

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Obor Biochemie

**VAZEBNÉ STUDIE PEPTIDŮ JAKO POTENCIÁLNÍCH
LÁTEK PRO LÉČBU OBEZITY**

Bakalářská práce

Miroslava Pýchová

Školitelka: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.
Garant: RNDr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Praha 2009

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233148717

Prohlašuji, že jsem tuto balalářskou práci vypracovávala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Lenky Maletínské, CSc. (ÚOCHB, v.v.i., AV ČR, Praha) a garanta RNDr. Tomáše Kučery, Ph.D. (PřF UK, Praha), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze.....*2.09.2009*.....

.....*Mirolava Pýchová*.....

Mirolava Pýchová

V úvodu své práce bych ráda poděkovala své školitelce, RNDr. Lence Maletínské, CSc. (ÚOCHB, v.v.i., AV ČR Praha), za obětavou pomoc, trpělivost a konzultace při psaní mé bakalářské práce i experimentální činnosti.

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Darje Koutové, Mgr. Janě Maixnerové a Mgr. Reshe Matyškové za jejich cenné rady a pomoc při experimentální činnosti a celé skupině RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Také bych chtěla poděkovat Ing. Miroslavě Blechové za syntézu peptidů, Mgr. Ivě Veselé za radioaktivní značení peptidů a Mgr. Miloslavu Šandovi za proměření hmotnostních spekter.

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

Tato práce byla podporována grantovou agenturou ČR, grant č. 303/09/0744, a záměrem Z 40550506 AV ČR

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	8
<u>1.1. Ghrelin</u>	8
<u>1.1.1. Cesta k objevu ghrelinu</u>	8
<u>1.1.2. Struktura ghrelinu</u>	9
<u>1.1.3. Receptor</u>	9
<u>1.1.4. Distribuce receptoru GHS-R 1a v organismu</u>	10
<u>1.1.5. Distribuce ghrelinu v organismu</u>	10
<u>1.1.6. Fyziologické funkce</u>	11
<u>1.1.6.1. Uvolnění růstového hormonu</u>	11
<u>1.1.6.2. Regulace energetického metabolismu</u>	12
<u>1.1.6.3. Vliv na příjem potravy</u>	13
<u>1.1.6.4. Gastrointestinální funkce</u>	14
<u>1.1.6.5. Pankreatické funkce</u>	14
<u>1.1.6.6. Kardiovaskulární funkce</u>	15
<u>1.1.6.7. Další funkce</u>	15
<u>1.1.7. Analogy ghrelinu</u>	15
<u>1.1.7.1. Agonisté ghrelinu</u>	15
<u>1.1.7.2. Antagonisté ghrelinu</u>	16
<u>1.2. Hypofyzární buněčné linie</u>	17
<u>1.2.1. RC-4B/C</u>	17
<u>1.2.2. GH3</u>	17
<u>1.2.3. AtT-20</u>	17
<u>1.3. Vazebné experimenty</u>	18
<u>1.3.1. Teorie vazebných experimentů</u>	18
<u>1.3.2. Totální, specifická a nespecifická vazba</u>	18
<u>1.3.3. Saturační vazebné experimenty</u>	19
<u>1.4. V literatuře publikovaná vazba k receptoru GHS-R</u>	19
2. Cíl práce:	21
3. Materiál a chemikálie	22

3.1. Chemikálie	22
3.2. Růstová média	23
3.3. Přístroje	23
3.4. Peptidy	24
4. Metody	25
4.1. Jodace	25
4.1.1. Ghrelin	25
4.1.2. Tyr- Ala GHRP-6	25
4.2. Pěstování buněčných linií	25
4.3. Provedení saturačních vazebných experimentů	26
4.4. Optimalizace podmínek vazebných experimentů	27
4.5. Analýza dat získaných z vazebných pokusů a statistika	28
5. Výsledky	29
5.1. Peptidy	29
5.1.2. Jodace	29
5.1.2.1. Ghrelin	29
5.1.2.2. Tyr-Ala-GHRP-6	29
5.2. Pěstování hypofyzárních buněčných linií	29
5.3. Optimalizace podmínek saturačních vazebných experimentů	31
5.3.1. Závislost vazby ^{125}I -ghr k hypofyzárním buněčným liniím RC-4B/C, AtT-20, GH3 na teplotě a době inkubace	31
5.3.2. Vliv inhibitorů proteas – BPTI, STI a Complete na vazbu ^{125}I -ghr k buněčným liniím RC-4B/C a AtT-20	34
5.3.3. Ověření stability ghrelinu	36
5.3.4. Vliv bacitracinu na vazbu ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6	37
5.4. Saturační vazebné experimenty ^{125}I -ghr k buněčné linii RC-4B/C a AtT-20	39
6. Diskuze	41
7. Souhrn	45
Seznam použité literatury	46

Seznam použitých zkratek:

ACTH – Adenokortikotropní hormon (Adrenocorticotropic Hormone)

AgRP – tzv. Agouti protein (Agouti related protein)

ARC – Nucleus arcuatus

B_{max} – Počet vazebných míst

B_{nsp} – Nespecifická vazba

B_{sp} – Specifická vazba

B_t – Celková vazba

BPTI – Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor)

BSA – Hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)

CNS – Centrální nervová soustava

EGF – Epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor)

FBS – Fetální hovězí sérum (Fetal Bovine Serum)

FSH – Folikulstimulující hormon

GH – Růstový hormon (Growth hormone)

Ghr – Ghrelin

GHRH – Hormon uvolňující růstový hormon (Growth hormone-Releasing Hormon)

GHS – Látky uvolňující růstový hormon (Growth hormone secretagogues)

GnRH – Gonadotropiny uvolňující hormon (Gonadotropins-Releasing hormon)

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin ethan sulfonová kyselina

IHS – Inaktivované koňské sérum (Inactivated Horse Serum)

LH – Luteinizační hormon

K_d – Rovnovážná disociační konstanta

MAPK – Mitogenem aktivovaná proteinová kinasa (Mitogen-Activated Protein Kinase)

mRNA – Mediátorová ribonukleová kyselina (Messenger Ribonucleotic Acid)

NPY – Neuropeptid Y

PEI – Polyethylenimin

POMC – Pro-opiomelanokortin (Pro-opiomelanocortin)

PRL – Prolaktin

RT-PCR – Kvantitativní PCR v reálném čase (Real Time- Polymerase Chain Reaction)

RP-HPLC - Vysokotlaká kapalinová chromatografie s reverzní fází (Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography)

STI – Sojový inhibitor trypsinu (Soybean Trypsin Inhibitor)

TFA – Kyselina tri-fluoroctová (Tri-fluorAcid)

Tris – Tris-hydroxymethyl aminomethan

TSH – Tyreotropin (Thyroid Stimulating Hormone)

VNM – Ventromediální jádro

1. Úvod

1.1. Ghrelin

1.1.1. Cesta k objevu ghreluinu

V roce 1976 Bowers¹ a jeho spolupracovníci syntetizovali při studiu opioidních peptidů enkefalinu a jeho analogů skupinu peptidů, které nazvali látky uvolňující růstový hormon (growth-hormone secretagogues – GHS). Tyto látky neměly opioidní účinky (silné analgetické účinky, ovlivnění psychických, vegetativních a endokrinních funkcí), avšak měly schopnost uvolňovat růstový hormon (growth hormone – GH) z potkaních hypofyzárních buněk. Jako první analog byl popsán methionin enkephalin.¹ O sedm let později tato skupina syntetizovala první peptid, který měl schopnost v závislosti na dávce uvolňovat GH v studiích *in vivo*. Tento peptid se nazýval GHRP-6 a ve studiích *in vivo* také zvyšoval tělesnou hmotnost.² Později byly syntetizovány další analogy GHRP-6, a to např. GHRP-1, GHRP-2 a hexarelin³, jejichž strukturu ukazuje Tab.1.

Tab. 1. Struktura GHS

Analog	Sekvence
GHRP-6	His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂
GHRP-2	D-Ala- D-(2')-Nal-Ala-Trp-D-Nal-Lys-NH ₂
GHRP-1	Ala-His-D-(2')-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂
hexarelin	His-D-2-MeTrp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂

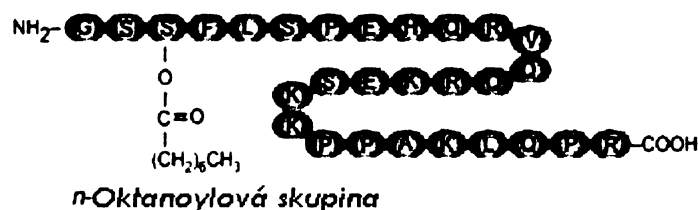
Sekvence těchto peptidů obsahují neesenciální aminokyseliny – D-Nal – D-naftyl-alanin, D-2-MeTrp – D-2-methyl-tryptofan.

Mechanismus uvolnění GH analogy GHS je odlišný od účinku hormonu uvolňujícího růstový hormon (growth hormone releasing hormone – GHRH), který působí na receptor pro GHRH. GHS vyvolávají uvolnění GH působením na receptor, který se nazývá receptor uvolňující růstový hormon (growth hormone secretagogues – receptor – GHS-R).⁴

GHS jsou syntetické sloučeniny a nebyl znám přirozený ligand GHS-R receptoru. Až v roce 1999 se skupině vědců pod vedením M. Kojimy podařilo izolovat endogenní ligand tohoto receptoru z potkaního žaludečního extraktu – ghrelin.⁵ Objev ghreluinu pomohl k pochopení souhry fyziologických procesů mezi žaludkem, hypofýzou a hypotalamem.

1.1.2. Struktura ghrelinu

Polypeptid preproghrelin je tvořen 117 aminokyselinami. 23 N-terminálních aminokyselinových zbytků nese charakteristické rysy signálního sekrečního peptidu.⁵ Po odštěpení signální sekvence vzniká dalším štěpením peptid obsahující 28 aminokyselin, který je dále modifikován. Posttranslační modifikací ghrelinu je esterifikována hydroxylová skupina serinového zbytku v pozici 3 n-oktanovou kyselinou. Tato hydrofobní skupina je nezbytná pro biologickou aktivitu, tedy vazbu na receptor GHS-R.⁵ Strukturu lidského ghrelinu ukazuje Obr.1



Obr. 1 Struktura lidského ghrelinu

Nedávno identifikovaný peptid obestatin obsahující 23 aminokyselin je proteolytický fragment preproghrelinového prekurzoru. Obestatin byl izolován z potkaního žaludečního extraktu, ovšem jestli je stejně tak vylučován i z lidského žaludku, zatím není známo.⁶

Ghrelin je mezidruhově velmi konzervovaný, na což poukazuje například skutečnost, že lidský a krysí ghrelin se liší pouze dvěma aminokyselinami. U krysího ghrelinu jsou v pozici 11 a 12 místo argininu a valinu lysin a alanin. Dále byl také kromě savců detekován u drůbeže, ryb, skokanů, což ukazuje na důležitou roli ghrelinu v evoluci.⁷

1.1.3. Receptor

Sekrece GH je regulována GHRH, který má stimulační efekt, a somatostatinem, který má efekt inhibiční, vazbou na receptor GHRH.⁴ Uvolnění GH je také stimulováno ghrelinem⁵ a skupinou syntetických GHS, které účinkují jinou metabolickou cestou – vazbou na receptor GRS-R.⁴ GHS-R, zprostředkávající tuto odpověď, byl identifikován jako typický receptor spřažený s G-proteinem se sedmi transmembránovými doménami. Tento receptor je zcela odlišný od receptoru GHRH.⁴

Gen pro GHS-R je tvořen dvěma exony. Analýza nukleotidové sekvence genu GHS-R odhalila 2 typy receptoru, pojmenované jako GHS-R 1a a GHS-R 1b.⁸ Receptorový podtyp 1b je odvozen pouze z prvního exonu a kóduje jen pět ze sedmi transmembránových domén.⁷ Zkrácená isoforma GHS-R 1b není biologicky aktivní – není aktivována ligandy GHS-R, jeho funkční role zatím není zcela známa.⁷

Vazba ghrelinu na GHS-R 1a vede především ke zvýšení aktivity proteinkinasy C. Prostřednictvím inositol-trifosfátu dojde k přechodně zvýšené koncentraci iontů Ca^{2+} .⁸

1.1.4 Distribuce receptoru GHS-R 1a v organismu

mRNA pro GHS-R se nachází v mnoha částech mozku. Ve velké míře se vyskytuje v hypotalamu (a to v nucleu arcuatu – ARC a ventromediálním jádru – VMN) a v hipokampu. Velké množství receptorů je v somatotropních buňkách hypofýzy, kde exprese klesá od narození k pubertě. Dále se nacházejí i v šedé hmotě mozkové.^{4,7}

mRNA pro GHS-R byla v malé míře prokázána i v mnoha druzích periferních tkání zahrnujících žaludek, tenké a tlusté střevo, srdce, játra, ledviny, plíce, slinivku a tukovou tkáň. Tato skutečnost poukazuje na rozmanitost funkcí ghrelinu v organismu.^{5,7}

