

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Lucie Šatrová

STUDIUM NOVÝCH LIPIDOVANÝCH ANALOGŮ  
PEPTIDU UVOLŇUJÍCÍHO PROLAKTIN *IN VITRO*

The *in vitro* study of the new lipidized analogs  
of prolactin-releasing peptide

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Konzultant: Veronika Pražienková, PhD.

Praha 2017

---

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením grantu GAČR 15-08679S  
a RVO: 61388953 (AV ČR)

## 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 je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

---

## Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Lence Maletínské, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha v.v.i.), za cenné rady, obrovskou trpělivost a pomoc při psaní mé bakalářské práce. Chtěla bych poděkovat i Veronice Pražienkové PhD. za pomoc a dobré rady při experimentální činnosti a Ing. Blance Železné, CSc. za korekturu mé bakalářské práce. Velké díky patří celé skupině Lenky Maletínské za úžasné přátelské prostředí.

Dále děkuji laboratoři radioizotopů, Aleši Markovi PhD. za jodaci peptidů a také Ing. Miroslavě Blechové za syntézu peptidů.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé své rodině a příteli Pavlovi za podporu a trpělivost při mých studiích.

---

## ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá neuropeptidy ovlivňujícími příjem potravy s anorexigenním účinkem (snižujícím příjem potravy), které jsou potenciálními antiobezitiky. Mezi tyto neuropeptidy se řadí peptid uvolňující prolaktin (PrRP), který se váže s vysokou afinitou ke svému receptoru GPR10, a také k receptoru NPF2 pro neuropeptid FF (NPF2), a to s afinitou jen o řád nižší než ke GPR10.

V laboratoři RNDr. Lenky Maletínské, CSc. byly navrženy a syntetizovány nové lipidované analogy PrRP, které mají podobnou afinitu k receptorům GPR10 i NPF2, jako přirozený PrRP a snižují příjem potravy po periferním podání.

Na základě skutečnosti, že GPR10 má vysokou homologii s jedním receptorem pro neuropeptid Y a peptid YY označovaným jako Y1 a receptor Y1 je homologický s dalšími receptory zmíněných peptidů Y2 a Y5, byla v této bakalářské práci stanovena afinita přirozeného PrRP a jeho dvou palmitovaných analogů k receptorům Y1, Y2, a Y5. Na buňkách U2OS s transfekovanými receptory Y1, Y2 nebo Y5 byly pomocí saturačních vazeb stanoveny hodnoty  $K_d$  a  $B_{max}$  pro  $^{125}I$ -PYY. Ty sloužily k výpočtu  $K_i$  v kompetitivních vazebných experimentech, kde přirozený PrRP a jeho dva palmitoylované analogy měly velmi nízkou afinitu k buňkám U2OS s transfekovanými receptory Y1 nebo Y2. Na druhé straně přirozený PrRP se vázal k buňkám U2OS s transfekovaným receptorem Y5 s  $K_i$  řádu  $10^{-6}$  mol/l a jeho palmitoylované analogy s  $K_i$  až stokrát nižší.

Součástí bakalářské práce byla i optimalizace doby vazby a přítomnosti inhibitorů proteáz pro stanovení  $K_d$  pro  $^{125}I$  EYF, analog NPF2 a buněčnou linii CHO-K1 s transfekovaným NPF2. Stanovená  $K_d$  byla v řádu  $10^{-9}$  mol/l podobná hodnotám pro přirozené ligandy receptorů.

Zkoumání vazby lipidovaných analogů PrRP k jiným, než vlastním receptorům přispěje k objasnění jejich účinku *in vivo*. Optimalizování podmínek pro vazbu  $^{125}I$  EYF k NPF2 umožní stanovit afinitu jiných ligandů k tomuto receptoru.

---

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Peptid uvolňující prolaktin (PrRP)

Neuropeptid Y (NPY)

Neuropeptid FF (NPFF)

Regulace příjmu potravy

Receptory: GPR10, NPFF2, Y1, Y2, Y5

---

**KEY WORDS**

Prolactin-releasing peptide (PrRP)

Neuropeptide Y (NPY)

Neuropeptide FF (NPFF)

Food intake regulation

Receptors: GPR10, NPFF2, Y1, Y2, Y5

---

## Obsah

1. ÚVOD .....	11
Cíle práce:.....	11
2. TEORETICKÝ ÚVOD .....	13
2.1 Obezita, jako závažný zdravotní problém.....	13
2.2 Regulace příjmu potravy.....	14
2.3 RF-amidové peptidy .....	16
2.4 Peptid uvolňující prolaktin (PrRP) .....	17
2.4.1 Objev a struktura .....	17
2.4.2 Fyziologické funkce PrRP.....	17
2.4.3 Analogy PrRP a lipidované analogy PrRP .....	18
2.4.4 GPR10 receptor .....	18
2.5 Neuropeptid Y a peptid YY .....	19
2.5.1 Objev a struktura .....	19
2.5.2 Fyziologická funkce NPY a PYY.....	20
2.5.3 Výskyt receptorů pro NPY .....	20
2.6 Neuropeptid FF (NPFF).....	21
2.6.1 Objev a struktura .....	21
2.6.2 Analogy NPFF .....	21
2.6.3 Receptory pro NPFF .....	21
2.6.4 Fyziologické funkce NPFF .....	21
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
3.1 Materiál a metody .....	23
3.1.1 Buněčné linie .....	23
3.1.2 Chemikálie.....	23
3.1.3 Materiál.....	24
3.1.4 Přístroje a programy .....	25
3.1.5 Peptidy a jodace peptidů.....	26
3.2 Pokusy <i>in vitro</i> .....	27
3.2.1 Kultivování buněčných linií .....	27
3.2.2 Saturační vazebné experimenty <sup>125</sup> I-PYY na buněčné linii U2OS s transfekovaným lidským Y1, Y2 nebo Y5 receptorem.....	27
3.2.3 Kompetitivní vazebné experimenty <sup>125</sup> I-PYY na buněčné linii U2OS s transfekovaným lidským Y1, Y2 nebo Y5 receptorem.....	29

3.2.4	Optimalizace podmínek vazebných experimentů $^{125}\text{I}$ -EYF na buněčné linii CHO-K1 s transfekovaným lidským NPFF2 receptorem.....	29
3.2.5	Saturační vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -EYF na buněčné linii CHO-K1 s transfekovaným lidským NPFF2 receptorem .....	30
3.2.6	Vyhodnocení <i>in vitro</i> experimentů .....	30
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>32</b>
4.1	Pokusy <i>in vitro</i> .....	32
4.1.1	Peptidy a jodace peptidů.....	32
4.1.2	Kultivování buněčné linie U2OS a buněčné linie CHO-K1 .....	32
4.2	Vazebné experimenty .....	33
4.2.1	Saturační vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -PYY na buňkách U2OS s transfekovaným lidským Y1, Y2 nebo Y5 receptorem.....	33
4.2.2	Stanovené $K_d$ pro $^{125}\text{I}$ -PYY a receptory Y1, Y2 a Y5 .....	35
4.2.3	Kompetitivní vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -PYY na buňkách U2OS s transfekovaným Y1 receptorem .....	35
4.2.4	Kompetitivní vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -PYY na buňkách U2OS s transfekovaným Y2 receptorem .....	35
4.2.5	Kompetitivní vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -PYY na buňkách U2OS s transfekovaným Y5 receptorem .....	35
4.2.6	Afinita přirozeného PrRP a jeho palmitoylovaných analogů k receptorům Y1, Y2 a Y5.....	37
4.3	Optimalizace podmínek vazebných experimentů $^{125}\text{I}$ -EYF na buňkách CHO-K1 s transfekovaným NPFF2 receptorem .....	38
4.3.1	Vliv doby inkubace na vazbu $^{125}\text{I}$ -EYF k buňkám CHO-K1 s NPFF2 receptorem .....	38
4.3.2	Vliv přítomnosti inhibitorů proteáz ve vazebném pufru na vazbu $^{125}\text{I}$ -EYF k buňkám CHO-K1 s transfekovaným NPFF2 receptorem.....	39
4.4	Saturační vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -EYF na buněčné linii CHO-K1 s transfekovaným NPFF2 receptorem .....	40
4.4.1	Optimalizace podmínek pro vazbu $^{125}\text{I}$ -EYF na NPFF2 receptor a stanovená $K_d$ .....	41
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>42</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>43</b>

---

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AgRP	agouti-related peptid
AP	<i>area postrema</i>
ARC	<i>nucleus arcuatus</i>
ATP	adenosintrifosfát
BBB	hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
BPTI	hovězí pankreatický trypsinový inhibitor (bovine pancreatic trypsin inhibitor)
CART	kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (cocaine- and amphetamine-regulated transcript)
CCK	cholecystokinin
CNS	centrální nervová soustava
CRH	kortikoliberin (corticotropin-releasing hormone)
DMN	dorsomediální jádro (dorsomedial nucleus)
EYF	analog NPF (tab. 2 str.)
GIT	gastrointestinální trakt
GLP	peptid podobný glukagonu (glucagon-like peptide)
GPCR	receptor spřažený s G proteinem (G-protein coupled-receptor)
GPR10	hGRP3, UHR-1, receptor spřažený s G proteinem 10 (G-protein coupled-receptor 10)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
ICV	intracerebroventrikulární (podané do mozkové komory)
LHA	laterální hypotalamus (lateral hypothalamic area)
NA	noradrenalin
NPF	neuropeptid FF
NPF2	receptor 2 pro neuropeptid FF
NPY	neuropeptid Y
NTS	<i>nucleus tractus solitarii</i>
POMC	proopiomelanokortin
PP	pankreatický peptid

---

PrRP	peptid uvolňující prolaktin (prolactin-releasing peptide)
PVN	paraventriculární jádro (paraventricular nucleus)
PYY	peptid YY
TRH	thyreoliberin (thyrotropin-releasing hormone)
VLM	ventrolaterální retikulární jádro (ventrolateral medulla)
VMN	ventromediální jádro (ventromedial nucleus)
WHO	světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

---

# 1. ÚVOD

Obezita se řadí mezi hlavní zdravotní problémy dnešní civilizace. Celosvětový nárůst obezity každým rokem stoupá. Příčinou jsou snadno dostupné potraviny a velice nízká fyzická aktivita. Z toho to důvodu je důležité zabývat se výzkumem nových látek, které by byly schopné ovlivnit a regulovat příjem potravy a tělesnou hmotnost.

Tato práce je zaměřena na peptidy s anorexigenním účinkem, tedy snižujícím příjem potravy a tělesnou hmotnost.

