kvasinkách nebo bakteriích (52) nebo nativní ligací proteinů (73), jež je postupné chemické spojování fragmentů peptidu většinou o celkově velmi malých výtěžcích. Naše metoda rekombinací dvou řetězců ze dvou různých organismů byla pro přípravu tohoto peptidu použita poprvé a její výsledek nebylo

dopředu nijak možno odhadnout. Na jednu stranu bylo úspěchem, že jsme si ověřili možnost vzniku takového peptidu tím, že jsme ho identifikovali v reakční směsi, na druhou stranu výtěžek a nemožnost ho zcela oddělit od vedlejších produktů, a tím získat čistý peptid použitelný v biologických testech, byl i přes velké úsilí zklamáním. Příštím naším krokem by byla příprava analogu s oběma řetězci DILP5 z *D. melanogaster*, který by mohl mít větší šanci na vyšší výtěžek. Dle zkušenosti z laboratoře J. Jiráčka s přípravou insulinových analogů rekombinační reakcí je přítomnost produktu v reakční směsi, i když s mizivým výtěžkem, určitým příslibem pro další pokusy, protože existují například určité analogy insulinu s jednoaminokyselinovou záměnou, které nelze připravit ani v minimálním množství. Příprava jakýchkoli analogů DILP v dostatečném množství pro biologické testy (vazebné testy *in vitro*, snižování cukrů *in vivo*, spouštění signalizačních drah na různých typech buněk) by bylo velmi prospěšné pro další výzkum metabolických a mitogenních drah velké rodiny peptidů podobných insulinu.

7 SOUHRN

V této bakalářské práci jsme se pokusili připravit kombinovaný analog insulinu a peptidu podobného insulinu z mušky *Drosophila melanogaster*, složeného z řetězce A lidského insulinu a řetězce B DILP5. Řetězec B DILP5 měl kvůli snazší přípravě zaměněny všechny methioniny za aminokyselinu norleucin.

Příprava analogu rekombinační reakcí dvou samostatných řetězců v jejich S-sulfonátové formě byla velmi složitá, ale hmotnostní spektrometrií se podařilo potvrdit přítomnost malého množství analogu v reakční směsi. Navzdory vícenásobné purifikaci se však nepodařilo izolovat z reakční směsi čistý produkt použitelný pro následné biologické charakterizace.

8 REFERENCE

1. Abbreviations and Symbols, 1977, *Eur. J. Biochem.* 74, 1-6
2. Conlon, J. M.: Evolution of the Insulin Molecule: Insights into Structure-activity and Phylogenetic Relationships, 2001, *Peptides* 22, 1183-1193
3. Chan, S. J., Steiner, D. F.: Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone, 2000, *Amer. Zool.* 40, 213-222
4. Murray- Rast, J., McLeod, A. N., Blundell, T. L., Wood, S. P.: Structure and Evolution of Insulins: Implications for Receptor Binding, 1992, *BioEssays* 14, 325-331
5. Rinderknecht, E., Humbel, R. E.: Primary Structure of Human Insulin-like Growth Factor II, 1978, *FEBS Lett.* 89, 283-286
6. Kelley, K. M.: Experimental Diabetes Mellitus in a Telos Fish. I. Effect of Complete Isletectomy and Subsequent Hormonal Treatment on Metabolism in the Goby, *Gillichthys mirabilis*, 1993, *Endocrinology* 132, 2689-2695
7. Mercodia.se: <http://www.mercodia.se/learning-center/diabetes-mellitus/sequence-homology.html>; staženo dne 30.4.2015
8. Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Mizoguchi, A., Yuko, F., Suzuki, A., Takahashi, S. Y., Ishizaki, H.: Amino Acid Sequence of a Prothoracicotropic Hormone of a Silkworm *Bombyx mori*, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5840-5843
9. Brogolio, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., Hafen, E.: An Evolutionarily Conserved Function of the *Drosophila* Insulin Receptor and Insuli-like Peptides in Growth Control, 2001, *Curr. Biol.* 11, 213-221
10. WormBook.org:
http://www.wormbook.org/chapters/www_neuropeptides/neuropeptides.pdf; staženo dne 19.5.2015
11. Mizoguchi, A., Okamoto, N.: Insulin-like and IGF-like Peptides in the Silkworm *Bombyx mori*: Discovery, Structure, Secretion, and Function, 2013, *Front Physiol.* 4, 217