1.1.5. Distribuce ghrelinu v organismu

U všech druhů obratlovců je ghrelin vylučován především v žaludku, a to specializovanými buňkami ve žlázách žaludečního epitelu⁷. Buňky produkující ghrelin byly také nalezeny v tenkém a tlustém střevě. Koncentrace ghrelinu postupně klesá od dvanáctníku k tlustému střevu.⁷

Ghrelinový receptor se nachází hlavně v hypotalamu a hypofýze⁴, nicméně bylo zjištěno, že obsah ghrelinu v mozku je velmi nízký⁷. Byl nalezen v hypotalamickém ARC – důležité části mozku regulující příjem potravy. Nedávné studie odhalily přítomnost ghrelinu v dosud necharakterizovaných hypotalamických neuronech přilehlých ke třetí mozkové komoře mezi dorsální, ventrikulární, paraventrikulární a ARC jádra. Tyto neurony obsahující ghrelin vysílají odstředivá vlákna do neuronů obsahujících neuropeptid Y (NPY) a tzv. Agouti protein (Agouti-related peptide – AgRP) a mohou tak stimulovat vylučování těchto orexigenních peptidů.^{7,9}

Cílovými buňkami ghrelinu jsou somatotropní buňky hypofyzární žlázy, ve kterých ghrelin primárně zvyšuje intracelulární koncentraci Ca^{2+} , a byla zde dokázána přítomnost GHS-R⁷. Ghrelin obsahují i některé hypofyzární tumory.⁷

Dalším orgánem produkujícím ghrelin je slinivka. Vylučování ghrelinu slinivkou je nejvyšší během prenatálního stádia (kdy je naopak vylučování žaludkem nízké)⁷. Navíc pankreatická hladina ghrelinu není ovlivňována hladověním.⁷

mRNA pro ghrelin byla odhalena i v glomerulech ledvin. Ledviny jsou navíc důležitým místem pro degradaci ghrelinu.⁷

V malé míře se ghrelinová mRNA vyskytuje i v dalších periferních tkáních jako jsou plíce, kosti a tuková tkáň.⁵

Buňky vylučující ghrelin byly nalezeny i v placentě⁷ a Sertolliho buňkách.⁷

1.1.6. Fyziologické funkce

Ghrelin je peptidový hormon, jehož výskyt v organismu i fyziologické funkce jsou velmi rozmanité.

1.1.6.1. Uvolnění růstového hormonu

Ghrelin má stimulační efekt na uvolnění GH. Plasmatická koncentrace GH v závislosti na dávce je po intracerebroventrikulárním podání ghrelinu vyšší než po podáním intravenózním.⁷ Stimulační efekt na primární hypofyzární buňky, který vede k uvolnění GH, ukazuje na fakt, že ghrelin může účinkovat přímo na hypofýzu.⁵ Dále se předpokládá, že do stimulačního efektu na uvolnění GH zprostředkované ghrelinem je zapojen hypotalamus, což dokazují studie s pacienty s poškozeným hypotalamem, u kterých bylo pozorováno nedostatečné uvolňování GH dokonce i po podání ghrelinu.⁷

Uvolnění GH po podání ghrelinu potkanům při studiích *in vivo* bylo vyšší, než při pokusech s primárními hypofyzárními buněčnými liniemi. Tyto skutečnosti nasvědčují tomu, že do uvolňování GH po podání ghrelinu jsou zahrnuty ještě další faktory.⁷ Jedním možným faktorem je zprostředkování přenosu přes nervus vagus.⁷ Dalším vysvětlením je synergistický efekt GHRH a ghrelinu.⁷

U lidí vysoké dávky ghrelinu zvyšují hladinu adenokortikotropního hormonu (ACTH), prolaktinu (PRL) a hydrokortisonu.^{7,10}

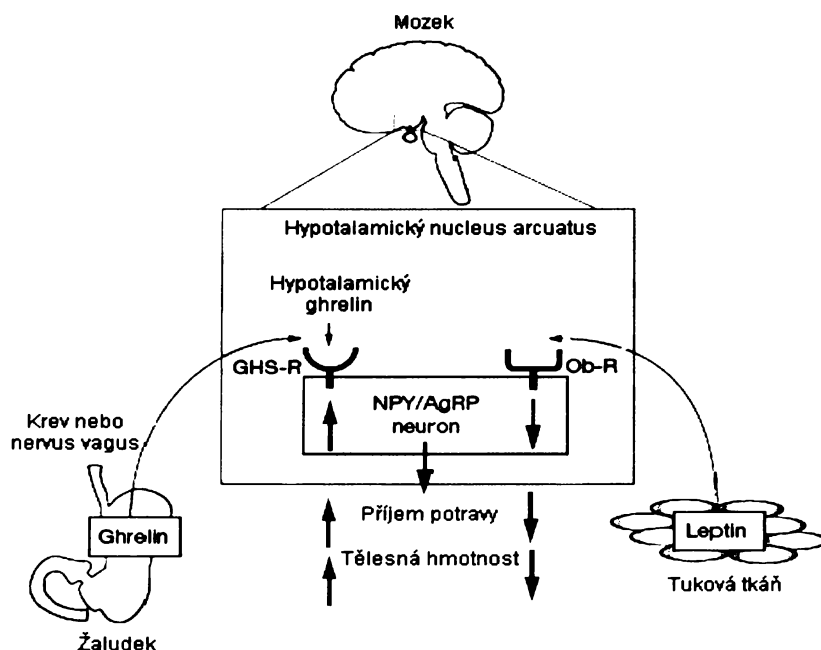
1.1.6.2. Regulace energetického metabolismu

Energetická rovnováha organismu je regulována řadou metabolických procesů, kterých se účastní složky potravy a hormony vytvářené jak v periferních tkáních, tak i v centrální nervové soustavě (CNS). Hypotalamus je řídicí oblastí regulace příjmu potravy a reaguje na podněty z jiných částí CNS i z periferie.¹¹

Jedním z významných periferních signálů ovlivňujících příjem potravy je leptin. Leptin, který má anorexigenní účinky, je produkován bílou tukovou tkání a působí v CNS. Leptin je funkčním endogenním antagonistou ghrelinu, inhibuje ghrelinem navozený zvýšený příjem potravy.⁹

Hlavním místem účinku ghrelinu a leptinu je ARC v hypotalamu. Tyto dva periferní hormony, ovlivňující příjem potravy, mají protichůdné účinky. Ghrelin je orexigenním signálem, tedy zvyšuje příjem potravy, zatímco leptin anorexigenním, tedy snižujícím příjem potravy. Vysvětlením je např. stimulační, resp. inhibiční, účinek na sekreci peptidů NPY a AgRP, které zvyšují příjem potravy^{7,9,12}. Schéma působení ghrelinu a leptinu na regulaci příjmu potravy v hypotalamu je na Obr.2⁹ na str.13. Leptin a ghrelin působí opačně i na celou řadu dalších látek ovlivňujících příjem potravy, jako je např. pro-opiomelanokortin (POMC).¹³

NPY a AgRP jsou produkovány neurony v ARC. S těmito neurony jsou ve spojení odstředivá vlákna neuronů obsahujících ghrelin. Účinek ghrelinu v hypotalamu vyvolávající zvýšení chuti k jídlu je tedy zprostředkován zvýšením produkce a sekrece NPY a AgRP. Účinek leptinu je opačný, potlačuje sekreci těchto orexigenních peptidů. Studie s myši s vyřazeným genem pro ghrelin tato fakta potvrzují.¹²



Obr.2 Schéma regulace příjmu potravy ghrelinem a leptinem v hypotalamu⁹

Ghrelin je periferní orexigenní signál – stimuluje sekreci NPY/AgRP v ARC, čímž působí centrálně na zvýšení příjmu potravy a tělesné hmotnosti, zatímco leptin jako periferní anorexigenní signál má účinky opačné.

Periferně podaný ghrelin stimuluje hypotalamické neurony a tedy stimuluje příjem potravy, ovšem účinek periferního ghrelinu v CNS není zcela objasněn. Ghrelin patrně působí v hypotalamické oblasti mozku dvojným mechanismem. Jedním je pravděpodobně nepřímá cesta, a to působením přes nervus vagus.⁷ Druhým možným vysvětlením je, že díky na ghrelinu vázané mastné kyselině mu je mechanismem prosté difuze umožněn přechod hematoencefalickou bariérou.^{7,9}

Ghrelin podporuje pozitivní energetickou bilanci, zvyšuje příjem energie a snižuje její výdej.

1.1.6.3. Vliv na příjem potravy

Nejdůležitějším faktorem regulujícím sekreci ghrelinu je příjem potravy. Exprese genu pro ghrelin se v žaludečních buňkách zvyšuje během hladovění. Plasmatická hladina ghrelinu je zvýšená před jídlem a během hladovění a, do 1 hodiny po jídle klesá na minimum.^{7,10} Není však zcela jasné, jaké faktory jsou přímo zapojeny do regulace sekrece. Glukosa, podaná jak orálně, tak intravenózně, snižuje plasmatickou koncentraci ghrelinu. Naproti tomu

mechanické roztažení žaludku (např. po příjmu vody) neovlivňuje koncentraci ghrelinu. Rychlejšího snížení plasmatické koncentrace ghrelinu je dosaženo po příjmu vysokokalorického jídla.^{10,13}

Plasmatické koncentrace ghrelinu jsou nízké u obézních lidí a vysoké u lidí štíhlých. Ke zvýšení hladiny dochází po ztrátě hmotnosti vyvolané nízkokalorickou dietou a cvičením. V souladu s těmito fakty je skutečnost, že vysoké plasmatické hladiny byly pozorovány u pacientek se syndromem anorexia nervosa a bulimia nervosa, u nichž se hladina ghrelinu dostala do obvyklých hodnot po zvýšení tělesné hmotnosti vyvolané vysokokalorickou dietou.¹⁰

U pacientů se zmenšením žaludku po chirurgickém zákroku dochází ke ztrátě hmotnosti spojené se snížením plasmatické koncentrace ghrelinu, což potvrzuje, že žaludek je hlavním místem produkce ghrelinu.⁹

1.1.6.4. Gastrointestinální funkce

Intravenózní podání ghrelinu vede ke zvýšení sekrece žaludeční kyseliny a stimuluje gastrointestinální motilitu, což souvisí s přípravou gastrointestinálního traktu na proces příjmu potravy.^{7,10}

Intracerebroventrikulární podání ghrelinu ukazuje, že schopnost ghrelinu stimulovat sekreci žaludečních kyselin je zprostředkována přes nervus vagus.⁸

1.1.6.5. Pankreatické funkce

Vliv ghrelinu na sekreci insulinu není zcela jasný. V určitých experimentech bylo prokázáno, že ghrelin má inhibiční účinky na sekreci insulinu a naopak v jiných experimentech byly prokázány účinky stimulační.⁹ Tato neshoda je zřejmě způsobena rozdílnými experimentálními podmínkami.⁷

Plasmatická hladina ghrelinu, a stejně tak i insulinu, je ovlivňována koncentrací glukosy v krvi, a proto je důležitou experimentální podmínkou hladina glukosy.^{7,9} Pokud je hladina glukosy vysoká (8,3mM), má ghrelin stimulační účinky na hladinu insulinu. Při basálních koncentracích glukosy ghrelin vliv na sekreci insulinu nemá.^{7,9}

1.1.6.6. Kardiovaskulární funkce

Výskyt mRNA pro ghrelin a jeho receptor v srdci a aortě jsou důkazem přímého účinku ghreluinu na kardiovaskulární systém. Ghrelin a jeho agonisté mají kardioprotektivní účinky.^{7,10}

Intravenózní infuze ghreluinu vyvolala u zdravých dobrovolníků pozitivní hemodynamický efekt – pozitivní vliv na krevní proudění, činnost srdce a cév a snížení krevního tlaku.⁷ Prospěšný hemodynamický efekt byl pozorován i u pacientů s městnavým srdečním selháním.⁷

1.1.6.7. Další funkce

Ghreluinu je kromě výše zmíněných připisováno mnoho dalších funkcí. Jednou z nich je vliv na metabolismus kostí. Ghrelin a jeho receptor byly identifikovány v osteoblastech. Studie *in vitro* a *in vivo* prokazují účinek vedoucí k proliferaci a diferenciaci osteoblastů. Systémový pokles sekrece ghreluinu po gastrektomii vede k úbytku kostní tkáně.¹⁰

1.1.7. Analogy ghreluinu

1.1.7.1. Agonisté ghreluinu

V experimentech se syntetizovanými fragmenty ghreluinu byla studována schopnost fragmentů vázat se na receptor GHS-R. Tyto peptidy byly dále hodnoceny dle míry zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Výsledkem je určení aktivního jádra, tedy minimální sekvence potřebné k zachování aktivity (vazby k receptoru) ghreluinu, resp. jeho fragmentů.¹⁴

C-koncové fragmenty se ukázaly jako neaktivní, neacylovaný ghrelin taktéž. Minimální struktura, která má GHS-R aktivitu, tedy aktivní jádro ghreluinu, je N-koncový tetrapeptid se sekvencí Gly-Ser-Ser-Phe, acylovaný oktanovou kyselinou na třetím aminokyselinovém zbytku.¹⁴

Další série experimentů zkoumala vliv řetězce navázaného na serin v pozici 3, vliv aminokyselinového zbytku zaměněného za serin v pozici 3 a efekt změny náboje na N- i C-koncových aminokyselinových zbytcích. Výsledky ukazují, že podstatné pro GHS-R aktivitu je hydrofobicita navázaného řetězce. Dále je z výsledků patrné, že při záměně serinu v pozici 3 za aromatickou kyselinu byla zachována vazba takového analogu k GHS-R, zatímco záměna za aminokyselinu s alifatickým postranním řetězcem vedla zcela ke ztrátě schopnosti

vazby na tento receptor. Důležitá je L-konfigurace aminokyseliny v této pozici.¹⁴ Esterová vazba řetězce není nezbytná pro vazbu a aktivitu analogu, lze ji zaměnit za vazbu amidovou.¹⁵ Pro udržení vysoké aktivity je lepší provést záměnu (na kterémkoliv konci peptidu) za pozitivně nabitou aminokyselinu, negativně nabitě aminokyseliny aktivitu inhibují.¹⁴

Prvním agonistou GHS-R 1a byl ještě před objevením samotného ghrelinu synteticky připravený hexapeptid GHRP-6. Ze strukturně aktivních studií tohoto peptidu vzešly další agonisté, a to GHRP-2, GHRP-1 a hexarelin.³

1.1.7.2. Antagonisté ghrelinu

Ghrelín funguje jako iniciátor příjmu potravy a v dlouhodobém působení má vliv na tělesnou hmotnost. Při současné epidemii obezity, s níž souvisí mnoho dalších chronických onemocnění, se antagonisté receptoru GHS-R 1a jeví jako potenciální antiobezitika.