Peptid uvolňující prolaktin (PrRP) je neuropeptid s anorexigenními účinky snižující příjem potravy po podání do mozku, neboť jako většina peptidů neprochází hematoencefalickou bariérou. Pomocí peptidové syntézy byly připraveny nové analogy PrRP s navázanou mastnou kyselinou, díky níž dochází ke snížení příjmu potravy po periferním podání lipidovaného peptidu.

V této práci byly nové lipidované analogy PrRP zkoumány *in vitro* z hlediska schopnosti vázat se na receptory pro neuropeptid Y (NPY) a peptid YY (PYY) označované jako Y1, Y2, nebo Y5, které vykazují homologii s receptorem pro PrRP označovaným jako GPR10 a navíc mají vzájemnou homologii. Dále měly být optimalizovány podmínky pro stanovení disociační konstanty  $K_d$  pro  $^{125}\text{I}$  EYF, analog neuropeptidu FF, k receptoru NPFF2.

## **Cíle práce:**

1. Stanovit disociační konstantu  $K_d$  a počet vazebných míst pro  $^{125}\text{I}$ -PYY na buňkách U2OS s lidskými receptory Y1, Y2 nebo Y5.
2. Stanovit vazebné afinity přirozeného PrRP a jeho dvou lipidovaných analogů PrRP k buňkám U2OS s lidskými receptory Y1, Y2 nebo Y5 pomocí  $K_i$  stanovených z kompetitivních vazebných experimentů s  $^{125}\text{I}$ -PYY.
3. Optimalizovat podmínky vazebných experimentů pro analog neuropeptidu FF  $^{125}\text{I}$ -EYF na buňkách CHO-K1 s lidským NPFF2 receptorem.

- 
4. Stanovit disociační konstantu  $K_d$  a počet vazebných míst pro  $^{125}\text{I}$ -EYF na buňkách CHO-K1 s lidským NPFF2 receptorem.

---

## 2. TEORETICKÝ ÚVOD

### 2.1 Obezita, jako závažný zdravotní problém

V současné době je obezita jedním z hlavních zdravotních problémů lidské populace. Počet lidí s obezitou stoupá obrovskou rychlostí. V roce 2014 trpělo nadváhou více než 1,9 miliardy jedinců starších 18 let, obezitou více než 600 milionů. Celosvětový nárůst obezity se více než zdvojnásobil mezi roky 1980 a 2014 [1].

Obezita se vyznačuje nadměrným ukládáním tělesného tuku a dochází k jejímu rozvoji, pokud energetický příjem převažuje nad energetickým výdejem. Pro kvalifikaci obezity a nadváhy můžeme využívat hmotnostní index (BMI). BMI je definován jako tělesná hmotnost v kilogramech dělená druhou mocninou výšky jedince v metrech. Kvalifikace obezity podle hodnoty BMI je uvedena v (Tab. 1.) [1]

*Tabulka 1: Kvalifikace obezity podle WHO*

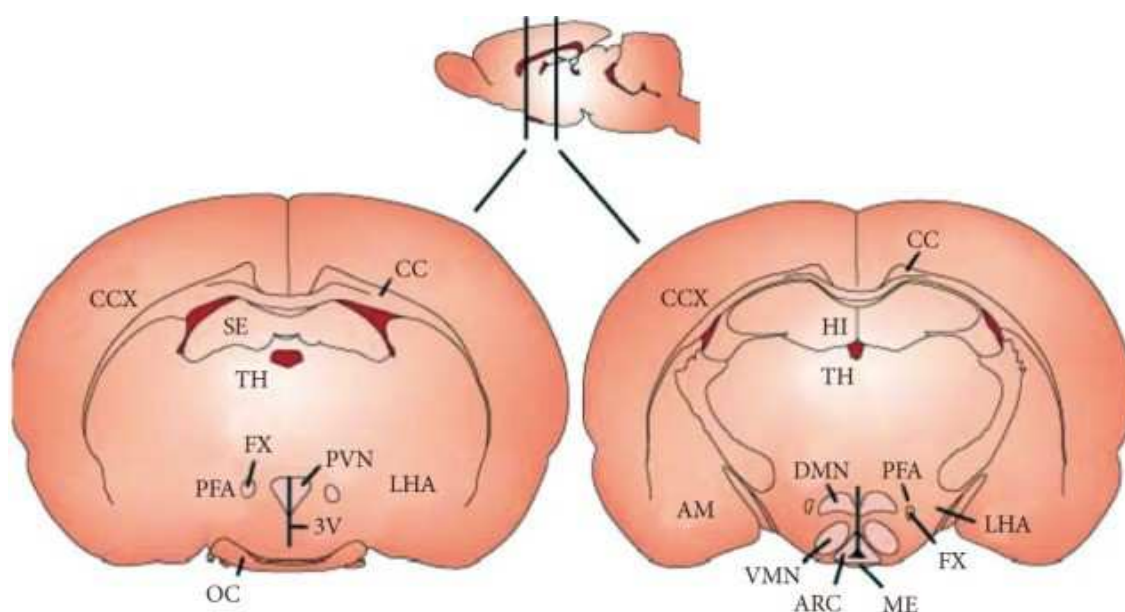
Kvalifikace	BMI (kg·m <sup>2</sup> )
Podváha	<18,5
normální váha	18,5 – 24,9
Nadváha	25 – 29,9
obezita 1. stupně	30 – 34,9
obezita 2. stupně	35 – 39,9
obezita 3. stupně	≥ 40

Nadváha i obezita může vést k řadě onemocnění, dochází ke vzniku diabetu mellitu 2. typu, hypertenzi, k ischemické chorobě srdeční a rozvoji dalších zdravotních problémů. U dětí trpících obezitou se objevují metabolické poruchy, psychická onemocnění nebo ortopedické problémy [2]. V současné době se při léčbě obezity zavádějí dietetická opatření, úprava fyzické aktivity, farmakoterapie a chirurgická léčba [3].

## 2.2 Regulace příjmu potravy

Regulace příjmu potravy je komplexní děj řízený centrální nervovou soustavou (CNS) ve spolupráci s periferními signály [4].

Za hlavní centrum pro regulaci příjmu potravy je považován hypotalamus, jenž přijímá signály z periferních orgánů a řídí tak energetickou homeostázu [2]. Hypotalamus je část mozku nacházející se na spodině lebeční. Obsahuje několik jader, především *nucleus arcuatus* (ARC), paraventriculární jádro (PVN), laterální hypotalamus (LHA), dorsomediální jádro (DMN) a ventromediální jádro (VMN) (Obr. 1.) [5].



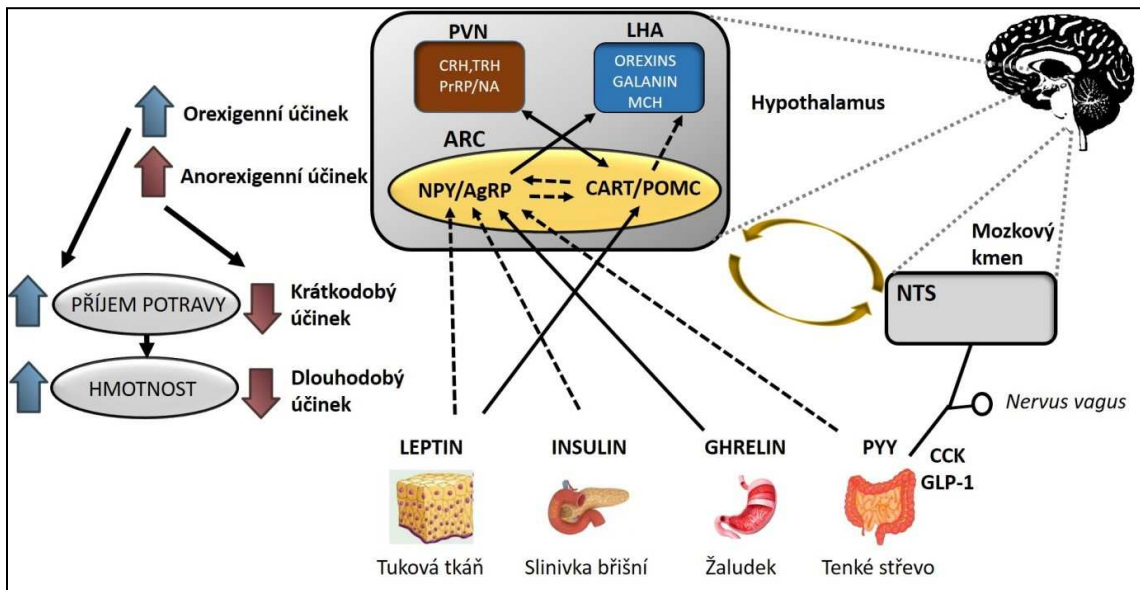
**Obrázek 1. Hypotalamická jádra zapojující se do regulace příjmu potravy.**

Mezi hypotalamická jádra, která ovlivňují příjem potravy, patří: *nucleus arcuatus* (ARC), *nucleus ventromedialis* (VMN), *laterální hypotalamus* (LHA), *nucleus paraventricularis* (PVN), *perifornikální hypotalamus* (PFA) a *nucleus dorsomedialis* (DMN). Zkratky dalších mozkových částí: *amygdala* (AM), *corpus callosum* (CC), *mozková kůra* (CCX), *eminentia medialis* (ME), *hipokampus* (HI), *optic chiasm* (OC), *septum* (SE), *thalamus* (TH), *klenba* (FX), *třetí komora* (3V). Převzato z [5].

---

Za nejdůležitější oblast hypotalamu z hlediska příjmu potravy je považován *nucleus arcuatus*, umístěný velmi blízko *eminentia medialis*. *Eminentia medialis* je oblast s deficientní hematoencefalickou bariérou (BBB), díky níž mohou cirkulující periferní látky částečně prostoupit do ARC [5]. V ARC se vyskytují dvě populace neuronů, z nichž každá má odlišný vliv na příjem potravy. První populace neuronů NPY/AgRP uvolňuje neuropeptid Y (NPY) a agouti-related peptid (AgRP), které jsou orexigenní, tedy zvyšující příjem potravy. Druhá populace neuronů POMC/CART produkuje melanocyty stimulující hormon (MSH), posttranslační produkt proopiomelanokortinu (POMC) a peptid CART (zkratka pro kokainem a amfetaminem regulovaný transkript). MSH a peptid CART jsou anorexigenní, tedy snižující příjem potravy [4]. Obě zmíněné populace neuronů obsahují receptory pro periferní hormony, které řídí příjem potravy na dlouhodobé a krátkodobé úrovni. Anorexigenní dlouhodobě účinné hormony jsou leptin a insulin, anorexigenní krátkodobě účinné jsou peptid YY (PYY), cholecystokinin (CCK) a také peptid podobný glukagonu (GLP-1). Jediný orexigenní periferní hormon ghrelin působí jak v dlouhodobé, tak krátkodobé regulaci příjmu potravy. Leptin a insulin stimulují neurony POMC/CART a inhibují neurony NPY/AgRP. Ghrelin stimuluje neurony NPY/AgRP a inhibuje neurony POMC/CART (Obr. 2.) [5].