12. Abel, J. J.: Crystalline Insulin, 1926, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 12, 132-135
13. Sanger, F.: The Free Amino Groups of Insulin, 1945, *Biochem. J.* 39, 507-515
14. Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F., Kitai, R.: The Disulphide Bonds of Insulin, 1955, *Biochem. J.* 60, 541-556
15. Adams, M. J., Bludell, T. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Vijayan, M., Baker, E. N., Harding, M. M., Hodgkin, D. C., Rimmer, B., Sheat, S.: Structure of Rhombohedral 2Zn Insulin Crystals, 1969, *Nature* 224, 491-495
16. Hodgkin Crowfoot, D. M.: X Rays and the Structure of Insulin, 1971, *Brit. Med. J.* 4, 447-451
17. Huml, K., Barth, T.: Struktura insulinu, 1998, *Chem. Listy* 92, 294-301
18. Žáková, L.: Nové insulinové analogy modifikované v C-koncové části B-řetězce, 2004, *Disertační práce*, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha
19. Baker, E. N., Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson E. J., Dodson, G. G., Crowfoot Hodgkin, D. M., Hubbard, R. E., Isaacs, N. W., Reynolds, C. D., Sakabe, K., Sakabe, N., Vijayan, N. M.: The Structure of 2Zn Pig Insulin Crystals at 1,5 Å Resolution, 1988, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 319, 369-456
20. Kosinová, L.: Studium role N-konce řetězce B insulinu ve vazbě na insulinový receptor, 2013, *Diplomová práce*, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha
21. Goldman, J., Carpenter, F. H.: Zinc Binding, Circular Dichroism, and Equilibrium Sedimentation Studies on Insulin (Bovine) and Several of Its Derivates, 1974, *Biochemistry* 13, 4566-4574
22. Žáková, L., Jiráček, J.: Biosyntéza, sekrece a degradace insulinu, 2005, *Chem. Listy* 99, 772-781
23. Cheatham, B., Kahn, C. R.: Insulin Action and the Insulin Signaling Network, 1995, *Endocrine Reviews* 16, 117-142
24. Kittnar Otomar a kol.: Lékařská fyziologie, Grada Publishing, a.s., Praha, 2011

25. Baker, K. D., Thummel, C. S.: Diabetic Larvae and Obese Flies-Emerging Studies of Metabolism in *Drosophila*, 2007, *Cell Metab.* 6, 257-266
26. Birse, R. T., Choi, J., Reardon, K., Rodriguez, J., Graham, S., Diop, S., Ocorr, K., Bodmer, R., Oldham, S.: High-fat-diet-induced Obesity and Heart Dysfunction are Regulated by the TOR Pathway in *Drosophila*, 2010, *Cell Metab.* 12, 533-544
27. Broughton, S. J., Piper, M. D., Ikeya, T., Bass, T. M., Jacobson, J., Drieger, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D. J., Leever, S. J., et al.: Longer Lifespan, Altered Metabolism, and Stress Resistance in *Drosophila* from Ablation of Cells Making Insulin-like Ligands, 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3105-3110
28. Clancy, D. J., Gems, D., Harshman, L. G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leever, S. J., Partridge, L.: Extension of Life-span by Loss of CHICO, a *Drosophila* Insulin Receptor Substrate Protein, 2001, *Science* 292, 104-106
29. Goberdhan, D. C., Wilson, C.: The Functions of Insulin Signaling: Size Isn't Everything, Even in *Drosophila*, 2003, *Differentiation* 71, 375-397
30. Ruffin, E. J., Kim, S. K., Nusse, R.: Ablation of Insulin-producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes, 2002, *Science* 296, 1118-1120
31. Taguchi, A., White, M. F.: Insulin-like Signaling, Nutrient Homeostasis, and Life Span, 2008, *Annu. Rev. Physiol.* 70, 191-212
32. Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M. P., Yin, C. M., Garofalo, R. S.: A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That extends Life-span and Impairs Neuroendocrine Function, 2001, *Science* 292, 107-110
33. Zhang, H., Liu, J., Li, C. R., Momen, B., Kohanski, R. A., Pick, L.: Deletion of *Drosophila* Insulin-like Peptides Causes Growth Defects and Metabolic Abnormalities, 1996, *Micron* 27, 35-91
34. Garofalo, R. S.: Genetic Analysis of Insulin Signaling in *Drosophila*, 2002, *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 156-162
35. Giannakou, M. E., Partridge, L.: Role of Insulin-like Signaling in *Drosophila* Lifespan, 2007, *Trends. Biochem. Sci.* 32, 180-188