Z peptidových analogů se jako účinný antagonist GHS-R se ukazuje [D-Lys³]GHRP-6 a [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]substance P. Tyto peptidové sloučeniny měly za následek snížení příjmu potravy a redukci tělesné váhy u myši štíhlých, myši s mutací genu *ob/ob*, i u myši s obezitou vyvolanou vysokokalorickou dietou.¹⁶

Je známo i mnoho nepeptidových antagonistů GHS-R. Jako první byl identifikován isoxazol-karboxamid.¹⁷ Strukturně aktivní studie této sloučeniny vedly k objevení série GHS-R antagonisticky působících molekul.¹⁷ Další série GHS-R 1a antagonistů je odvozena od tetralin-karboxamidu. Tyto sloučeniny měly při studiích *in vivo* lepší farmakodynamické vlastnosti (např. vyšší biologickou dostupnost), než sloučeniny odvozené od isoxazol carboxamidu.¹⁸

Firmou Abbott byly syntetizovány a následně podrobeny testům *in vivo* antagonisticky působící sloučeniny odvozené od 2,4 diaminopyrimidinu. Tyto sloučeniny dosáhly při pokusech na potkanech velmi dobrých výsledků. Bylo zjištěno, že kromě dobré biologické dostupnosti jsou schopny procházet hematoencefalickou bariérou a 14denní terapií bylo u pokusných potkanů dosaženo 5 % úbytku tělesné hmotnosti.¹⁸

Z dalších nepeptidových GHS-R 1a antagonistů lze jmenovat sloučeniny odvozené od benzimidazolonu, benzoazepinu, isoquinolinu či phenylalaninu.¹⁸

1.2. Hypofyzární buněčné linie

1.2.1. RC-4B/C

Epiteliální buněčná linie RC-4B/C byla získána z nezhooubného nádoru (adenomu) přední hypofýzy potkaních samců. Tato linie obsahuje buňky, které produkují GH, luteinizační hormon (LH), folikulstimulující hormon (FSH), prolaktin, adenokortikotropní hormon a tyreotropin (TSH). Ze strukturálního hlediska jsou tyto buňky shodné s diferencovanými buňkami přední hypofýzy, avšak oproti hypofyzárním potkaním buňkám obsahuje tato linie o 20 % větší počet buněk produkujících LH a o 12 % méně buněk produkujících GH. Počet buněk vylučujících PRL, FSH, ACTH a TSH je stejný ve vypěstované linii i potkaní hypofýze. Buněčná linie obsahuje o polovinu méně receptorů pro gonadotropiny uvolňující hormon (Gonadotropins-Releasing hormon – GnRH), přičemž afinita k jeho receptoru je stejná.¹⁹

Užitím RT-PCR (real time-polymerase chain reaction) byla v této buněčné linii prokázána mRNA pro GHS-R 1a receptor a ghrelin.²⁰

1.2.2. GH3

Epiteliální buněčná linie GH3 byla získána ze zhoubného nádoru hypofýzy mladých potkaních samic. Obsahuje buňky produkující GH, a to ve větší míře než primární hypofyzární buňky, a dále produkuje PRL.²¹ Pomocí metody RT-PCR byla v této buněčné linii detekována mRNA receptoru pro somatostatin²², GHS-R 1a receptor a ghrelin²³. Výsledky dalších studií poukazují na to, že ghrelin aktivuje kaskádu kinas MAPK (mitogen-activated protein kinase – mitogenem aktivovaná proteinová kinasa), které zprostředkovávají signalizační kaskádu regulující aktivitu mnoha transkripčních faktorů.

1.2.3. AtT-20

Hypofyzární buněčná linie AtT-20 pochází z tumoru přední hypofýzy myši. Tato linie produkuje ACTH. Přestože se schopnost produkce ACTH po určité době snižuje, jsou buňky AtT-20 stále schopné vyvolat nádorové bujení u zdravých myši. Buněčná linie AtT-20 je využívána ke zkoumání endokrinní a exokrinní sekreční dráhy ACTH.²⁴

1.3. Vazebné experimenty

1.3.1. Teorie vazebných experimentů

Vazebné pokusy s radioaktivně označenou látkou (radioligandem) poskytují mnoho užitečných údajů. Radioligand se může vázat na receptory, enzymy, bílkovinné přenašeče či jiné bílkoviny. Vazebnými experimenty tak lze zjišťovat afinitu ligandu k receptoru a počet receptorů, lokalizovat receptory, zkoumat mechanismus receptorové signalizace, objevovat nové léky a další. Abychom mohli získat hodnotu rovnovážné disociační konstanty, předpokladem vazebných experimentů je dosažení rovnováhy mezi rychlostí vzniku komplexu ligand-receptor (asociace) a rychlostí rozpadu komplexu zpět na ligand a receptor (disociace). Tuto rovnováhu charakterizuje veličina nazývaná rovnovážná disociační konstanta K_d .

$$K_d = \frac{[ligand] \cdot [receptor]}{[ligand \cdot receptor]} \quad [\text{mol/l}]$$

K_d je taková koncentrace ligandu, kdy je obsazena polovina receptorů. Je-li hodnota K_d nízká, znamená to, že afinita ligandu je vysoká, a tak je zapotřebí pouze malé koncentrace ligandu k obsazení receptorů. Naopak vysoká hodnota K_d vypovídá o nízké afinitě ligandu k receptoru.²⁵

1.3.2. Totální, specifická a nespecifická vazba

Specifická vazba (B_{sp}) odpovídá množství navázaného radioligandu na receptor, jež je předmětem našeho zájmu. Radioligand navázaný na ostatní místa na buňce, kterými mohou být např. membrány či jiné receptory, je označován jako nespecifická vazba (B_{nsp}). Za nespecifickou vazbu je považována vazba radioligandu při nejvyšší koncentraci neznačeného ligandu. Po zablokování téměř všech specifických vazebných míst neznačeným ligandem se radioligand váže již jen na nespecifická vazebná místa. Celková vazba (B_t) udává celkové množství navázaného radioligandu bez přítomnosti neznačeného ligandu.²⁵

$$B_t = B_{sp} + B_{nsp} \Rightarrow B_{sp} = B_t - B_{nsp}$$

1.3.3. Saturační vazebné experimenty

Saturační vazebné experimenty slouží k určení afinity, která je charakterizována rovnovážnou disociační konstantou K_d , a počtem receptorů (B_{max}). Tyto hodnoty jsou určeny z grafu specifické vazby. B_{sp} je určena jako B_t zmenšená o hodnotu B_{nsp} . Experimenty se provádějí s jednotnou koncentrací neznačeného ligandu a vzrůstající koncentrací radioligandu.²⁵

Při těchto experimentech se předpokládá dosažení rovnováhy a dále také, že jen malá část radioligandu se váže, a proto koncentrace volného radioligandu je téměř identická s koncentrací přidanou.²⁵

Za rovnováhy je specifická vazba závislá na koncentraci volného [L] radioligandu a lze ji vyjádřit jako násobek dílčího obsazení a počtu vazebných míst. Tento vztah popisuje rovnice²⁵:

$$B_{sp} = \text{dílní obsazení} \times B_{max} = \frac{B_{max} \times [L]}{K_d + [L]}$$

Hodnota nespécifické vazby by měla činit méně než 50 % z vazby celkové, v ideálním případě méně než 25 %. Pokud by byla hodnota nespécifické vazby vyšší než 50 % vazby celkové, bylo by obtížné získat spolehlivé výsledky, a proto by v takovém případě bylo vhodné upravit podmínky experimentu.²⁵

1.4.V literatuře publikovaná vazba k receptoru GHS-R

Specifická vazba analogů ghrelinu a GHS k receptoru GHS-R byla prokázána v různých tkáních jak potkaních, tak i lidských, tumorových i netumorových.^{26,27,28,29} Pro strukturálně aktivní studie analogů ghrelinu se také často používají buňky s transfektovaným receptorem GHS-R.^{28,30}

Jako radioligand, čili radioaktivně označený agonista receptoru GHS-R, byly používány různé sloučeniny.

Vazebnými experimenty (saturačními i kompetitivními) s ¹²⁵I-Tyr-Ala-GHRP-6 byla určena specifická vazba k receptoru GHS-R na membránách buněk izolovaných z přední hypofýzy a hypotalamu potkana.²⁶

Pomocí ^{125}I -Tyr-Ala-hexarelinu byla vazebnými experimenty dokázána specifická vazba k receptoru GHS-R v membránách buněk izolovaných z lidské hypofýzy a hypotalamu.

Saturačními vazebnými experimenty s radioligandem [^{125}I]-Tyr⁴-ghrelin, (jehož radioaktivní označení do této polohy bylo umožněno díky záměně aminokyseliny phenylalaninu za tyrosin přirozeného ghrelu), byla dokázána exprese receptoru GHS-R na membránách buněk z maligního i benigního tumoru prostaty a buněčných liniích DU-145 a PC 3 pocházejících z tumoru prostaty.²⁸

[^{35}S]MK-0677 je agonistou receptoru GHS-R, jenž byl využíván jako kompetitor ke stanovení afinity fragmentů ghrelu při strukturně aktivních studiích prováděných na membránách buněk z buněčné linie HEK-293 s klonovaným receptorem *h*GHS-R 1a.¹⁵

Saturačními vazebnými experimenty s [^{125}I -His⁹]-ghrelin byl lokalizován receptor GHS-R ve zdravých tkáních lidského kardiovaskulárního systému.²⁹ Stejný radioligand využívala studie stanovující afinitu agonistů a antagonistů k receptoru *h*GHS-R 1a klonovaným v buněčné lince LLC-PK-1.³⁰

2. Cíle práce:

- Optimalizovat podmínky pro studium vazby ^{125}I -ghr a ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6 k hypofyzárním buněčným liniím RC-4B/C, AtT-20 a GH3.
- Pomocí saturační vazby ^{125}I -ghr k buňkám určit základní vazebné konstanty rovnovážnou disociační konstantu K_d a počet vazebných míst na buňku B_{\max} .

3. Materiál a chemikálie

3.1. Chemikálie

- Bacitracin – Sigma, St. Louis, MO, USA
- BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor - hovězí pankreatický inhibitor trypsinu) - Sigma, St. Louis, MO, USA
- BSA (Bovine Serum Albumin – hovězí sérový albumin) – Serva, Heidelberg, Německo
- CaCl₂ dihydrát - LACHEMA, Brno, ČR
- Complete (Směs inhibitorů proteas – pankreatický extrakt, pronasa, thermolysin, chymotrypsin, trypsin, papain) – Roche, Basilej, Švýcarsko
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
- EGF (Epidermal Growth Faktor – epidermální růstový faktor) - Sigma, St. Louis, MO, USA
- FBS (Fetal Bovine Serum – plodové hovězí sérum) - PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
- Ghrelin – NeoMPS, Štrasburg, Francie
- D-glukosa – PENTA, Chrudim, ČR
- L-glutamin – PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
- Medium HAM'S F-10 – PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
- IHS (Inaktivované Horse Serum – koňské inaktivované sérum) – PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
- HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethan sulfonová kyselina) – Sigma, St. Louis, MO, USA
- Iodo-Gen – Pierce Chemicals Co., Rockford, IL, USA
- KCl – Sigma, St. Louis, MO, USA
- NaCl – LACHEMA, Brno, ČR
- Na¹²⁵I – MP Biomedicals, Illkirch, Francie
- NaOH – PENTA, Chrudim, ČR
- MgCl₂ – LACHEMA, Brno, ČR
- PEI (polyethylenimin) – Sigma, St. Louis, MO, USA

- Penicil/Streptomycin – PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
- STI (Soybean Trypsin Inhibitor – sojový inhibitor trypsinu) – Sigma, St. Louis, MO, USA
- TRIS (tri-hydroxymethy aminomethan) – Sigma, St. Louis, MO, USA

3.2. Růstová média

Hypofyzární buněčné linie byly pěstovány v umělých tekutých růstových médiích, v přítomnosti séra, které poskytuje důležité růstové faktory. Základní média obsahují esenciální aminokyseliny, zdroj energie, vitaminy a soli. Volba média je závislá na typu buněk. Důležitým faktorem ovlivňujícím růst buněk je pH. Námi používané buněčné linie rostly při pH 7,4. Pro snadné monitorování pH je v základním médiu obsažen indikátor pH. Složení použitých růstových médií přehledně shrnuje tabulka (Tab. 2).