Příjem potravy je regulován také v *nucleus tractus solitarii* (NTS) v mozkovém kmeni, který přijímá krátkodobé signály z periferních orgánů pomocí bloudivého nervu (*nervus vagus*). NTS je propojen s hypotalamickým PVN a skrze toto spojení dochází k regulaci množství a frekvence přijímané potravy [5, 6].



**Obrázek 2. Schéma regulace příjmu potravy**

Schéma ukazuje na vztah mezi centrální nervovou soustavou (CNS) a periferními signály, řídicími příjem potravy. Přerušovaná čára značí inhibiční dráhu, plná čára značí aktivační dráhu. Zkratky: neuropeptid Y (NPY), agouti-related peptid (AgRP), proopiomelanokortin (POMC), kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (CART), paraventriculární jádro (PVN), tyreoliberin (TRH), kortikoliberin (CRH), peptid uvolňující prolaktin (PrRP), noradrenalin (NA), laterální hypothalamus (LHA), hormon koncentrující melanin (MCH). Převzato z [7].

### 2.3 RF-amidové peptidy

Tzv. RF-amidové neuropeptidy byly nazvány podle C-koncového dipeptidu v jejich struktuře (Arg-Phe-NH<sub>2</sub> neboli RF-NH<sub>2</sub>). U obratlovců byly nalezeny RF-amidové peptidy podobné tetrapeptidu, který byl nalezen i u měkkýšů. Mezi savčí RF-amidové peptidy patří především neuropeptid FF (NPFF), neuropeptid AF a peptid uvolňující prolaktin (PrRP).

RF- amidové peptidy ovlivňují vnímání bolesti, mají vliv na kardiovaskulární systém, sekreci hormonů a také mají vliv na příjem potravy a energetickou homeostázu [8].

## 2.4 Peptid uvolňující prolaktin (PrRP)

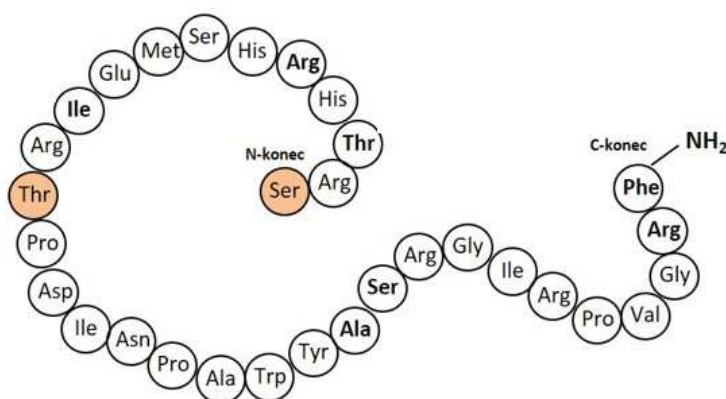
### 2.4.1 Objev a struktura

Peptid uvolňující prolaktin (PrRP) byl objeven tzv. metodou „obrácené farmakologie“, kdy byl hledán endogenní ligand k sirotčímu receptoru GPR10 (jinak též hGR3 či potkaní UHR-1) v roce 1998 Hinumou a kolektivem [9].

PrRP se nachází v několika jádrech hypotalamu, například ve VMN, DMN nebo také v zadním mozku v NTS, tedy v oblastech, které se podílejí na regulaci příjmu potravy, ale také v dření nadledvin nebo slinivce břišní [10, 11].

Hovězí prepropeptid PrRP se skládá z 98 aminokyselin, lidský z 87 aminokyselin, potkaní z 83 aminokyselin [9].

V prepropeptidu se nachází dvě štěpná místa, ze kterých posttranslačními úpravami vznikají dva biologicky aktivní peptidy o 31 nebo 20 aminokyselinách: PrRP31 a PrRP20, C-terminální část je identická (Obr. 3.) [9]. Potkaní a myší PrRP je identický a vykazuje vysokou podobnost s lidským a hovězím PrRP.



**Obrázek 3. Struktura lidského PrRP31**

*Barevně značené aminokyseliny jsou N-koncové aminokyseliny peptidů PrRP31 a PrRP20.*

### 2.4.2 Fyziologické funkce PrRP

PrRP byl nazván podle účinku na sekreci prolaktinu *in vitro* v buňkách tumoru adenohypofýzy [9]. Později bylo prokázáno, že PrRP nemá vliv na vylučování

---

prolaktinu *in vivo*, ale název peptidu zůstal [12]. Zásadní je vliv PrRP na regulaci příjmu potravy. U potkanů, kterým byl intracerebroventrikulárně podáván PrRP, došlo k poklesu tělesné hmotnosti důsledkem snížení přijímané potravy, nebo zvýšením energetického výdeje, tělesné teploty a spotřeby kyslíku [13].

Neurony uvolňující PrRP se nacházejí ve stejných oblastech jako leptinové receptory, což naznačuje interakci PrRP a leptinu při regulaci příjmu potravy [14].

Ke snížení exprese PrRP dochází v době hladovění či laktace, kdy nastává negativní energetická rovnováha a snížení hladiny leptinu v krevní plasmě [15].

### 2.4.3 Analogy PrRP a lipidované analogy PrRP

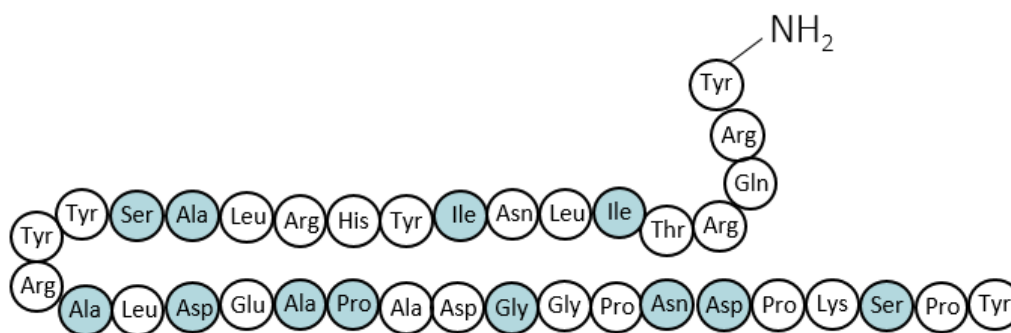
PrRP se vyskytuje ve dvou přirozených formách PrRP20 a PrRP31. Vznikají z prekursorové molekuly se společným C-koncovým dvacetipeptidem [9]. Byla provedena strukturně aktivní studie *in vitro* na C-koncovém 13-peptidu a PrRP31 [16], kde bylo zjištěno, že C-konec obsahující sekvenci Ile<sup>25</sup>-Arg<sup>26</sup>-Pro<sup>27</sup>-Val<sup>28</sup>-Gly<sup>29</sup>-Arg<sup>30</sup>-Phe<sup>31</sup>-NH<sub>2</sub> je pro biologickou aktivitu nezbytný. Pro biologickou aktivitu je klíčový Arg<sup>30</sup>; po jeho modifikaci biologická aktivita PrRP zaniká. Pokud se vymění Phe<sup>31</sup> za podobnou strukturu, biologická aktivita PrRP20 bude zachována [16, 17].

PrRP je označován za specifickou aktivní látku, která má předpoklad k léčbě obezity, překážkou tomuto peptidu je transport přes BBB do mozku po periferním podání. Proto je důležitá modifikace peptidů a zlepšení stability. Připojením řetězce mastné kyseliny esterovou či amidovou vazbou dojde k tzv. lipidizování peptidu, zvýší se stabilita peptidu. Lipidizací umožníme průchod peptidu přes BBB z periferie do mozku [18]. PrRP je vhodnou látkou pro lipidizaci díky lineární struktuře bez postranního řetězce.

### 2.4.4 GPR10 receptor

Receptory savčích RF-amidových peptidů se řadí do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem. GPR10 je vysoce selektivním receptorem, jeho dosud známým vysoce afinitním ligandem je PrRP. Receptory pro PrRP se vyskytují v jádrech hypotalamu PVN, DMN a VMN, a také v NTS. Byly nalezeny i v dřeni nadledvin a žaludku [11, 19].





### Struktura NPY

#### Obrázek 4. Struktury neuropeptidů NPY a PYY

Struktury neuropeptidů PYY (prasečí) a NPY (prasečí) jsou si podobné. Lišící se aminokyseliny jsou označeny barevně.

#### 2.5.2 Fyziologická funkce NPY a PYY

NPY po podání do PVN silně zvýší příjem potravy a sníží energetický výdej. Po dlouhodobém podávání neuropeptidu Y dochází k růstu tělesné hmotnosti a vzniku obezity. Dalšími funkcemi NPY je snížení odpovědi na stres a také vnímání bolesti, dochází i k ovlivnění cirkadiálního rytmu [25].

PYY je uvolňován z intestinálních L-buněk a je signálem sytosti. Pokud dojde ke snížení příjmu potravy, snižuje se i jeho vylučování. Po uvolnění se PYY začne částečně štěpit na PYY<sub>3-36</sub>, a působit přes Y2 receptor, jehož aktivováním dojde ke snížení příjmu potravy.

#### 2.5.3 Výskyt receptorů pro NPY

Receptory pro NPY se nacházejí jak v CNS, tak i v periferních orgánech. Pro NPY, PYY, PP byly charakterizovány Y receptory, Y1, Y2, Y5 a Y6. Tyto receptory se řadí do skupiny GPCR receptorů a mají vysokou homologickou podobnost. NPY, PYY a peptid Y vykazují vysokou afinitu ke všem Y receptorům, účinek jednotlivých neuropeptidů, záleží na pozici Y receptorů. PYY působí přes Y2 receptor a aktivováním dochází k navození pocitu sytosti a dochází ke snížení příjmu potravy. PP působí přes Y4 receptor, po periferním podání snižuje příjem potravy [26].