36. Grönke, S., Clarke, D. F., Broughton, S., Andrews, T. D., Partridge, L.: Molecular Evolution and Functional Characterisation of *Drosophila* Insulin-like Peptides, 2010, *PLoS Genet.* 6, e1000857
37. Seidah, N. G., Chretien, M.: Eukaryotic Protein Processing: Endoproteolysis of Precursor Proteins, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 602-607
38. Géminard, G., Arquier, N., Layalle, S., Bourouis, M., Slaidina, M., Delanoue, R., Bjordal, M., Ohanna, M., Ma, M., Colombani, J. et al.: Control of Metabolism and Growth through Insulin-like Peptides in *Drosophila*, 2006, *Diabetes* 55, S5-S8
39. Grönke, S., Muller, G., Hirsch, J., Fellert, S., Andreou, A., Haase, T., Jäckle, H., Kuhnlein, R. P.: Dual Lipolytic Control of Body Fat Storage and Mobilization in *Drosophila*, 2007, *PLoS Biol.* 5, e137
40. Isabel, G., Martin, J. R., Chidami, S., Veenstra, J. A., Rosay, P.: AKH-producing Neuroendocrine Cell Ablation Decreases Trehalose and Induces Behavioral Change in *Drosophila*, 2005, *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 288, R531-R538
41. Kim, S. K., Rulifson, E. J.: Conserved Mechanism of Glucose Sensing and Regulation by *Drosophila* Corpora Cardica Cells, 2004, *Nature* 431, 316-320
42. Lee, G., Park, J. H.: Hemolymph Sugar Homeostasis and Starvation-induced Hyperactivity Affected by Genetic Manipulations of the Adipokinetic Hormone-encoding Gene in *Drosophila melanogaster*, 2004, *Genetics* 167, 311-323
43. Hwa, V., Oh, Y., Rosenfeld, R. G.: The Insulin-like Growth Factor-binding Protein (IGFBP) Superfamily, 1999, *Endocr. Rev.* 20, 761-787
44. Jones, J. I., Clemmons, D. R.: Insulin-like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions, 1995, *Endocr. Rev.* 16, 3-34
45. Honegger, B., Galic, M., Köhler, K., Wittwer, F., Brogiolo, W., Hafen, E., Stocker, H.: IMP-L2, a Putative Homolog of Vertebrate IGF-binding Protein 7 Counteracts Insulin Signaling in *Drosophila* and is Essential for Starvation Resistance, 2008, *J. Biol.* 7, 10

46. Kulahin, N., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Kristensen, O., Norrman, M., Sajid, W., Schluckebier, G., Meyts, P. D., Brzozowski, M.: Structural Analysis of IMP-L2 Function, nepublikovány výsledky
47. Okamoto, N., Yamanaka, N., Satake, H., Saegusa, H., Kataoka, H., et al.: An Ecdysteroid-inducible Insulin-like Growth Factor-like Peptide Regulates Adult Development of the Silkworm *Bombyx mori*, 2009, *Febs. J.* 276, 1221-1232
48. Yang, C. H., Belawat, P., Hafen, E., Jan, L. Y., Jan, Y. N.: *Drosophila* Egg-laying Site Selection as a System to Study Simple Decision-making Processes, 2008, *Science* 319, 1679-1683
49. Miguel-Aliaga, I., Thor, S., Gould, A. P.: Postmitotic Specification of *Drosophila* Insulinergic Neurons from Pioneer Neurons, 2008, *PLoS. Biol.* 6, e58
50. Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., Hafen, E.: Nutrient-dependent Expression of Insulin-like Peptides from Neuroendocrine Cells in CNS Contributes to Growth Regulation in *Drosophila*, 2002, *Curr. Biol.* 12, 1293-1300
51. Tatar, M., Post, S., Yu, K.: Nutrient Control of *Drosophila* Longevity, 2014, *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 509-517
52. Sajid, W., Kulahin, N., Schluckebier, G., Ribel, U., Henderson, H. R., Tatar, M., Hansen, B. F., Manegold Svedsen, A., Kiselyov, V. V., Norgaard, P., Wahlund, P. O., Brandt, J., Kohanski, R. A., Andersen, A. S., De Meyts, P.: Structural and Biological Properties of the *Drosophila*, Insulin-like Peptide 5 Show Evolutionary Conservation, 2011, *J. Biol. Chem.* 286, 661-673
53. Min., K. J., Yamamoto, R., Buch, S., Pankratz, M., Tatar, M.: *Drosophila* Lifespan Control by Dietary Restriction Independent of Insulin-like Signaling, 2008, *Aging Cell* 7, 199-206
54. De Meyts, P., Whittaker, J.: Structural Biology of Insulin and IGF Receptors, Implications for Drug Design, 2002, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 769-783
55. Huml, K., Klasová, L., Barthová, J.: Interakce inzulínu a inzulínovým receptorem, 2002, *Chem. Listy* 96, 698-703