Tab. 2: Přehled použitých růstových médií

Buněčná linie	Základní médium	Přidané látky	Množství přidané látky
RC-4B/C	DMEM	FBS	10 obj. %
		L-glutamin	2 obj. %
		penicilin/streptomycin	1 obj. %
		EGF	2,5 µg/l
GH3	HAM'S F-10	HIS	15 obj. %
		FBS	2,5 obj. %
		L-glutamin	2 obj. %
		penicilin/streptomycin	1 obj. %
AtT-20	DMEM	FBS	10 obj. %
		L-glutamin	2 obj. %
		penicilin/streptomycin	1 obj. %

3.3. Přístroje

Biohazardní box (EuroFlow S41, Clean Air, Woerden, Nizozemí)

Centrifuga HETTICH Univerzal 320, Tuttlingen, Německo

CO₂ inkubátor MCO 18AIC, Sanyo, Osaka, Japonsko

Gama-čítač (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)
Mikroskop Stand Axiovert 40 CFL, Zeiss, Oberkochen, Německo

3.4. Peptidy

Peptid ghrelin byl zakoupen od firmy NeoMPS (Štrasburg, Francie).

Peptid Tyr-Ala-GHRP-6 byl syntetizován v Ústavu organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i., Praha, metodou syntézy na pevné fázi. Jelikož sekvence peptidu GHRP-6 neobsahuje žádný aminokyselinový zbytek, který by mohl být jodován, byl na N-konec tohoto peptidu připojen Ala-Tyr. Takto vytvořený peptid mohl již být radioaktivně jodován, a to na tyrosinu.

4. Metody

4.1. Jodace

4.1.1. Ghrelin

Ghrelin byl jodován v pozici 9 na histidinovém zbytku Na¹²⁵I či neradioaktivním NaI s činidlem Iodo-gen v 0,1 M sodnofosfátovém pufru o pH 7,2 v laboratoři Radioizotopy, ÚOCHB, v.v.i., AVČR Praha. Jodace probíhala 15 minut při pokojové teplotě, podle instrukcí výrobce. Radioaktivní nebo neradioaktivní nejodovaný, mono-jodovaný a di-jodovaný ghrelin byl separován pomocí RP-HPLC po 30 minut. Jako mobilní fáze byl použit 20% až 40% gradient acetonitrilu ve vodě s 1% TFA (kyselinou trifluoroctovou).³¹

Mono-jodovaný [¹²⁵I-His⁹]-ghrelin (dále jen ¹²⁵I-ghr) používaný pro naše experimenty byl uchován v alikvotech při -20 °C a spotřebován v průběhu jednoho měsíce.

4.1.2. Tyr- Ala GHRP-6

Tyr-Ala-GHRP-6 byl jodován v pozici 1 na tyrosinovém zbytku Na¹²⁵I či neradioaktivním NaI s činidlem Iodo-gen v 0,1 M sodnofosfátovém pufru o pH 7,2 v laboratoři Radioizotopy, ÚOCHB, v.v.i., AVČR Praha. Jodace probíhala 15 minut při pokojové teplotě, podle instrukcí výrobce. Radioaktivní nebo neradioaktivní nejodovaný, mono-jodovaný a di-jodovaný ghrelin byl separován pomocí RP-HPLC po 5 minut při použití 20% až 30% gradientu acetonitrilu ve vodě s 1% TFA a následně 60 minut při 30% až 40% gradientu acetonitrilu ve vodě s 1% TFA.³¹

Mono-jodovaný ¹²⁵I-Tyr-Ala-GHRP-6 byl uchován v alikvotech při -20 °C a spotřebován v průběhu jednoho měsíce.

4.2. Pěstování buněčných linií

Hlavním požadavkem při pěstování živočišných tkáňových buněk je přísná sterilita. K manipulaci s buňkami tedy dochází výhradně v laminárním boxu zaručujícím sterilitu prostředí. Kultivovány jsou buňky v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 95 % vzduchu a 5 % oxidu uhličitého.

Tkáňové buňky jsou pěstovány v tekutých růstových médiích. Buněčné linie jsou adherentní, tzn. že mají tendenci přilnout na dno nádoby. Pro zlepšení adheze jsou plastové nádoby potahovány vrstvou polyethyleniminu (PEI).

Při kultivaci je třeba dbát na to, aby buňky nedosáhly 100% konfluency (kompletní porost na dně nádoby). V této fázi buňky zastavují růst, dochází ke ztrátě adheze a buňky odumírají. Po určité době růstu se do média začínají uvolňovat metabolity buněk, což se projeví změnou barvy média, tedy změnou pH. Aby se předešlo odumírání a uvolňování buněk do média, bylo prováděno po určité době (2–4 dnech), v závislosti na počtu buněk, pasážování (přeočkování). Před pokusem byly buňky asi z 80 % konfluentní.

Přesné zjištění počtu buněk se provádělo přímým počítáním buněk - mikroskopicky, pomocí speciální tzv. Bürkerovy komůrky. Počet buněk v jednom čtverci Bürkerovy komůrky (0,1 μ l) násobený 10 000 odpovídal počtu buněk v 1 ml.

Pro vazebné pokusy byly buňky pěstovány v 24-jamkových destičkách (NuncTM, NUNC, Roskilde, Dánsko), s průměrem jamky 15 mm. Dno jamek bylo potaženo polyethyleniminem.

Před každým pokusem byly buňky kontrolovány mikroskopicky. Buňky byly počítány vždy před i po pokusu.

4.3. Provedení saturačních vazebných experimentů

Vazebné experimenty na destičkách porostlých buněčnými liniemi byly prováděny v prostředí pufrů o pH 7,4. Pufry byly připravovány z deionizované vody.

Pro inkubaci vazebných experimentů byl používán vazebný pufr.

Vazebný pufr obsahoval:

- 50 mM Tris
- 120 mM NaCl
- 4,7 mM KCl
- 5 mM MgCl₂
- 5,5 mM glukosy

- 1 g/l BSA

Na promývání destiček porostlých buňkami byl používán promývací pufr.

Promývací pufr obsahoval:

- 10 mM HEPES
- 120 mM NaCl
- 4,7 mM KCl
- 5 mM MgCl₂
- 5,5 mM glukosy
- 0,015 % (hmotnostních) Triton

Z každé jamky bylo před pokusem odsáto růstové médium a jamka byla promyta 1 ml promývacího pufru, který byl předem vytemperován na 25 °C. Pro určení B_t bylo do každé jamky napipetováno 225 µl vazebného pufru, do ostatních jamek, v nichž se určovala B_{nsp}, bylo napipetováno 225 µl neznačeného peptidu tak, aby finální koncentrace ghrelinu (ghr) byla 10⁻⁶ či Tyr-Ala-GHRP-6 10⁻⁵. Dále bylo do všech jamek napipetováno 25 µl radioligandu tak, že finální koncentrace byla v rozmezí 0,1–12 nM.

Po uplynutí inkubační doby byly všechny jamky po odsátí vazebného pufru třikrát promyty 1 ml promývacího pufru. Následně byly buňky podrobeny solubilizaci roztokem NaOH. Do všech jamek bylo napipetováno 400 µl 0,1 M NaOH. Po minimálně 15 minutách byl obsah jamky přenesen pipetou do předem označené speciální plastové zkumavky, určené pro vložení do γ-čítače. Pro odebrání maximálního možného množství solubilizovaných buněk byla každá jamka nakonec ještě promyta 200 µl roztoku 0,1 M NaOH, který byl přidán do plastových zkumavek. Radioaktivita navázaná na buňkách byla proměřena na γ-čítači.

Pokusy byly vždy prováděny v duplikátech a alespoň třikrát opakovány.

4.4. Optimalizace podmínek vazebných experimentů

Pro každou buněčnou linii byly zjišťovány optimální podmínky pro průběh experimentu.

Jako pufr byl vždy používán vazebný pufr – viz kapitola 4.3. Při hledání optimálních teplotních podmínek a doby inkubace při konkrétní teplotě byla vyzkoušena inkubace při 4 °C po dobu 90 minut, při 25 °C po dobu 60 minut a při 37 °C po dobu 30 minut.

Dále bylo zjišťováno vhodné složení pufru. Do pufru byly přidávány inhibitory proteas – sojový inhibitor trypsinu (soybean trypsin inhibitor – STI) – v koncentraci 0,1 mg/ml, hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (bovine pancreatic trypsin inhibitor – BPTI) – v koncentraci 0,1 mg/ml a nebo směs inhibitorů proteas – Complete – v koncentraci 1 tableta na 50 ml.

Další látkou přidávanou do pufru byl bacitracin (1 mg/ml).

4.5. Analýza dat získaných z vazebných pokusů a statistika

Saturační vazebné křivky byly vypočteny v programu Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA). Byl použit model nelineární regrese pro vazbu na jedno vazebné místo.

Hodnoty B_{\max} a K_d byly získány pomocí nelineární regrese a byly statisticky zpracovány a vyjádřeny jako průměr \pm střední chyba průměru (s).

5. Výsledky

5.1. Peptidy

Molekulová hmotnost syntetizovaného peptidu Tyr-Ala-GHRP-6 byla ověřena na hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Bylo prokázáno, že se shoduje s teoretickou hmotností. Čistota peptidu byla vyšší než 95 %.

5.1.2. Jodace

5.1.2.1. Ghrelin

Ghrelin byl jodován radioaktivně i neradioaktivně na oddělení Radioizotopy ÚOCHB, v.v.i., AVČR Praha. Produktem reakcí byl mono-jodovaný a di-jodovaný ghrelin v poměru 2:1, přičemž část ghreluinu zůstala nezreagovaná.

Mono-jodovaný ^{125}I -ghr používaný při našich experimentech byl od di-jodovaného a nezreagovaného ghreluinu oddělen pomocí RP-HPLC.

5.1.2.2. Tyr-Ala-GHRP-6

Tyr-Ala-GHRP-6 byl jodován radioaktivně i neradioaktivně na oddělení Radioizotopů ÚOCHB, v.v.i., AVČR Praha. Produktem reakcí byl mono-jodovaný a di-jodovaný ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6, resp. I-Tyr-Ala-GHRP-6, přičemž část peptidu zůstala nezreagovaná.

Problémem při syntéze i dělení pomocí RP-HPLC byla vysoká adsorpce na stěny nádob a kolonu. Výtěžek mono-jodovaného ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6 činil přibližně 27 %.

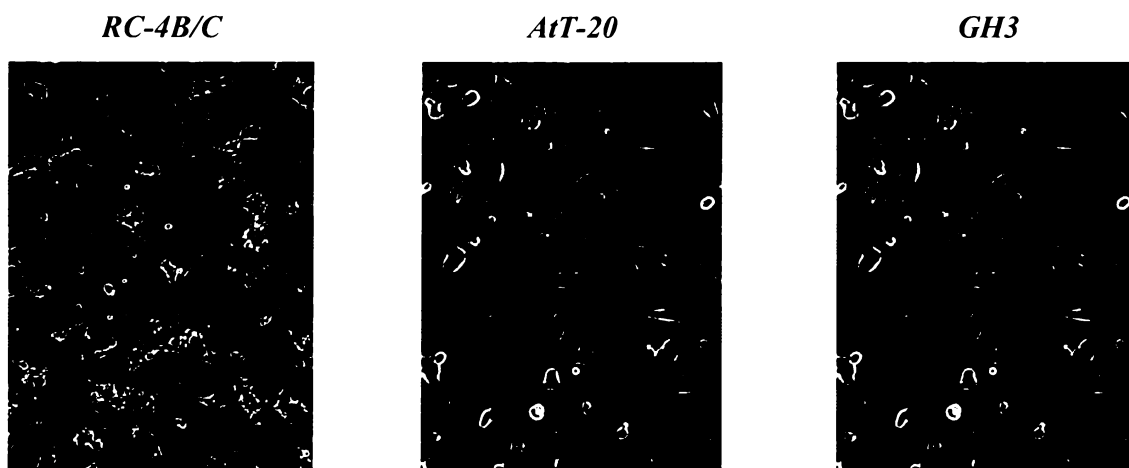
5.2. Pěstování hypofyzárních buněčných linií

Vazebné experimenty byly prováděny na celých buňkách pěstovaných na 24-jamkových destičkách. V jednotlivých experimentech bylo použito 300–430 tisíc buněk na jamku.