---

## 2.6 Neuropeptid FF (NPFF)

### 2.6.1 Objev a struktura

Poprvé byl neuropeptid FF (NPFF) izolován v roce 1985 z hovězího mozku, Tento peptid se nachází v organismu ve formě oktapeptidu (Obr. 5.) a oktadekapeptidu [27]. Z fyziologického hlediska účinnější oktapeptid NPFF patří do rodiny RF-amidových peptidů, nazvaných podle C-koncového dipeptidu (Arg-Phe-NH<sub>2</sub> neboli RF- NH<sub>2</sub>) [28].



*Obrázek 5. Sekvence oktapeptidu NPFF*

### 2.6.2 Analogy NPFF

Pro studium biologické funkce NPFF je důležité využít agonistu odolného vůči proteázám. EYF je analog, které tuto funkci splňuje. Jeho struktura je uvedena v (Tab. 2., str. 24.) Afinita EYF k receptorům pro NPFF je velice podobná afinitě NPFF [28, 29].

### 2.6.3 Receptory pro NPFF

Neuropeptid FF má dva receptory, NPFF1 receptor a NPFF2 receptor, spřažené s G-proteinem. Struktura obou receptorů je velice podobná. Receptory pro NPFF jsou také podobné receptorům pro NPY a orexin. Receptory NPFF1 se nacházejí v hypotalamu a oblasti talamu, nikoli v prodloužené míše. Receptory NPFF2 se nacházejí hlavně v hipokampu, oblasti talamu a prodloužené míše [28].

### 2.6.4 Fyziologické funkce NPFF

Receptory pro NPFF se nacházejí v oblastech hypotalamu, talamu a prodloužené míše, to poukazuje na to, že NPFF má vliv na regulaci odpovědi na bolestivé podněty. NPFF1 a NPFF2 receptory jsou z 50 % identické a jsou nejvíce podobné receptorům

---

neuropeptidu Y a orexinu, jejich homologie je (3% a 35%) [30]. Podobnost receptorů NPY s receptory pro NPY ukazuje na možný vliv na příjem potravy [31].

---

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiál a metody

##### 3.1.1 Buněčné linie

U2OS s transfekovaným lidským Y1	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
U2OS s transfekovaným lidským Y2	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
U2OS s transfekovaným lidským Y5	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
Buněčná linie CHO-K1 s transfekovaným lidským NPPF2	Dar od dr. Catherine Mollereau, French National Centre for Scientific Research Paris, France

##### 3.1.2 Chemikálie

Aminokyseliny	Iris Biotech, Marktredwitz, Německo
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (99%)	LACHEMA, Brno, ČR
Complete inhibitory	Roche Diagnostic, Nonnenwald, Německo
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – high glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) (99%)	LACHEMA, Brno, ČR
Epidermální růstový faktor (EGF)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Fetální hovězí sérum (FBS- Standard quality)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
D-glukosa bezvodá	PENTA, Chrudim, ČR

---

L-glutamin 200mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Geneticin (G418)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
HAM'S F-10 médium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
HEPES (99,5%)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Hovězí pankreatický inhibitor proteas (BPTI)	dar od doc. Věry Jonákové z ÚMG AV ČR
Hygromycin B	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
iodo-GEN™	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
KCl	Sigma, St. Louis, MO, USA
McCoy's 5A medium	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
NaCl	LACHEMA, Brno, ČR
Na ( <sup>125</sup> I)	Izotop, Budapešť, Maďarsko
NaOH (98%)	PENTA, Chrudim, ČR
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (99-102%)	LACHEMA, Brno, ČR
Polyethylenimin (PEI)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Penicilin/streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Zeocin	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA

### 3.1.3 Materiál

24 jamkové destičky

Nunc, Roskilde, Dánsko

---

### 3.1.4 Přístroje a programy

Biohazardní box EuroFlow EF/S4	Clean Air, Woerden, Nizozemí
CO <sub>2</sub> inkubátor MCO 18AIC	Sanyo, Osaka, Japonsko
Centrifuga HETTICH Univerzal 320	Tuttlingen, Německo
Gama čítač Wizard 1470	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
Mikroskop StandAxiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen, Německo
Software GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Ultra centrifuga Beckmann Optima L-00XP-Ultracentrifuga	Beckmann, Palo Alto, USA

### 3.1.5 Peptidy a jodace peptidů

Prasečí NPY a lidský PYY byly syntetizovány firmou PolyPeptide Group (Strasbourg, Francie). Další používané peptidy byly syntetizovány na ÚOCHB v laboratoři peptidové syntézy Ing. Miroslavou Blechovou. Syntéza stabilního analogu NPFY EYF, lidského a potkaního PrRP31 a analogů PrRP probíhala dle [32, 33]. Sekvence jednotlivých peptidů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2.). Jako poslední krok byla prováděna lipidizace vybraných analogů PrRP [32]. Peptidy byly přečištěny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a identifikovány hmotnostní spektrometrií Q-TOF micro dle [32].

Peptidy byly radioaktivně označeny Na-<sup>125</sup>I a jodace byla prováděna pomocí činidla IODO-GEN<sup>TM</sup> dle pokynů výrobce [32].

**Tabulka 2:** *Sekvence jednotlivých peptidů, použité při pokusech in vitro*

Peptid	Sekvence
<b>prasečí NPY</b>	YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRQRY-NH <sub>2</sub>
<b>lidský PYY</b>	YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH <sub>2</sub>
<b>lidský hPrRP31</b>	SRTHRHS M EIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH <sub>2</sub>
<b>potkaní rPrRP31</b>	SRAHQHS M ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH <sub>2</sub>
<b>palm-hPrRP31</b>	(N-palm)SRAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH <sub>2</sub>
<b>palm<sup>11</sup>-hPrRP31</b>	SRTHRHSMEIK (N-γ-E (N-palm))TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH <sub>2</sub>
<b>EYF</b>	EYFWSLAAPQRF-NH <sub>2</sub>

---

## 3.2 Pokusy *in vitro*

### 3.2.1 Kultivování buněčných linií

Buněčné linie byly pěstovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru při teplotě 37°C v atmosféře, která byla obohacena o 5 % oxidu uhličitého. Buněčná linie U2OS s transfekovaným lidským Y1, Y2 nebo Y5 receptorem byla pěstována dle doporučení výrobce v McCoy's médiu s 10 % tepelně inaktivovaným fetálním hovězím sérem (FBS), 2 mmol/l L-glutaminem, 1 % penicilinem/streptomycinem, 25 mmol/l HEPES (pH 7,5), 0,1 mmol/l neesenciálními aminokyselinami (NEAA), 1 mmol/l pyruvát sodným, 100 µg/ml geneticinem (G418), 200 µg/ml Zeocinem, 50 µg/ml hygromycinem B.

Buněčná linie CHO-K1 s transfekovaným NPFF2 receptorem byla pěstována v DMEM médiu s 10 % tepelně inaktivovaným FBS, 2 mmol/l L-glutaminem, 1 % penicilinem/streptomycinem, 25 mmol/l HEPES (pH 7,5), 0,1 mmol/l NEAA, 100 µg/ml geneticinem (G418), 200 µg/ml Zeocinem. Podle počtu buněk bylo prováděno pasážování, cca po 3-4 dnech u všech buněčných liniích.

### 3.2.2 Saturační vazebné experimenty <sup>125</sup>I-PYY na buněčné linii U2OS s transfekovaným lidským Y1, Y2 nebo Y5 receptorem

Buňky U2OS s transfekovaným lidským Y1, Y2 nebo Y5 receptorem, které byly využity pro saturační vazebné experimenty byly pěstovány na 24 - jamkových destičkách potažených polyethyleniminem (PEI), pro lepší přilnavost buněk ke dnu destičky a pro lepší odolnost při pokusu. Buňky byly nality v počtu 40000 buněk/jamku. Dále byly ponechány růstu po dobu tří dnů do počtu asi 120000 buněk/jamku.

Jednotlivé jamky na destičce byly promyty 1 ml promývacího pufru (Tab 3.), který byl vytemperován na laboratorní teplotu. Poté byly buňky inkubovány v 250 µl vazebného pufru (Tab. 4.) s přídatkem 0,05 – 2 nmol/l <sup>125</sup>I-PYY po dobu 2 hodin při 25 °C. Pomocí 10<sup>-6</sup> mol/l PYY byla stanovena nescifická vazba. Po inkubaci byly jamky opět promyty promývacím pufrům a následně došlo k solubilizaci buněk pomocí 0,1 mol/l roztoku NaOH. Lyzáty buněk byly odebrány do předem připravených zkumavek. Radioaktivita navázána na buňkách byla proměřena gama-čítačem. Saturační vazebné experimenty byly prováděny v duplikátech a ve třech nezávislých měření.

**Tabulka 3:** Složení promývacího pufu pro buněčnou linii U2OS a CHO-K1

složky	U2OS; CHO-K1
HEPES pH 7,4	10 mmol/l
NaCl	120 mmol/l
KCl	4,7 mmol/l
MgCl <sub>2</sub>	5 mmol/l

**Tabulka 4:** Složení vazebného pufu pro buněčnou linii U2OS a CHO-K

složky	U2OS; CHO-K1
HEPES pH 7,4	25 mmol/l
NaCl	120 mmol/l
MgCl <sub>2</sub>	5 mmol/l
KCl	4,7 mmol/l
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1 mmol/l
BSA	0,5 %
glukosa	2 g/l
BPTI (jen pro CHO-K1)	0,1 mg/l

---

### **3.2.3 Kompetitivní vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -PYY na buněčné linii U2OS s transfekovaným lidským Y1, Y2 nebo Y5 receptorem**

Buňky U2OS s transfekovaným lidským Y1, Y2 nebo Y5 receptorem, které byly využity pro kompetitivní vazebné experimenty, byly pěstovány, jako je uvedené v kapitole 3.2.2.

Jednotlivé jamky na destičce byly promyty 1ml promývacího pufru (Tab. 3.), který byl vytemperován na laboratorní teplotu. Poté byly buňky inkubovány ve vazebném pufru (Tab. 4.), bez nebo s přidavkem neznačených peptidů v koncentracích  $10^{-11}$ – $10^{-5}$  mol/l a 0,1 nmol/l  $^{125}\text{I}$ -PYY po dobu 2 hodin při 25 °C. Pomocí  $10^{-5}$  mol/l PYY byla stanovena nespecifická vazba. Pro stanovení celkové vazby, byl do jamky přidán vazebný pufr místo neznačeného peptidu. Po inkubaci byly jamky opět promyty promývacím pufrem a následně došlo k solubilizaci buněk pomocí 0,1 mol/l roztoku NaOH. Radioaktivita navázána na buňkách byla proměřena gama-čítačem Wizard 1470. Vazebné experimenty byly prováděny v duplikátech a ve třech nezávislých měřeních.