56. Marino-Buslje, C., Martin-Martinez, M., Mizuguchi, K., Siddle, K., Blundell, T. L.: The Insulin Receptor: from Protein Sequence to Structure, 1999, *Nature* 354, 238-241
57. Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K. W., Smith, B. J., Watson, Ch. J., Žáková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S. J., Steiner, D. F., Dodson, G. G., Brozowski, A. M., Weiss, A. M., Ward, C. W., Lawrence, M. C.: How Insulin Engages Its Primary Binding Site on the Insulin Receptor, 2013, *Nature* 463, 241-248
58. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., Kochoyan, M., Weiss, M. A.: Receptor Binding Redefined by a Structural Switch in a Mutant Human Insulin, 1991, *Nature* 354, 238-241
59. Jiráček, J., Žáková, L., Antolikova, E., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Dodson, G. G., Brzowski, A. M.: Implications for the Active Form of Human Insulin Based on the Structural Convergence of High Active Hormone Analogues, 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1966-1970
60. Hua, Q. X., Nakagawa, S., Jia, W., Wang, S., Weiss, M. A.: Toward the Active Conformation of Insulin – Stereospecific Modulation of a Structural Switch in the B Chain, 2006, *J. Biol. Chem.* 281, 24900-24909
61. Nakagawa, S. H., Zhao, M., Hua, Q. X., Hu, S. Q., Wan, Z. L., Jia, W., Weiss, M. A.: Chiral Mutagenesis of Insulin. Foldability and Function Are Inversely Regulated by a Stereospecific Switch in the B Chain, 2005, *Biochemistry* 44, 4984-4999
62. De Meyts, P.: Insulin and Its Receptor: Structure, Function and Evolution, 2004, *BioEssays* 26, 1351-1362
63. Petruzzelli, L., Herrera, R., Arenas-Garcia, R., Fernandez, R., Birnbaum, M. J., Rosen, O. M.: Isolation of a *Drosophila* Genomic Sequence Homologous to the Kinase Domain of the Human Insulin Receptor And Detection of the Phosphorylated *Drosophila* Receptor with an Anti-peptide Antibody, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4710

64. Fernandez, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M., Schlessinger, J.: The *Drosophila* Insulin Receptor Homolog: a Gene Essential for Embryonic Development Encodes Two Receptor Isoforms with Different Signaling Potential, 1995, *EMBO J.* 14, 3373-3384
65. Ruan, Y., Chen, C., Cao, Y., Garofalo, R. S.: The *Drosophila* Insulin Receptor Contains a Novel Carboxy-terminal Extension Likely to Play an Important Role in Signal Transduction, 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 4236-4243
66. Katsoyannis, P. G.: The Chemical Synthesis of Human and Sheep Insulin, 1971, *Amer. J. Med.* 40, 652-661
67. Zahn, H.: Bericht über die Aachener Insulinsynthese, 1965, *Naturwissenschaften* 52, Aachen, 99-103
68. Merrifield, R. B.: Solid-phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin, 1964, *Biochemistry* 3, 1385-1390
69. Fields, G. B., Noble, R. L.: Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids, 1990, *Int. J. Pept. Protein Res.* 35, 191-214
70. Chance, R. E., Haffmann, J. A., Kroeff, E. P. Johnson, M. G., Schimer, E. W., Bromer, W. W.: The Production of Human Insulin Using Recombinant DNA Technology and a New Chain Combination Procedure, 1981, *The Lilly Research Laboratories*, Indianapolis, USA
71. Morihara, K.: Enzymatic Semisynthesis of Human Insulin: An Update, 1990, *J. Mol. Recognit.* 3, 623-626
72. Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., Riggs, A. D.: Expression in *Escherichia coli* of Chemically Synthesized Genes for Human Insulin, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 106-110
73. Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., Kent, S. B.: Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, 1994, *Science* 266, 776-779

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
----------------------------	----------	-----------------	----------