Potažením destiček PEI bylo dosaženo dobré adheze buněk hypofyzárních linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20. Přisednutím buněk bylo zajištěno homogenní rozložení buněk na dně jamky a vyšší odolnost buněk při pokusu. Kultivací buněk za sterilních podmínek, ve

vhodném růstovém médiu a za optimálních teplotních podmínek byl zachován správný růst buněčných linií.

Fotografie hypofyzárních buněčných linií jsou na Obr. 3.



Obr.3 Hypofyzární buněčné linie

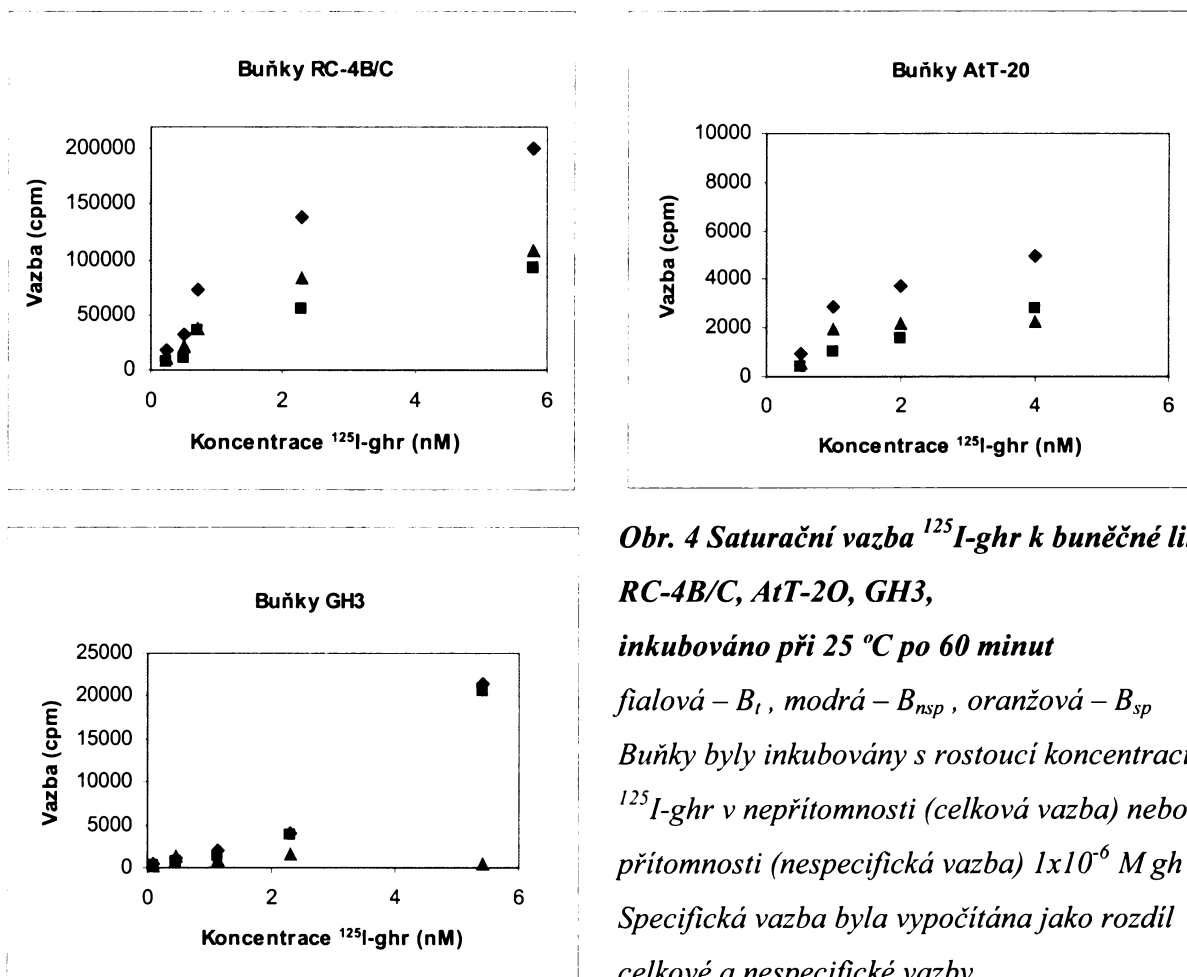
Buňky byly fotografovány po 72-96 hodinách růstu se zvětšením 20x.

5.3. Optimalizace podmínek saturačních vazebných experimentů

5.3.1. Závislost vazby ^{125}I -ghr k hypofyzárním buněčným liniím RC-4B/C, AtT-20, GH3 na teplotě a době inkubace

Z vazebných pokusů při různé teplotě (4 °C, 25 °C a 37 °C) a době inkubace (30, 60 a 90 minut) bylo zjištěno, že pro buněčnou linii RC-4B/C a AtT-20 jsou optimální podmínky inkubace pro vazbu ^{125}I -ghr při 25 °C po dobu 60 minut, kdy nespecifická vazba tvořila méně než 50 % z celkové vazby, a proto se tyto podmínky ukázaly jako vhodné pro další experimenty.

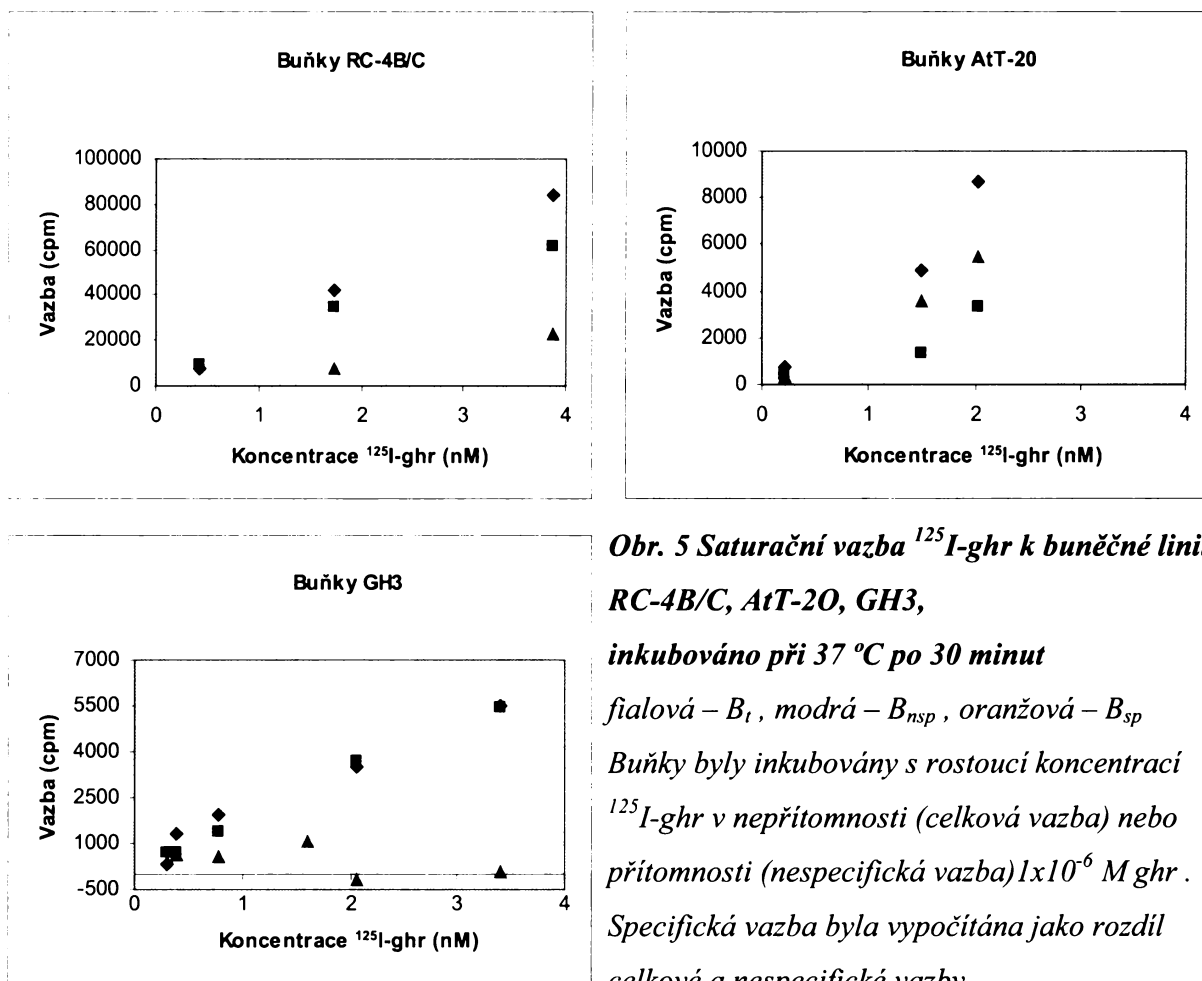
U buněčné linie GH3 byla při těchto podmínkách příliš vysoká nespecifická vazba, nelze určit vazbu specifickou. Tyto údaje ukazuje Obr.4.



Obr. 4 Saturační vazba ^{125}I -ghr k buněčné linii RC-4B/C, AtT-20, GH3, inkubováno při 25 °C po 60 minut
fialová – B_t , modrá – B_{nsp} , oranžová – B_{sp}
Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ^{125}I -ghr v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 1×10^{-6} M gh. Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby.

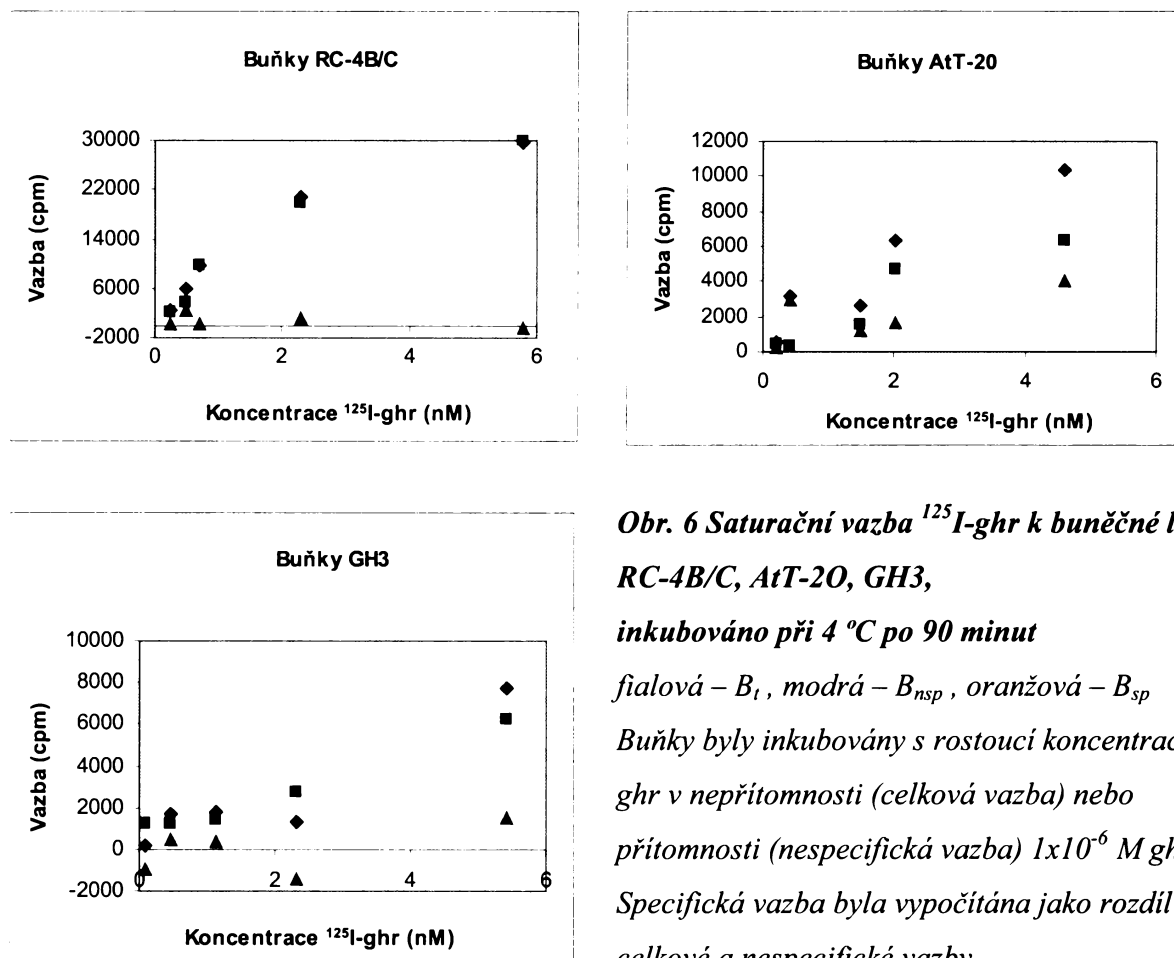
Při experimentech inkubovaných při 37 °C po dobu 30 minut byla u buněčných linií RC-4B/C a AtT-20 pozorována příliš vysoká nespecifická vazba ^{125}I -ghr, tvořila více než 50 % z celkové vazby. V takovém případě z vazebných křivek nelze určit specifickou vazbu a proto se tyto inkubační podmínky ukázaly jako nevhodné.