### **3.2.4 Optimalizace podmínek vazebných experimentů $^{125}\text{I}$ -EYF na buněčné linii CHO-K1 s transfekovaným lidským NPFF2 receptorem.**

Pro stanovení optimálních vazebných podmínek analogů na receptor NPFF2, byla zkoumána inkubační doba, složení vazebného pufru, použití inhibitorů proteolytických enzymů.

Při zjištění optimálních podmínek pro vazbu EYF na buněčnou linii CHO-K1 s transfekovaným NPFF2 receptorem byla prováděna inkubace při teplotě 25°C po dobu 10, 20, 30, 60, 120 minut, dále byl zjišťován vliv inhibitorů proteáz ve vazebném pufru, a to vliv inhibitorů Complete – směs inhibitorů, inhibujících pronasu, chymotrypsin, thermolysin, trypsin, papain a také vliv hovězího pankreatického inhibitoru trypsinu (BPTI) v koncentracích 0,1mg/ml a 1 mg/ml. Všechny vazebné experimenty byly prováděny v duplikátech a ve třech nezávislých měření.

---

### 3.2.5 Saturační vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -EYF na buněčné linii CHO-K1 s transfekovaným lidským NPPF2 receptorem

Buňky CHO-K1 s transfekovaným lidským NPPF2 receptorem byly pěstovány na 24 - jamkových destičkách potažených PEI, pro lepší přilnavost buněk ke dnu destičky a pro lepší odolnost při pokusu. Buňky byly nality v počtu 170000 buněk/jamku. Dále byly ponechány růstu po dobu tří dnů do počtu asi 500000 buněk/jamku.

Jednotlivé jamky na destičce byly promyty 1ml promývacího pufru (Tab. 3.), který byl vytemperován na laboratorní teplotu. Poté byly buňky inkubovány v 250  $\mu\text{l}$  vazebného pufru (Tab. 4.) s přidavkem 0,5 – 5 nmol/l  $^{125}\text{I}$ -EYF po dobu 20 minut při 25°C. Pomocí  $10^{-6}$  mol/l EYF byla stanovena nespecifická vazba. Po inkubaci byly jamky opět promyty promývacím puftrem a následně došlo k solubilizaci buněk pomocí 0,1 mol/l roztoku NaOH. Lyzáty buněk byly odebrány do předem připravených zkumavek a následně byla proměřena radioaktivita. Saturační vazebné experimenty byly prováděny v duplikátech a ve třech nezávislých měření.

### 3.2.6 Vyhodnocení *in vitro* experimentů

Vazebné experimenty s přirozeným PrRP a jeho lipidovanými analogy, NPY, PYY, a EYF byly vyhodnoceny pomocí programu Graph Pad Prism Software (San Diego, CA, USA). Metodou nelineární regrese za předpokladu jednoho vazebného místa byly vyhodnoceny všechny vazebné křivky.

V rovnovážném stavu dochází k rovnováze mezi vznikem a zánikem komplexu ligand-receptor. Rovnovážná disociační konstanta ( $K_d$ ) vyjadřuje molární koncentraci ligandu, při které je ligand navázán na polovinu všech receptorů [mol/l]. Čím nižší je hodnota  $K_d$ , tím vyšší je afinita ligandu k receptoru [34].

$$K_d = \frac{[\text{ligand}] \cdot [\text{receptor}]}{[\text{ligand} - \text{receptor}]}$$

Naváže-li se radioligand na receptor, jedná se o specifickou vazbu,  $B_{\text{sp}}$ . Pokud dojde k navázání radioligandu mimo receptor, jde o nespecifickou vazbu,  $B_{\text{nsp}}$ . Celková vazba představuje celkové množství navázaného radioligandu a je dána součtem specifické vazby a nespecifické vazby [34].

---

Pomocí saturačních vazebných experimentů je zjištěna hodnota  $K_d$ , která udává afinitu ligandu k receptoru a  $B_{max}$ , která udává celkový počet receptorů.

Pomocí kompetitivních vazebných experimentů je stanovena hodnota  $IC_{50}$ , při které je ligand navázán na 50 % všech receptorů. Po dosazení této hodnoty do rovnice Chenga a Prussofa je vypočtena hodnota disociační konstanty neznáčené látky  $K_i$  [34].

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[radioligand]}{K_d}}$$

$K_i$  představuje koncentraci neznáčeného ligandu, který je navázán na polovinu receptorů bez přítomnosti radioligandu nebo jiného kompetitoru.

Hodnoty vazebných experimentů byly získány z třech nezávislých měření, prováděny v duplikátu a jsou uvedeny, jako průměrná hodnota  $\pm$  střední chyba průměru (SEM).

---

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Pokusy *in vitro*

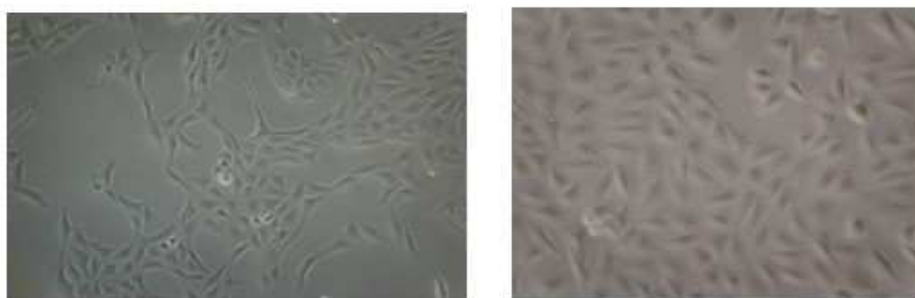
#### 4.1.1 Peptidy a jodace peptidů

Molekulová hmotnost syntetizovaných peptidů byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) na oddělení syntézy peptidů, ÚOCHB, AV ČR. Molární hmotnost syntetizovaných peptidů byla shodná s teoretickou molární hmotností.

Používané peptidy byly značeny radioaktivním izotopem jódu  $^{125}\text{I}$ . Lidský a potkaní PrRP31 byl značen na Tyr<sup>20</sup>, EYF na Tyr<sup>2</sup> a lidský PYY na Tyr<sup>1</sup> pomocí činidla IODO-GEN<sup>TM</sup> dle pokynů výrobce.

#### 4.1.2 Kultivování buněčné linie U2OS a buněčné linie CHO-K1

Buněčné linie byly pěstovány za podmínek popsanych v kapitole 3.2.1. Na obrázku (Obr. 6.), jsou zobrazeny typické tvary pro buněčnou linii U2OS a CHO-K1



**Obrázek 6. Tvary buněk U2OS a CHO-K1**

*Fotografie buněčné linie U2OS je pořízena po 48 hodinách růstu v kultivační láhvi se zvětšením 40x. Fotografie buněčné linie CHO-K1 je pořízena po 48 hodinách růstu v kultivační láhvi se zvětšením 10x.*

## 4.2 Vazebné experimenty

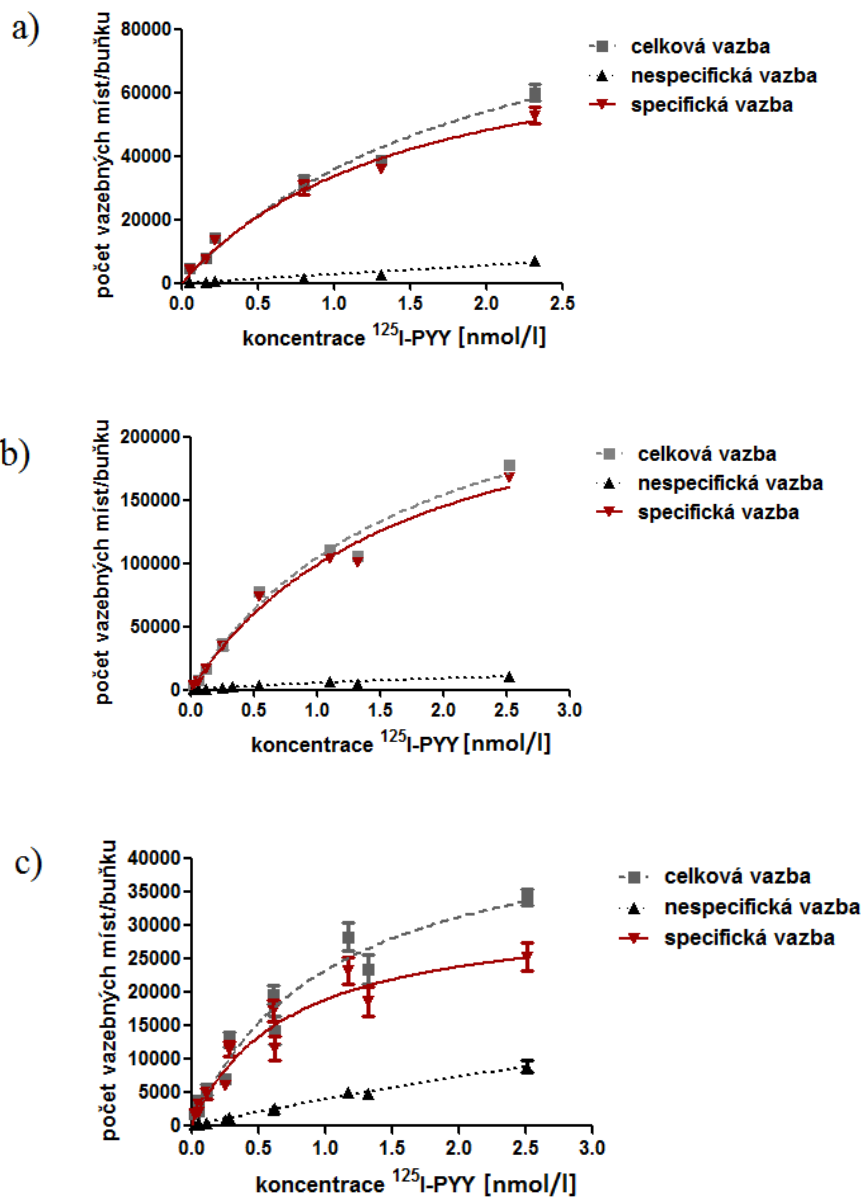
### 4.2.1 Saturační vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -PYY na buňkách U2OS s transfekovaným lidským Y1, Y2 nebo Y5 receptorem

Saturační vazebné experimenty byly prováděny dle uvedených podmínek v kapitole 3.2.2. Pomocí saturačních vazebných experimentů na buněčné linii U2OS s transfekovaným Y1, Y2 nebo Y5 receptorem byla určena hodnota  $K_d$  pro každý receptor a také počet vazebných míst  $B_{\max}$  vazebných míst/buňku pro každý receptor, hodnoty jsou uvedené v (Tab. 5.). Byla přidávána zvyšující se koncentrace radioligandu  $^{125}\text{I}$ -PYY ve finálních koncentracích 0,05 – 2 nmol/l a pro zjištění nespecifické vazby byl přidáván neradioaktivní PYY ve finální koncentraci  $10^{-6}$  mol/l. Saturační vazebné křivky jsou uvedeny na (Obr. 7.).