U buněčné linie GH3 byly křivky celkové a nespecifické vazby téměř totožné, a tak nebylo možno pozorovat žádnou specifickou vazbu. Tyto údaje ukazuje Obr.5.



Obr. 5 Saturační vazba ^{125}I -ghr k buněčné linii RC-4B/C, AtT-20, GH3, inkubováno při 37 °C po 30 minut
fialová – B_t , modrá – B_{nsp} , oranžová – B_{sp}
Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ^{125}I -ghr v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 1×10^{-6} M ghr. Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby.

Dále byl testován vliv inkubačních podmínek 4 °C po 90 minut na vazbu ^{125}I -ghr k buněčným liniím RC-4B/C, AtT-20, GH3. Tyto podmínky inkubace se ukázaly jako nevhodné pro vazbu ^{125}I -ghr. U žádné z buněčných linií při těchto podmínkách nebyla pozorována specifická vazba. Tyto údaje ukazuje Obr.6.



Obr. 6 Saturační vazba ^{125}I -ghr k buněčné linii RC-4B/C, AtT-20, GH3,

inkubováno při 4 °C po 90 minut

fialová – B_t , modrá – B_{nsp} , oranžová – B_{sp}

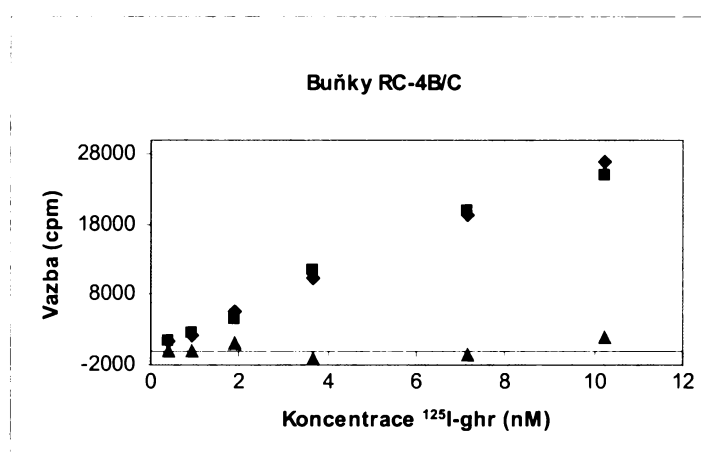
Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ^{125}I -ghr v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 1×10^{-6} M ghr.

Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby.

5.3.2. Vliv inhibitorů proteas – BPTI, STI a Complete na vazbu ^{125}I -ghr k buněčným liniím RC-4B/C a AtT-20

BPTI, STI jsou inhibitory proteas a Complete je směsí inhibitorů proteas zabraňující tomu, aby se ^{125}I -ghr během inkubace degradoval (štěpil na kratší fragmenty).

Z Obr. 7 je patrné, že **BPTI** přidaný do vazebního pufru (v koncentraci 0,1 mg/ml) vedl k výraznému snížení celkové vazby a způsobil, že se ^{125}I -ghr vázal jen nespecificky, a tak nelze pozorovat žádnou specifickou vazbu k buňkám linie RC-4B/C. BPTI má prokazatelně negativní vliv na vazbu ^{125}I -ghr, proto nebyl dále testován na jiných buněčných liniích.

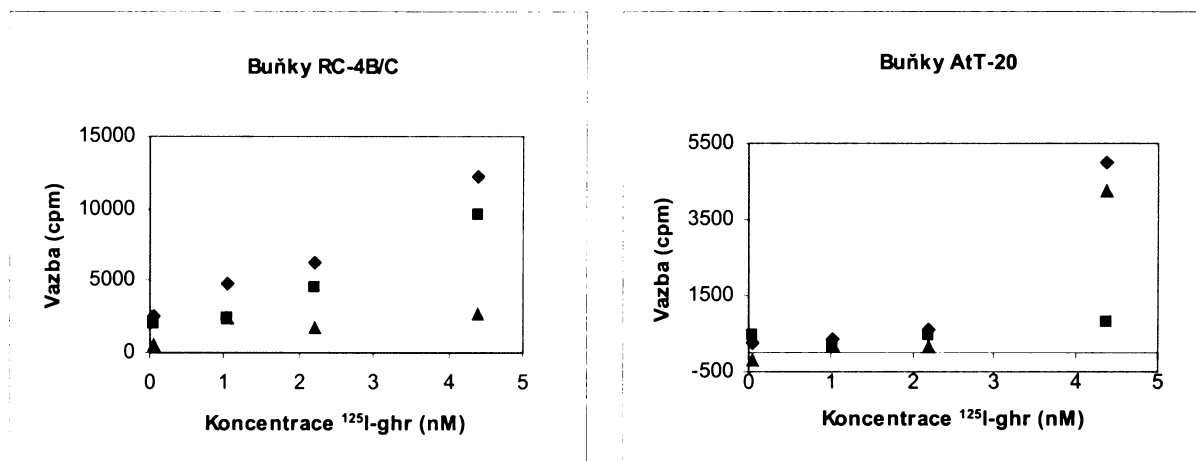


Obr. 7 Saturační vazba ^{125}I -ghr k buněčné linii RC-4B/C, inkubováno při 25°C po 60 minut, v přítomnosti BPTI

fialová – B_t , modrá – B_{nsp} , oranžová – B_{sp}

Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ^{125}I -ghr v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 1×10^{-6} M ghr. Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby.

Dále byly prováděny saturační vazebné experimenty s ^{125}I -ghr k buňkám linií RC-4B/C a AtT-20, inkubované při 37 °C po 30 minut, resp. při 25 °C po 60 minut ve vazebném pufru obsahujícím **Complete** (1 tableta v 50 ml). Z grafů na Obr.8 můžeme pozorovat, že inkubací za těchto podmínek došlo k vymizení specifické vazby ^{125}I -ghr k buněčné linii AtT-20. U experimentu prováděném s buněčnou linií RC-4B/C došlo ke snížení celkové vazby a tedy i vazby specifické.

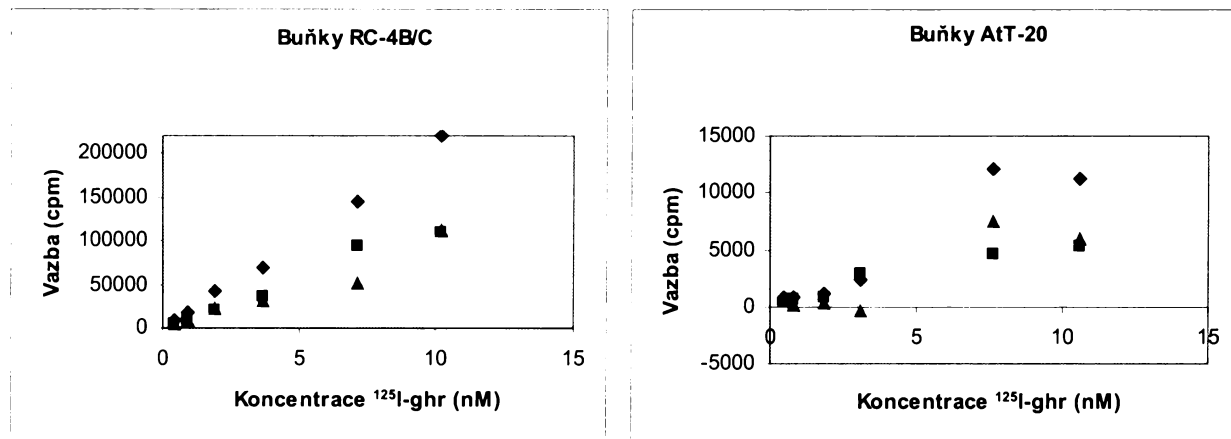


Obr.8 Saturační vazba ^{125}I -ghr k buněčné linii RC-4B/C a AtT-20, inkubováno při 25°C po 60 minut, v přítomnosti Complete

fialová – B_t , modrá – B_{nsp} , oranžová – B_{sp}

Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ^{125}I -ghr v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 1×10^{-6} M ghr. Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby.

Přídavek STI do vazebného pufru (v koncentraci 0,01 mg/ml) výrazně neovlivnil vazbu ^{125}I -ghr k linii RC-4B/C. U buněčné linie AtT-20 měl přídavek STI za následek výrazné zvýšení nespecifické vazby a tedy snížení vazby specifické. Tyto údaje jsou patrné z grafů na Obr. 9.



Obr.9 Saturační vazba ^{125}I -ghr k buněčné linii RC-4B/C a AtT-20, inkubováno při 25°C po 60 minut, v přítomnosti STI

fialová – B_t , modrá – B_{nsp} , oranžová – B_{sp}

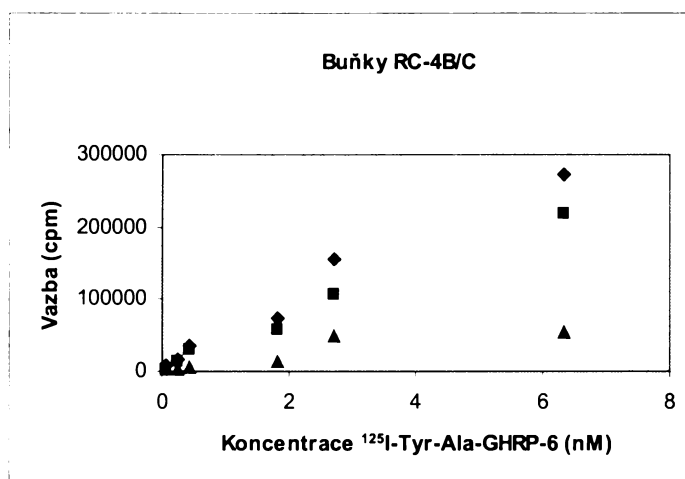
Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ^{125}I -ghr v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 1×10^{-6} M ghr. Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby.

5.3.3. Ověření stability ghrelinu

Stabilita ghrelinu byla ověřena hmotnostní spektroskopií. K proměření spekter byl použit roztok ghrelinu o koncentraci 10^{-4} M ve vazebném pufru, který byl inkubován po 90 minut při 25 °C s buňkami RC-4B/C. Výsledky prokazují, že během inkubace došlo asi z 95 % k odštěpení oktanoylu, který je pro vazbu k receptoru GHS-R 1a, čili vazbu specifickou, nezbytný.

5.3.4. Vliv bacitracinu na vazbu ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6

Při saturačních vazebných experimentech s ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6 k buňkám linie RC-4B/C při inkubaci 25 °C po 60 minut byla pozorována příliš vysoká nespecifická vazba. (Obr.10)