**Tabulka 5:** Hodnoty disociační konstanty a počet vazebných míst na buňku pro  $^{125}\text{I}$ -PYY v buněčných liniích s Y1, Y2 nebo Y5 receptorem

Hodnoty	Buněčná linie U2OS s Y1 receptorem	Buněčná linie U2OS s Y2 receptorem	Buněčná linie U2OS s Y5 receptorem
$K_d$ [nmol/l]	$1,53 \pm 0,08$	$2,18 \pm 0,85$	$1,01 \pm 0,27$
$B_{\max}$ [vazebných míst/buňku]	$145000 \pm 61000$	$333000 \pm 68000$	$37000 \pm 2600$

*Zjištěná hodnota  $K_d$  disociační konstanty a  $B_{\max}$  vazebných míst na buňku. Získaná data byla měřena v duplikátech v třech nezávislých experimentech a jsou uvedena jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru (SEM).*



**Obrázek 7: Saturační vazebné experimenty  $^{125}\text{I}$ -PYY na buněčné linii U2OS s transfekovaným lidským Y1, Y2 nebo Y5 receptorem**

Saturační vazebné experimenty na U2OS buňkách, které byly inkubovány 120 min při 25 °C se zvyšující se koncentrací  $^{125}\text{I}$ -PYY. Nespecifická vazba byla určena v přítomnosti PYY  $10^{-6}$  mol/l. Hodnota  $K_d$  pro Y1 receptor (a) byla  $(1,53 \pm 0,08)$  nmol/l a  $B_{max}$   $(145000 \pm 61000)$  vazebných míst/buňku. Hodnota  $K_d$  pro Y2 receptor (b) byla  $(2,18 \pm 0,85)$  nmol/l a  $B_{max}$   $(333000 \pm 68000)$  vazebných míst/buňku. Hodnota  $K_d$  pro Y5 receptor (c) byla  $1,01 \pm 0,27$  nmol/l a  $B_{max}$   $(37000 \pm 2600)$  vazebných míst/buňku.

---

#### 4.2.2 Stanovené $K_d$ pro $^{125}\text{I}$ -PYY a receptory Y1, Y2 a Y5

Saturační vazebnými experimenty bylo dokázáno, že analog  $^{125}\text{I}$ -PYY se k receptorům Y1, Y2 váže s nízkou nescifickou vazbou. Na receptor Y5 se  $^{125}\text{I}$ -PYY vázal s vyšší afinitou ale s vyšší nescifickou vazbou oproti receptorům Y1 a Y2, všechny výše uvedené parametry byly v souladu s literaturou [35, 36]. Afinita  $^{125}\text{I}$ -PYY k zmíněným třem receptorům Y je podobná. Hodnoty  $K_d$  se nacházely v nanomolární oblasti.

#### 4.2.3 Kompetitivní vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -PYY na buňkách U2OS s transfekovaným Y1 receptorem

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny dle podmínek uvedených v kapitole 3.2.3. Buňky byly inkubovány s peptidy o koncentraci v rozmezí  $10^{-11}$ – $10^{-4}$  mol/l a s 0,1 nmol/l  $^{125}\text{I}$ -PYY. NPY a PYY, tedy přirozené ligandy se vázaly na receptor Y1 s vysokou afinitou, kdy se hodnota  $K_i$  pohybovala v nanomolární oblasti (Tab. 6., Obr. 8a.). Analogy PrRP31 měly velice nízkou afinitu k receptoru a hodnota  $K_i$  byla v mikromolární oblasti, některé analogy se na daný receptor nevázaly až do koncentrace  $10^{-5}$  mol/l (Tab. 6., Obr. 8a.).

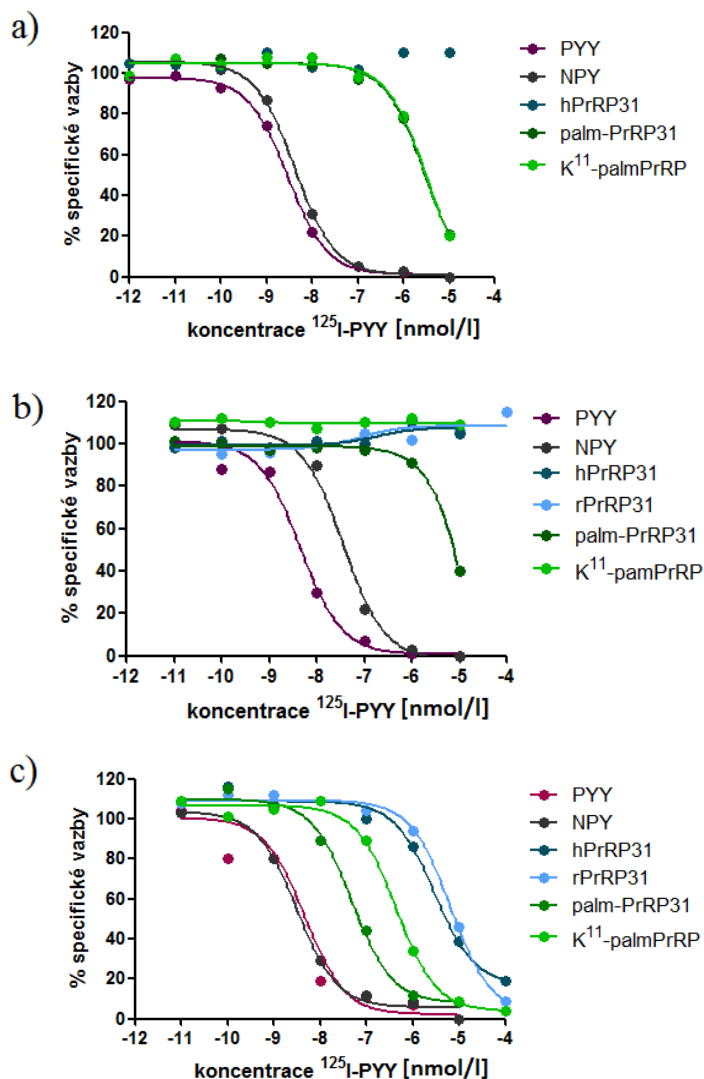
#### 4.2.4 Kompetitivní vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -PYY na buňkách U2OS s transfekovaným Y2 receptorem

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny dle podmínek uvedených v kapitole 3.2.3. Buňky byly inkubovány s peptidy o koncentraci v rozmezí  $10^{-11}$ – $10^{-4}$  mol/l a s 0,1 nmol/l  $^{125}\text{I}$ -PYY. NPY a PYY, tedy přirozené ligandy se vázaly na receptor Y2 s vysokou afinitou, kdy se hodnota  $K_i$  pohybovala v nanomolární oblasti (Tab. 6., Obr. 8b.). Analogy PrRP31 měly velice nízkou afinitu k receptoru, některé analogy se k receptoru nevázaly až do koncentrace  $10^{-5}$  mol/l (Tab. 6., Obr. 8b.).

#### 4.2.5 Kompetitivní vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -PYY na buňkách U2OS s transfekovaným Y5 receptorem

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny dle podmínek uvedených v kapitole 3.2.3. Buňky byly inkubovány s peptidy o koncentraci v rozmezí  $10^{-11}$ – $10^{-4}$  mol/l a s 0,1 nmol/l  $^{125}\text{I}$ -PYY. NPY a PYY, tedy přirozené ligandy se vázaly na receptor Y5 s vysokou afinitou, kdy se hodnota  $K_i$  pohybovala v nanomolární oblasti (Tab. 6., Obr. 8c). Hodnota  $K_i$  přirozeného PrRP31 se nacházela v řádu  $10^{-6}$  mol/l

(Tab. 5., Obr. 8b). U vybraných lipidovaných analogů palm<sup>11</sup>-hPrRP31 a palm-PrRP31 byla afinita k Y5 receptoru vyšší než přirozeného PrRP a hodnoty K<sub>i</sub> se nacházely v řádu 10<sup>-7</sup>–10<sup>-8</sup> mol/l (Tab. 6., Obr. 8c).



**Obrázek 8: Reprezentativní kompetitivní vazebné křivky <sup>125</sup>I-PYY na buňkách U2OS s transfekovaným Y1, Y2 nebo Y5 receptorem**

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny na buňkách s transfekovaným Y1 (a), Y2 (b) nebo Y5 (c) receptorem. Buňky byly inkubovány 120 min při 25°C. Koncentrace radioligandu <sup>125</sup>I-PYY byla 0,1 nmol/l a nespecifická vazba byla určena pomocí neznačeného PYY 10<sup>-5</sup> mol/l. Experimenty byly prováděny v duplikátech a třikrát opakovány. V grafu jsou znázorněny reprezentativní vazebné křivky.

**Tabulka 6:** Afinita používaných analogů k Y1, Y2 a Y5 receptorům

Ligand	lidský Y1 <sup>125</sup> I-PYY	lidský Y2 <sup>125</sup> I-PYY	lidský Y5 <sup>125</sup> I-PYY
	K <sub>i</sub> [nmol/l]	K <sub>i</sub> [nmol/l]	K <sub>i</sub> [nmol/l]
<b>PYY</b>	2,92 ± 0,28	5,79 ± 0,73	3,79 ± 0,66
<b>NPY</b>	3,44 ± 0,36	3,74 ± 0,18	3,1 ± 0,1
<b>hPrRP31</b>	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	2863 ± 42,6
<b>rPrRP31</b>	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	5910 ± 624
<b>palm-PrRP31</b>	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	38,2 ± 6,16
<b>K<sup>11</sup>palm-hPrRP31</b>	>10 <sup>4</sup>	>10 <sup>4</sup>	272 ± 86,7

*Hodnota K<sub>i</sub> byla vyhodnocena z naměřených hodnot IC<sub>50</sub> z Cheng-Prusoffovy rovnice. Získaná data byla měřena v duplikátech v třech nezávislých experimentech a jsou uvedena jako průměr ± střední chyba průměru (SEM).*

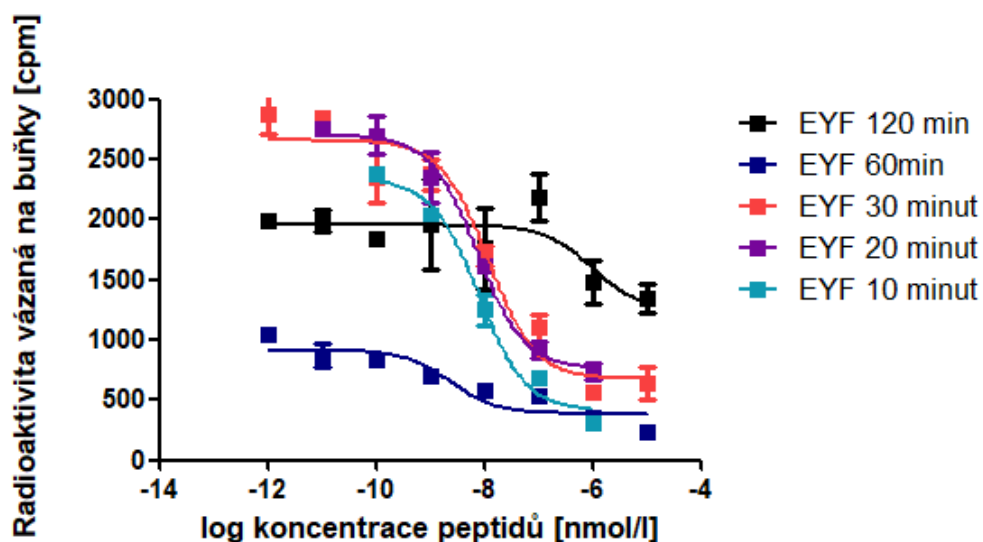
#### **4.2.6 Afinita přirozeného PrRP a jeho palmitoylovaných analogů k receptorům Y1, Y2 a Y5**

Přirozený lidský i potkaní PrRP a jeho dva palmitované analogy vykazovaly velmi nízkou afinitu k lidským receptorům Y1 a Y2. K lidskému receptoru Y5 se vázal přirozený lidský i potkaní PrRP s K<sub>i</sub> v řádu 10<sup>-6</sup> mol/l, palm-PrRP31 s K<sub>i</sub> v řádu 10<sup>-7</sup> mol/l a palm<sup>11</sup>-PrRP31 s K<sub>i</sub> v řádu 10<sup>-8</sup> mol/l. Znamená to, že palmitoylací se zvýšila afinita PrRP k receptoru Y5. Lipidované analogy PrRP mají významnou afinitu k Y5 receptoru, která může přispívat k jejich anorexigennímu účinku in vivo.

### 4.3 Optimalizace podmínek vazebných experimentů $^{125}\text{I}$ -EYF na buňkách CHO-K1 s transfekovaným NPFF2 receptorem

#### 4.3.1 Vliv doby inkubace na vazbu $^{125}\text{I}$ -EYF k buňkám CHO-K1 s NPFF2 receptorem

Při různé době inkubace (10, 20, 30, 60 a 120 minut) při teplotě 25 °C ve vazebném pufru o složení (25mmol/l HEPES pH 7,4, 120 mmol/l NaCl, 5 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 4,7 mmol/l KCl, 1 mmol/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 % BSA, 2 g/l glukosy), bylo zjištěno, že optimální doba inkubace je 20 minut (Obr. 9.). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  pohybovala v řádech  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  mol/l.

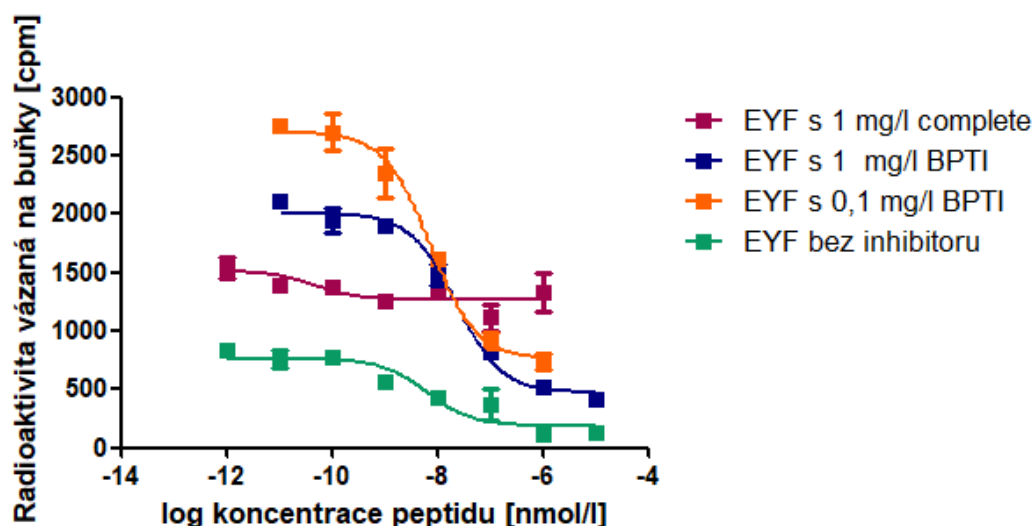


Obrázek 9: Vliv inkubační doby na vazbu  $^{125}\text{I}$ -EYF na receptor NPFF2

Vazebný pokus probíhal ve vazebném pufru o složení (25mmol/l HEPES pH 7,4, 120 mmol/l NaCl, 5 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 4,7 mmol/l KCl, 1 mmol/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 % BSA, 2 g/l glukosy). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  pohybovala v řádech  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  mol/l.

#### 4.3.2 Vliv přítomnosti inhibitorů proteáz ve vazebném pufru na vazbu $^{125}\text{I}$ -EYF k buňkám CHO-K1 s transfekovaným NPFF2 receptorem

Pomocí *in vitro* byl zkoumán vliv inhibitorů proteáz obsažených ve vazebném pufru na vazbu EYF na receptor. Inhibitor proteáz zabraňuje štěpení peptidu na kratší fragmenty. Byl zkoumán vliv směsi inhibitorů proteáz Complete (v koncentraci 1mg/l) a inhibitoru trypsinu BPTI (v koncentracích 0,1 a 1 mg/l). Bylo zjištěno, že inhibitor Complete zhoršuje specifickou vazbu EYF k receptoru, u BPTI bylo zjištěno, že v koncentraci 0,1 mg/l, se specifická vazba EYF k receptoru zlepšila (Obr. 10.). Hodnota  $\text{IC}_{50}$  pro analog, který byl ve vazebném pufru s BPTI o koncentraci 0,1 mg/l, se pohybovala v řádu  $10^{-9}$  mol/l.



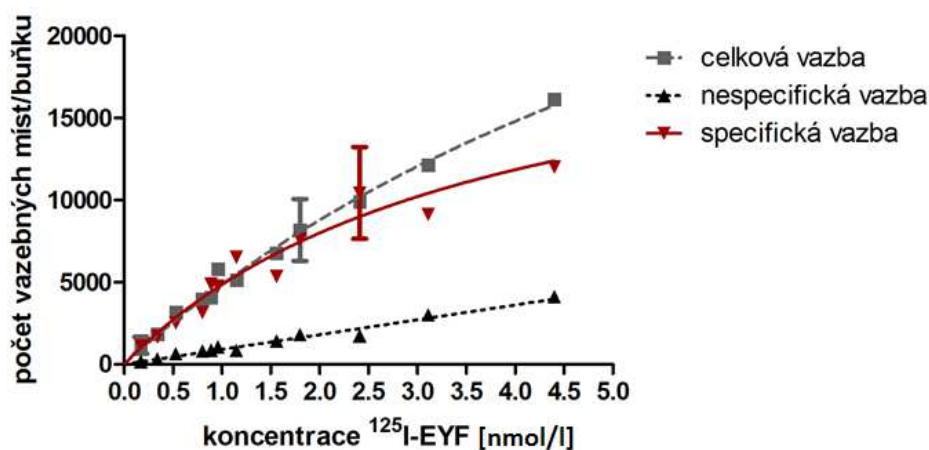
**Obrázek 10:** Vliv inhibitorů proteáz na vazbu  $^{125}\text{I}$ -EYF na NPFF2 receptor

Vazebný pokus probíhal ve vazebném pufru o složení (25mmol/l HEPES pH 7,4, 120 mmol/l NaCl, 5 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 4,7 mmol/l KCl, 1 mmol/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 % BSA, 2 g/l glukosy)+ přidáný inhibitor.

Nalezené optimální podmínky pro vazbu  $^{125}\text{I}$ -EYF na NPFF2 receptor jsou 20 minutová inkubace a vazebný pufr o složení 25 mmol/l HEPES pH 7,4, 120 mmol/l NaCl, 5 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 4,7 mmol/l KCl, 1 mmol/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 % BSA, 2 g/l glukosy, 0,1 mg/l BPTI. Tyto podmínky byly použity pro saturační vazebné experimenty, ke stanovení disociační konstanty a počtu vazebných míst.

#### 4.4 Saturační vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ -EYF na buněčné linii CHO-K1 s transfekovaným NPF2 receptorem

Saturační vazebné experimenty byly prováděny dle podmínek uvedených v kapitole 3.2.5. Pomocí saturačních vazebných experimentů na buněčné linii CHO-K1 s transfekovaným NPF2 receptorem byla pro  $^{125}\text{I}$ -EYF určena hodnota  $K_d$  ( $4,71 \pm 0,96$ ) nmol/l a počet vazebných míst  $B_{\max}$  ( $22000 \pm 4000$ ) vazebných míst/buňku. Byla přidávána zvyšující se koncentrace radioligandu  $^{125}\text{I}$ -EYF ve finálních koncentracích 0,05 – 2 nmol/l a pro zjištění nespecifické vazby byl přidáván neradioaktivní EYF ve finální koncentraci  $10^{-6}$  mol/l. Saturační vazebná křivka je uvedena na (Obr. 11.).



**Obrázek 11: Saturační vazebný experiment  $^{125}\text{I}$ -EYF na buněčné linii CHO-K1 s transfekovaným NPF2 receptorem**

*Saturační vazebný experiment na buňkách CHO-K1, které byly inkubovány 20 min při 25 °C se zvyšující se koncentrací  $^{125}\text{I}$ -EYF. Nespecifická vazba byla určena v přítomnosti EYF  $10^{-6}$  mol/l. Hodnota  $K_d$  byla ( $4,713 \pm 0,956$ ) nmol/l a  $B_{\max}$  ( $22000 \pm 4000$ ) vazebných míst/buňku.*

---

#### 4.4.1 Optimalizace podmínek pro vazbu $^{125}\text{I}$ -EYF na NPFF2 receptor a stanovená $K_d$ .

Za optimální podmínky pro nejvyšší specifickou vazbu  $^{125}\text{I}$ -EYF na NPFF2 receptor při 25 °C byla nalezena doba inkubace 20 minut a vazebný pufr obohacený o 0,1 mg/ml BPTI. Ve vazebném pufru bez přidaného inhibitoru zřejmě docházelo ke štěpení analogu EYF.