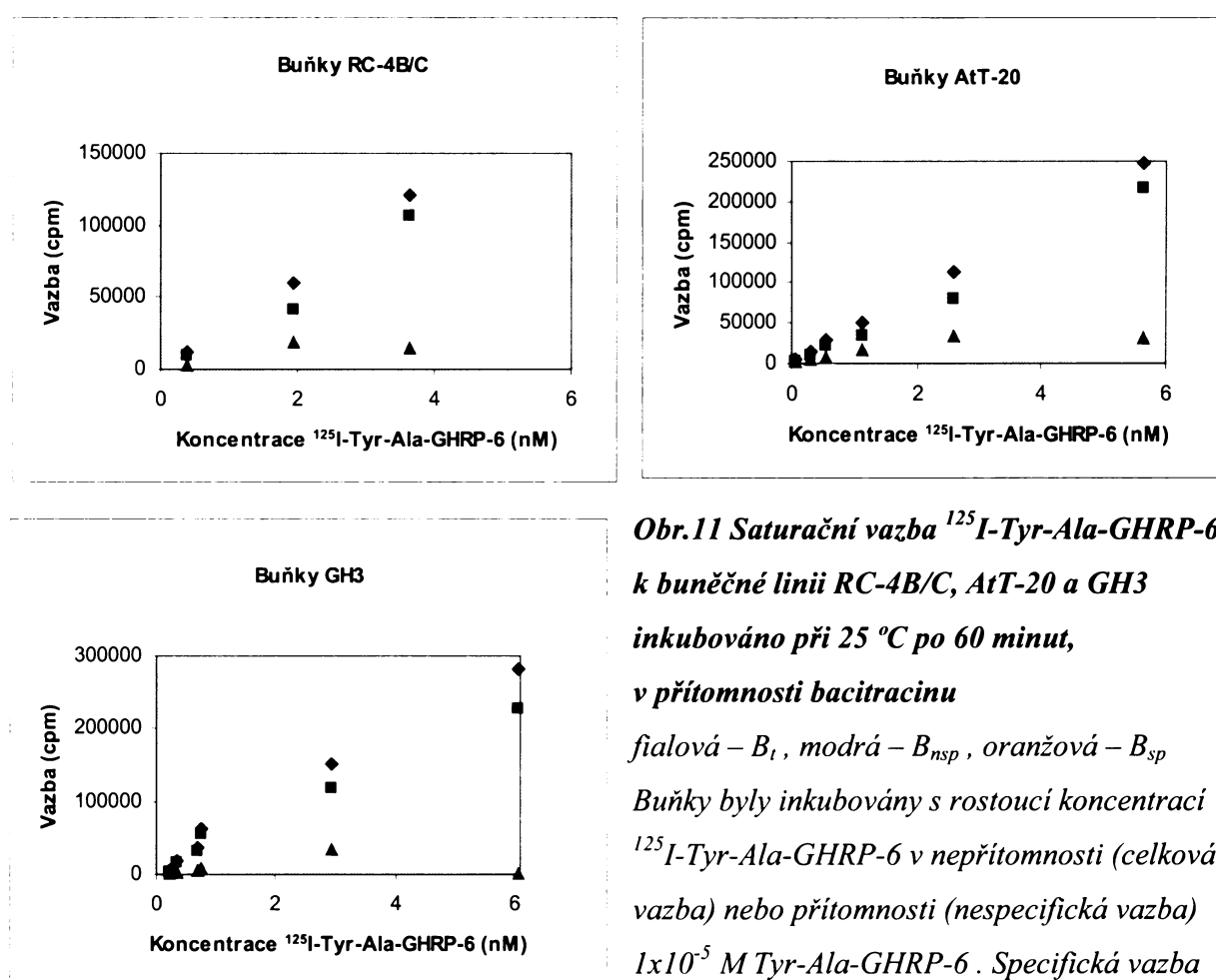


Obr.10 Saturační vazba ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6 k buněčné linii RC-4B/C , inkubováno při 25°C po 60 min

fialová – B_t , modrá – B_{nsp} , oranžová – B_{sp}

Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6 v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 1×10^{-5} M Tyr-Ala-GHRP-6 . Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby.

Z důvodu příliš vysoké adsorpce byl za účelem jejího snížení do vazebného pufru přidán bacitracin.²⁶ Dalšími experimenty byl zkoumán vliv vazebného pufru obsahujícího bacitracin v množství 1 mg/ml na vazbu ¹²⁵I-Tyr-Ala-GHRP-6 při inkubaci 25 °C po 60 minut k buňkám linií RC4B/C, AtT-20 a GH3. Jak můžeme pozorovat na Obr.11, přidavek bacitracinu do vazebného pufru neovlivnil vazbu ¹²⁵I-Tyr-Ala-GHRP-6 na nescifická místa na buňky, nescifická vazba byla při všech experimentech příliš vysoká. Z vazebných křivek na Obr.11 díky příliš vysoké nescifické vazbě nelze vyvodit žádné spolehlivé výsledky, a tak nelze pro ¹²⁵I-Tyr-Ala-GHRP-6 určit hodnotu K_d , vypovídající o afinitě ligandu k receptoru.



Obr.11 Saturační vazba ¹²⁵I-Tyr-Ala-GHRP-6 k buněčné linii RC-4B/C, AtT-20 a GH3 inkubováno při 25 °C po 60 minut, v přítomnosti bacitracinu
fialová – B_t , modrá – B_{nsp} , oranžová – B_{sp}
 Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ¹²⁵I-Tyr-Ala-GHRP-6 v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nescifická vazba) 1×10^{-5} M Tyr-Ala-GHRP-6. Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nescifické vazby.

5.4. Saturační vazebné experimenty ^{125}I -ghr k buněčné linii RC-4B/C a AtT-20

Saturační vazebné experimenty ^{125}I -ghr k buňkám linií RC-4B/C i AtT-20 byly prováděny při předchozích experimenty určených optimálních inkubačních podmínkách (vazebný pufr, 25° C po 60 minut). Z grafu specifické vazby byly odečteny hodnoty B_{\max} a K_d , které jsou se střední chybou průměru (s) uvedeny v tabulce (Tab.3)

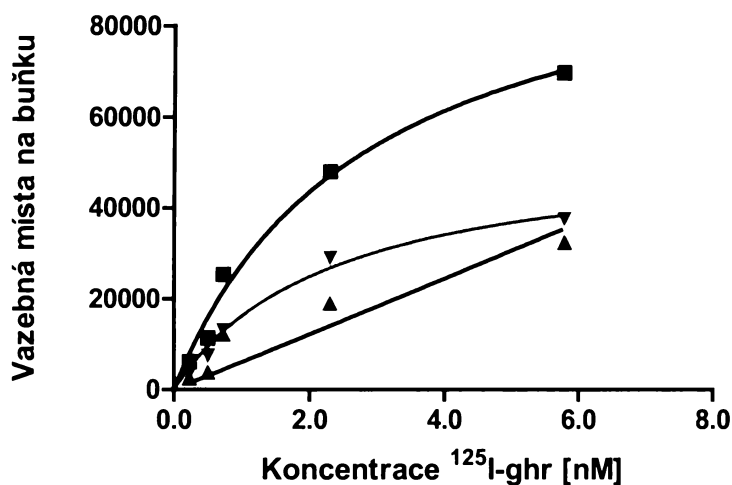
Tab. 3 – Základní vazebné konstanty B_{\max} a K_d určené saturačními experimenty z grafu specifické vazby ^{125}I -ghr k buňkám RC-4B/C a AtT-20

B_{\max} je počet vazebných na buňku, K_d je rovnovážná disociační konstanta. Obě hodnoty byly zjišťovány při saturačních vazebných experimentech probíhajících při době inkubace 60 minut a teplotě 25 °C, s vazebným pufrem.

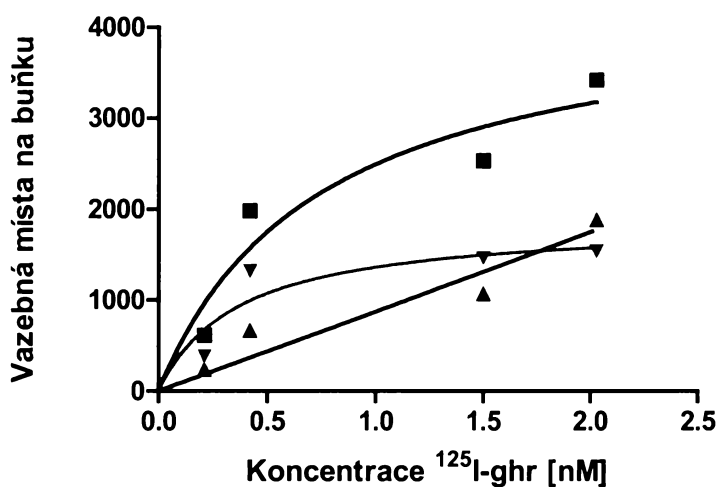
Buněčná linie	$\bar{B}_{\max} \pm s B_{\max}$ [vazebná místa na buňku]	$\bar{K}_d \pm s K_d$ [nM]
RC-4B/C	34 600 \pm 11800	2,56 \pm 0,48
AtT-20	1900 \pm 450	0,37 \pm 0,30

Reprezentativní grafy saturačních experimentů s vazbou ^{125}I -ghr k buňkám linií RC-4B/C a AtT-20 jsou na Obr.12 na str. 40. U obou buněčných linií nesespecifická vazba lineárně stoupala se zvyšující se koncentrací radioligandu a nepřesáhla 50 % z celkové vazby (B_{nsp} byla průměrně 42 % celkové vazby u buněk RC-4B/C i AtT-20).

Buňky RC-4B/C
Saturační vazba ^{125}I -ghr



Buňky AtT-20
Saturační křivka ^{125}I -ghr



Obr. 12 – Saturační vazebné křivky ^{125}I -ghr k buněčným liniím RC-4B/C a AtT-20

fialová – B_t , modrá – B_{nsp} , oranžová – B_{sp}

Buňky byly inkubovány při 25 °C po 60 minut, ve vazebném pufru s rostoucí koncentrací

^{125}I -ghr v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 1×10^{-6} M ghr .

Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby.

6. Diskuze

Regulace příjmu potravy je složitý proces, kterého se účastní celá řada látek, a jehož mechanismus není ještě do značné míry prozkoumaný. Rostoucí množství obezných jedinců v populaci představuje v dnešní době stále větší zdravotní problémy, a tak je studium látek regulujících příjem potravy stále více ve středu zájmu výzkumu.

Ghrelín jako poměrně nedávno objevený přirozený ligand receptoru GHS-R, který se hojně vyskytuje v hypotalamu a hypofýze savců, je jedním z hormonů regulujících příjem potravy. Je vylučován ve velké míře žaludkem a účastní se hormonální regulace zejména v mozku a hypofýze. Protože jedním z účinků ghrelínu je zvyšování příjmu potravy, antagonisté ghrelínu jako látky blokující receptor GHS-R jsou potenciální antiobezitika. Studium těchto látek *in vivo*, na buněčných liniích, je jedním z kroků, jak tyto látky charakterizovat. Cílem této práce bylo optimalizovat podmínky pro studium analogů ghrelínu *in vitro*.

Protože je známo, že hypofýza obsahuje velké množství receptorů GHS-R⁴, byly vybrány hypofyzární buněčné linie (RC-4B/C, AtT-20 a GH3) pro studium vazby ghrelínu a jeho syntetického agonisty Tyr-Ala-GHRP-6. U buněčných linií RC-4B/C a GH3 byla prokázána přítomnost receptoru GHS-R 1a^{20,23}, u linie AtT-20 je jeho přítomnost předpokládána nejen díky hypofyzárnímu původu, ale i díky prokázané produkci ACTH,²⁴ na jehož sekreci má ghrelín vliv⁷.

Ghrelín je přirozeným ligandem receptoru GHS-R 1a.⁵ Jeho použití proto bylo vhodné pro studium vazby právě k tomuto receptoru. Pro vazebné experimenty bylo zapotřebí získat monojodovaný radioligand,²⁵ a proto byl ghrelín radioktivně jodován v pozici 9 na histidinovém zbytku. Separací produktů jodace byl získán monojodovaný ¹²⁵I-ghr, jenž je vhodný pro studium vazby k receptoru GHS-R.²⁸

Dále byl při vazebných experimentech používán syntetický oktapeptid Tyr-Ala-GHRP-6.²⁶ Hexapeptid GHRP-6 byl prvním popsáním syntetickým agonistou receptoru GHS-R 1a² ještě před objevem samotného ghrelínu. Jeho sekvence však neumožňovala jodaci potřebnou pro zavedení radioaktivního ¹²⁵I do této molekuly, proto byl metodou syntézy na pevné fázi připraven peptid o sekvenci Tyr-Ala-His-Trp-Ala-Trp-Phe-Lys-NH₂ (Tyr-Ala-GHRP-6). Připojením Tyr-Ala k N-konci molekuly GHRP-6 byla umožněna jodace, a to na tyrosinový zbytek. Separací produktů jodace byl získán monojodovaný ¹²⁵I-Tyr-Ala-GHRP-6.

Aby bylo možno z křivky závislosti specifické vazby na koncentraci radioligandu určit počet receptorů B_{\max} a hodnotu K_d vypovídající o afinitě radioligandu, předpokládá se, že při saturačních vazebných experimentech bylo dosaženo rovnováhy²⁵ mezi asociací ligandu a receptoru a disociací komplexu ligand-receptor. Dosažení rovnováhy závisí na mnoha faktorech, nejen na vlastnostech ligandu a receptoru, ale i na době inkubace, teplotě, složení vazebného pufru a dalších experimentálních podmínkách.²⁵ Z výše uvedených důvodů byla nejprve provedena optimalizace inkubačních podmínek pro vazbu ^{125}I -ghr k jednotlivým buněčným liniím, respektive k receptoru v těchto liniích.

Po inkubaci při 37 °C po dobu 30 minut byla nespecifická vazba ^{125}I -ghr k buňkám všech používaných linií příliš vysoká, tvořila více než 55 % z celkové vazby. Z takto získaných křivek specifické vazby nelze dle pravidel pro vazebné experimenty²⁵ určovat hodnoty B_{\max} a K_d . Podobně tomu bylo u experimentů inkubovaných při 4 °C po dobu 90 minut. I tyto experimenty vykazovaly příliš vysokou nespecifickou vazbu ke všem liniím. V případě buněčné linie RC-4B/C byla nespecifická vazba identická s celkovou vazbou, a tak nebylo možné pozorovat žádnou specifickou vazbu. Jako optimální se pro vazbu k buňkám linií RC-4B/C a AtT-20 ukázala být inkubace při 25 °C po dobu 60 minut, kdy nespecifická vazba tvořila méně než 50% z vazby celkové a z grafu takto získané specifické vazby bylo možno určit hodnoty B_{\max} a K_d . Tyto inkubační podmínky proto byly používány pro další experimenty.