Saturační vazebné experimenty ukázaly, že se  $^{125}\text{I}$ -EYF váže na receptor NPFF2 s nízkou nescifickou vazbou a stanovená  $K_d$  je řádu nmol/l podobně jako přirozeného ligandu NPFF, získané hodnoty byly v souladu s literaturou [37]. Stanovená  $K_d$  poslouží k vyhodnocení kompetitivních vazebných experimentů nových analogů PrRP na NPFF2 receptor.

---

## 5. ZÁVĚR

Pomocí saturačních vazebných experimentů byly stanoveny hodnoty  $K_d$  pro  $^{125}\text{I}$ -PYY na buňkách transfekovaných receptorem Y1, Y2 nebo Y5. S použitím těchto  $K_d$  pak byly stanoveny  $K_i$  pro  $^{125}\text{I}$ -PYY a přirozený PrRP a jeho dva lipidované analogy, jeden palmitovaný na N-konci a druhý uprostřed peptidového řetězce.

Bylo zjištěno, že přirozený PrRP i oba palmitoylované analogy PrRP se k buňkám s transfekovaným Y1 a Y2 receptorem vázaly s velmi nízkou afinitou. K receptoru Y5 se vázal přirozený PrRP s  $K_i$  v řádu  $10^{-6}$  mol/l, palm-PrRP31 v řádu  $10^{-7}$  mol/l a palm<sup>11</sup>-PrRP31 dokonce v řádu  $10^{-8}$  mol/l. Znamená to, že palmitoylací se zvýšila afinita PrRP k receptoru Y5. Kromě GPR10 a NPFF2 má tedy lipidovaný PrRP významnou afinitu i k receptoru Y5.

Pro  $^{125}\text{I}$ -EYF, stabilní analog NPFF a buněčnou linii CHO-K1 s transfekovaným NPFF2 receptorem byly optimalizovány podmínky vazby – čas a přítomnost či nepřítomnost inhibitorů proteáz. Podmínky vazby byly optimalizovány na dobu inkubace 20 minut při 25 °C a přítomnost 0,1 mg/l inhibitoru trypsinu BPTI ve vazebném pufru

Pomocí saturačních vazebných experimentů byla stanovena hodnota disociační konstanty  $K_d$  ( $4,713 \pm 0,956$ ) nmol/l a  $B_{\max}$  ( $22014 \pm 4044$ ) vazebných míst/buňku pro  $^{125}\text{I}$ -EYF na buněčné linii CHO-K1 s NPFF2 receptorem. Tento údaj bude základem pro stanovení afinity nových analogů PrRP k receptoru NPFF2.

Cíle, které byly uvedeny v úvodu, byly splněny a informace vyplývající z této práce bude možno využívat pro další studium lipidovaných analogů PrRP, které jsou potenciálními antiobezitiky.

---

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WHO. (2000, i-xii, 1-253). *Obesity: preventing and managing the global epidemic*.
- [2] K. Suzuki, C. N. Jayasena, and S. R. Bloom, "Obesity and appetite control," *Exp Diabetes Res*, vol. 2012, p. 824305, 2012.
- [3] D. J. Heal, J. Gosden, and S. L. Smith, "What is the prognosis for new centrally-acting anti-obesity drugs?," *Neuropharmacology*, vol. 63, pp. 132-46, Jul 2012.
- [4] J. A. Harrold, T. M. Dovey, J. E. Blundell, and J. C. Halford, "CNS regulation of appetite," *Neuropharmacology*, vol. 63, pp. 3-17, Jul 2012.
- [5] J. H. Yu and M. S. Kim, "Molecular mechanisms of appetite regulation," *Diabetes Metab J*, vol. 36, pp. 391-8, Dec 2012.
- [6] M. W. Schwartz, S. C. Woods, D. Porte, R. J. Seeley, and D. G. Baskin, "Central nervous system control of food intake," *Nature*, vol. 404, pp. 661-71, Apr 2000.
- [7] B. Mikulášková, L. Maletínská, J. Zicha, and J. Kuneš, "The role of food intake regulating peptides in cardiovascular regulation," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 436, pp. 78-92, Nov 2016.
- [8] G. J. Dockray, "The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour," *Exp Physiol*, vol. 89, pp. 229-35, May 2004.
- [9] S. Hinuma, Y. Habata, R. Fujii, Y. Kawamata, M. Hosoya, S. Fukusumi, *et al.*, "A prolactin-releasing peptide in the brain," *Nature*, vol. 393, pp. 272-6, May 1998.
- [10] Y. Ibata, N. Iijima, Y. Kataoka, K. Kakihara, M. Tanaka, M. Hosoya, *et al.*, "Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain," *Neurosci Res*, vol. 38, pp. 223-30, Nov 2000.
- [11] B. L. Roland, S. W. Sutton, S. J. Wilson, L. Luo, J. Pyati, R. Huvar, *et al.*, "Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery," *Endocrinology*, vol. 140, pp. 5736-45, Dec 1999.
- [12] H. Jarry, H. Heuer, L. Schomburg, and K. Bauer, "Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release in vivo," *Neuroendocrinology*, vol. 71, pp. 262-7, Apr 2000.
- [13] S. Fukusumi, R. Fujii, and S. Hinuma, "Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP," *Peptides*, vol. 27, pp. 1073-86, May 2006.
- [14] K. L. Ellacott, C. B. Lawrence, N. J. Rothwell, and S. M. Luckman, "PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight," *Endocrinology*, vol. 143, pp. 368-74, Feb 2002.
- [15] C. B. Lawrence, K. L. Ellacott, and S. M. Luckman, "PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling," *Endocrinology*, vol. 143, pp. 360-7, Feb 2002.
- [16] R. G. Boyle, R. Downham, T. Ganguly, J. Humphries, J. Smith, and S. Travers, "Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide," *J Pept Sci*, vol. 11, pp. 161-5, Mar 2005.
- [17] L. Maletínská, A. Spolcová, J. Maixnerová, M. Blechová, and B. Zelezná, "Biological properties of prolactin-releasing peptide analogs with a modified aromatic ring of a C-terminal phenylalanine amide," *Peptides*, vol. 32, pp. 1887-92, Sep 2011.

- 
- [18] L. Malavolta and F. R. Cabral, "Peptides: important tools for the treatment of central nervous system disorders," *Neuropeptides*, vol. 45, pp. 309-16, Oct 2011.
- [19] R. Fujii, S. Fukusumi, M. Hosoya, Y. Kawamata, Y. Habata, S. Hinuma, *et al.*, "Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor," *Regul Pept*, vol. 83, pp. 1-10, Aug 1999.
- [20] M. Engström, A. Brandt, S. Wurster, J. M. Savola, and P. Panula, "Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 305, pp. 825-32, Jun 2003.
- [21] A. Marchese, M. Heiber, T. Nguyen, H. H. Heng, V. R. Saldivia, R. Cheng, *et al.*, "Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors," *Genomics*, vol. 29, pp. 335-44, Sep 20 1995.
- [22] C. J. Langmead, P. G. Szekeres, J. K. Chambers, S. J. Ratcliffe, D. N. Jones, W. D. Hirst, *et al.*, "Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor," *Br J Pharmacol*, vol. 131, pp. 683-8, Oct 2000.
- [23] J. G. Wettstein, B. Earley, and J. L. Junien, "Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y," *Pharmacol Ther*, vol. 65, pp. 397-414, Mar 1995.
- [24] C. W. le Roux and S. R. Bloom, "Peptide YY, appetite and food intake," *Proc Nutr Soc*, vol. 64, pp. 213-6, May 2005.
- [25] L. E. Kuo, J. B. Kitlinska, J. U. Tilan, L. Li, S. B. Baker, M. D. Johnson, *et al.*, "Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome," *Nat Med*, vol. 13, pp. 803-11, Jul 2007.
- [26] P. Holzer, F. Reichmann, and A. Farzi, "Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis," *Neuropeptides*, vol. 46, pp. 261-74, Dec 2012.
- [27] H. Y. Yang, W. Fratta, E. A. Majane, and E. Costa, "Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 82, pp. 7757-61, Nov 1985.
- [28] L. Maletínská, A. Tichá, V. Nagelová, A. Spolcová, M. Blechová, T. Elbert, *et al.*, "Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPFF receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration," *Brain Res*, vol. 1498, pp. 33-40, Mar 2013.
- [29] N. Vyas, C. Mollereau, G. Chevé, and C. R. McCurdy, "Structure-activity relationships of neuropeptide FF and related peptidic and non-peptidic derivatives," *Peptides*, vol. 27, pp. 990-6, May 2006.
- [30] J. M. Zajac, "Neuropeptide FF: new molecular insights," *Trends Pharmacol Sci*, vol. 22, p. 63, Feb 2001.
- [31] C. Mollereau, C. Gouardères, Y. Dumont, M. Kotani, M. Detheux, H. Doods, *et al.*, "Agonist and antagonist activities on human NPFF(2) receptors of the NPY ligands GR231118 and BIBP3226," *Br J Pharmacol*, vol. 133, pp. 1-4, May 2001.
- [32] L. Maletínská, "Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency," *J Pharmacol Exp Ther* 340, pp. 781-6, 2012.
- [33] L. Maletinska, *et al.*, "Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPFF receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration.," *Brain Res.* , pp. 33-40, 2013.

- 
- [34] R. N. H. Motulsky, "Analyzing radioligand binding data," *Curr Protoc Neurosci*, vol. 7, 2002.
- [35] X. Pedragosa-Badia, J. Stichel, and A. G. Beck-Sickinger, "Neuropeptide Y receptors: how to get subtype selectivity," *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 4, p. 5, 2013.
- [36] V. Mäde, K. Bellmann-Sickert, A. Kaiser, J. Meiler, and A. G. Beck-Sickinger, "Position and length of fatty acids strongly affect receptor selectivity pattern of human pancreatic polypeptide analogues," *ChemMedChem*, vol. 9, pp. 2463-74, Nov 2014.
- [37] F. Talmont, L. P. Garcia, H. Mazarguil, J. M. Zajac, and C. Mollereau, "Characterization of two novel tritiated radioligands for labelling Neuropeptide FF (NPFF(1) and NPFF(2)) receptors," *Neurochem Int*, vol. 55, pp. 815-9, Dec 2009.