Výsledky dále ukazují, že ^{125}I -ghr se vázal k buňkám linie GH3 při všech testovaných inkubačních podmínkách téměř výhradně nespecificky, z čehož je možné vyvodit, že buněčná linie neobsahuje námi zkoumaný receptor GHS-R 1a. Jelikož byla jeho přítomnost v této linii již dříve prokázána,²³ lze z dosažených výsledků usuzovat, že ačkoliv buněčná linie GH3 obsahuje receptor GHS-R 1a, není vhodná pro studium vazby ^{125}I -ghr. Možným vysvětlením by mohla být exprese určitých enzymů, díky kterým dochází k rozštěpení molekuly ^{125}I -ghr na kratší, vazby neschopné fragmenty, či dochází k odštěpení oktanoyle, který je pro vazbu k receptoru nezbytný.

Zabránění štěpení ^{125}I -ghr na kratší fragmenty během inkubace bylo předmět našeho zájmu při další sérii experimentů, kdy byly buňky RC-4B/C a AtT-20 inkubovány ve vazebném pufru obsahujícím inhibitory proteas – BPTI, STI a nebo směs inhibitorů proteas Complete. Z výsledků je patrné, že Complete obsažený ve vazebném pufru zvyšoval nespecifickou vazbu ^{125}I -ghr k buňkám linií RC-4B/C a AtT-20. Přídavkem BPTI do vazebného pufru došlo k celkovému vymizení specifické vazby ^{125}I -ghr k buňkám RC 4B/C.

Přídavek STI ve vazebném pufru neměl výrazný vliv na vazbu k linii RC-4B/C, ale u linie AtT-20 vedl k podstatnému zvýšení nespecifické vazby. Výsledky těchto pokusů dokazují, že přídavek daných inhibitorů proteas do vazebného pufru měl za následek snížení specifické vazby ^{125}I -ghr k buňkám linií RC-4B/C i AtT-20. Při vazebných experimentech nebyly inhibitory proteas dále používány.

Pomocí hmotnostní spektroskopie bylo zjištěno, že během inkubace se z velké části od ghrelinu odštěpuje oktanoyl. Tento fakt je zřejmě důvodem vysoké nespecifické vazby ve všech experimentech.

Při dalších pokusech byla zkoumána vazba ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6 k buňkám linií RC-4B/C, AtT-20 a GH3. ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6 se vázal k buňkám RC 4B/C s velmi vysokou nespecifickou vazbou, která tvořila více než 90 % z celkové vazby. Pro snížení nespecifické vazby (adheze k inkubačním nádobám) k buňkám byl při dalších experimentech použit pufr obsahující bacitracin, jak bylo popsáno v publikaci, která se zabývala vazebnými studii právě s touto sloučeninou.²⁶ Výsledky vazebných pokusů nepotvrdily vliv bacitracinu na snížení nespecifické vazby. ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6 se vázal k buňkám všech buněčných linií s velmi vysokou nespecifickou vazbou, a tak z křivky specifické vazby nelze určit základní vazebné konstanty B_{\max} a K_d .

Základní vazebné konstanty B_{\max} a K_d lze určit z grafu specifické vazby takového experimentu, kdy nespecifická vazba nebyla vyšší než 50 % z celkové vazby.²⁵ Z námi provedených experimentů můžeme tedy tyto hodnoty odečíst z grafů specifické vazby ^{125}I -ghr k buňkám linií RC-4B/C a AtT-20, kdy hodnota specifické vazby činila průměrně přibližně 42 %. Tato hodnota je poměrně vysoká, ale dle pravidel pro výpočet vazby ze saturačních experimentů²⁵ bylo možno získat výsledné hodnoty K_d a B_{\max} . Při pokusech prováděných za experimentálně určených optimálních podmínek činila hodnota K_d ^{125}I -ghr pro vazbu k linii RC-4B/C $2,56 \pm 0,48$ nM a $0,37 \pm 0,30$ nM pro linii AtT-20. Počet vazebných míst B_{\max} pro ^{125}I -ghr na buňkách RC-4B/C činil 34600 ± 11800 a na buňkách AtT-20 1900 ± 450 . Tyto hodnoty K_d jsou řádově srovnatelné s hodnotami publikovanými v literatuře, kde byla saturační vazbou Tyr-Ala-hexarelinu k hypofyzárním buňkám určena hodnota K_d $2,1 \pm 0,4$ nM. Tato fakta jsou v souladu s experimentem, kterým byla v buněčné linii RC-4B/C metodou RT-PCR prokázána exprese mRNA pro receptor GHS-R 1a, a dále bylo zjištěno, že působením ghrelinu na tyto buňky docházelo v závislosti na dávce ke zvýšení koncentrace vnitrobuněčného Ca^{2+} .²⁰

V budoucnu je naším dalším cílem využití poznatků vyplývajících z této práce pro provedení vazebných experimentů s nově připraveným analogem ghrelinu. Tento analog

syntetizovaný v Ústavu organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i., Praha, má zaměněn serin v pozici 3 za di-amino-propionovou kyselinu, na kterou je oktanoyl vázán amidovou vazbou, místo méně stabilní esterové vazby, kterou je oktanoyl připojen v přirozeně se vyskytujícím ghrelinu. Strukturu tohoto analogu ukazuje obrázek (Obr.13)¹⁴



Obr. 13 *Struktura analogu ghrelinu s oktanoylem vázaným amidovou vazbou*

Je známo, že pro vazbu k receptoru GHS-R 1a je oktanoyl důležitý, dále je ze strukturně aktivitních studií známo, že záměna esterové vazby za amidovou nevede ke ztrátě biologické aktivity¹⁴ (vazby k receptoru). Cílem našich předchozích i budoucích studií je vytvoření optimálního systému pro určování afinity agonistů a antagonistů receptoru GHS-R 1a. Antagonisté s nejvyšší afinitou by mohly být dále testovány v studiích *in vivo* jako potenciální antiobezitika.

7. Souhrn

- Byly optimalizovány inkubační podmínky pro vazbu ^{125}I -ghr k buněčným liniím RC-4B/C, AtT-20. Jako optimální pro vazbu se ukázala být inkubace při 25 °C po dobu 60 minut ve vazebném pufru.
- Byly provedeny saturační vazebné experimenty ^{125}I -ghr k buňkám třech linií za optimalizovaných podmínek. ^{125}I -ghr se váže k buněčné linii RC-4B/C s K_d $2,56 \pm 0,48$ nM a B_{\max} 34600 ± 11800 , k linii AtT-20 s K_d $0,37 \pm 0,30$ nM a B_{\max} 1900 ± 450 . Výsledky vazebných pokusů s ^{125}I -ghr k buněčné linii GH3 ukazují, že tato linie není vhodná pro studium vazby k receptoru GHS-R. Poměrně vysoká nespecifická vazba byla zřejmě způsobena štěpením oktanoylu.
- Další výsledky ukazují, že ^{125}I -Tyr-Ala-GHRP-6 není z důvodu velmi vysoké nespecifické vazby vhodným agonistou receptoru GHS-R pro studium vazby k tomuto receptoru.

Seznam použité literatury

1. Bower, C., Y.: Cellular and Molecular Life Science, **54**, 1316-1329 (1998)
2. Bowers, C. Y.; Monay, F.A., Reynolds, G.A., Hong, A.: Endocrinology **114**, 1537-1545 (1984).
3. Ghigo, E.; Arvatt E.; Muccioli, G.; Camanni, F.: European Journal Endocrinology **136**, 445-460 (1997).
4. Howard, A.D.; Feighner, S.D.; Cully, D.F.; Arena, J.P.; Liberator, P.A.; Rosenblum, C.I.; Hamelin M.; Hreniuk, D.L.; Palyha, O.C.; Anderson, J.; Paress, P.S.; Diaz, C.; Chou M.; Liu, K.K.; McKee, K.K.; Pong, S.S.; Chaung, L.Y.; Elbrecht, A.; Dashkevicz, M.; Heavens, R.; Rigby, M.; Sirinathsinghji, D.J.; Dean, D.C.; Melillo, D.G.; Patchett, A.A.; Nargund, R.; Patrick, R.G.; DeMartino, J.A.; Gupta, S.K.; Schaeffer, J.M.; Smith, R.G.; Pløeg, L.H: Science **273**, 974-977 (1996).
5. Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa K.: Nature **402**, 656-660 (1999).
6. Zhang, J.V.; Ren, P.G.; Avsian-Kretchner O.: Science **310**, 996-999 (2005).
7. Kojima, M., Kangawa, K.: Physiological Reviews **85**, 495-522 (2005).
8. Nogueiras, R.; Perez-Tilve, D.; Wortley, K.E.; Tschöp, M.: CNS & Neurological Disorders – Drug Targets **5**, 335-343 (2006).
9. Kojima, M.; Kangawa, K.: Nature Clinical Practise **2**, 80-88 (2006).
10. Tritos, N.A.; Kokkotou, G.E.: Mayo Clinic Proceedings **81**, 653-660 (2006).
11. Matyšková, M.; Maixnerová, J.; Maletínská, L.: Vesmír **87**, 410-413 (2008).
12. Nakazato, M.; Murakami, N.; Date, Y.; Kojima, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K.; Matsukura, S.: Nature **409**, 194-198 (2001).
13. Wiedmer, P.; Nogueiras, R.; Broglio, F.; Alessio, D.D., Tschöp, M.H.: Nature Clinical Practise **3**, 705-711 (2007).
14. Matsumoto, M.; Hosoda, H.; Kitajima, Y.; Morosumi, N.; Minamitake, Y.; Tanaka, S.; Matsuo, H.; Kojima, M.; Hayashi, Y.; Kangawa, K.: Biochemical and Biophysical Research Communications **287**, 142-146 (2001).
15. Bednarek, A.M.; Feighner, D.S.; Pong, S.S.; McKee, K.K.; Hreniuk, L.D.; Silva, V.M.; Warren, V.A.; Howard, D.A.; Van der Ploeg, L.H.; Heck V.J.: Journal of Medicinal Chemistry **43**, 4370-4376 (2000).

16. Asakawa, A.; Inugi, A.; Katsuura, G.; Kaga, T.; Fujimiya, A.; Kasuga, M.: *Gut* **52**, 947-952 (2003).
17. Zhao H.: *Drug Development Research* **65**, 50-54 (2005).
18. Mouline, A.; Ryan, J.; Martinez, J.; Fehrentz, J.A.: *ChemMedChem* **2**, 1242-1259 (2007).
19. Hurbain-Kosmath, I.: *In vitro cellular Development Biology* **26**: 431-440 (1968).
20. Falls, D.H.; Dayton, D.B.; Fry G.D.; Ogiela, A.Ch.; Schaefer, G.V.; Brodjian, S.; Reilly, M.R.; Collins, A.; Kaszubska, W.: *Journal of Molecular Endocrinology* **37**, 51-62 (2006).
21. Tashjian, A., H.: *Endocrinology* **82**, 342-352 (1968).
22. Garcia, P.D.; Myers, R.M.: *Molecular Pharmacology* **45**, 402-409, (1994).
23. Nanzer, M.A.; Khalaf, S.; Mozid, M.A.; Fowkers, C.R.; Patel, V.M.; Burrin, M.J.; Grossman, A.; Korbonits, M.: *European Journal of Endocrinology* **151**, 233-240, (2004).
24. Buonassi, V.; Sato, G.; Cohen, A.I.: *The Proceedings of the National Academy of Science* **48**, 1184-1190 (1962).
25. Motulsky H., Neubig R.: *Current Protocols Neuroscience* **19**, 7.5.1-7.5.56 (1997)
26. Sethumadhavan, K.; Veeraragavan, K.; Bowers, C.Y.: *Biochemical and Biophysical Research Communications* **178**, 31-37 (1991).
27. Muccioli, G.; Ché, C.; Ghigo, N.C.; Papoutti, M.; Arvat, T.; Boghen, M.F.; Nilsson, M.H.L.; Deghenghi, R.; Ong, H.; Ghigo, E.: *Journal of Endocrinology* **175**, 201-209 (2002).
28. Cassoni, P.; Ghé, C.; Marrocco, T.; Tarabra, E.; Allia, E.; Catapano, F.; Deghenghi, R.; Ghigo, E.; Pappoti, M.; Mucciolli, G.: *European Journal of Endocrinology* **150**, 173-184, (2004).
29. Katugampola, D.S.; Pallikaros, Z.; Davenport, P.A.: *British Journal of Pharmacology* **134**, 143-149 (2001).
30. Demange, L.; Boeglin, D.; Moulin, A.; Mousseaux, D.; Ryan, J.; Bergé, G.; Gagne, D.; Heitz, A.; Perrissoud, D.; Locatelli, V.; Torsello, A.; Galleyrand, J.C.; Fehrentz, J.A.; Martinez, J.: *Journal Medicinal Chemistry* **50**, 1939-1957, (2007).
31. Maixnerová, J.; Hlaváček J.; Blokešová D.; Kowalczyk, W.; Elbert, T.; Šanda, M.; Blechová, M.; Železná, B.; Slaninová, J.; Maletínská, L.: *Peptides* **28**, 1945-1953 (2007).

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka