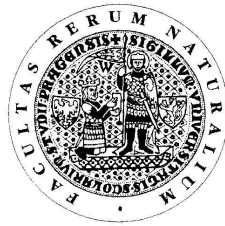


**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Přírodovědecká fakulta**

---

Studijní program: Biochemie



**Bc. Miroslava Pýchová**

Analogy ghrelinu v regulaci příjmu potravy  
Ghrelin analogs in food intake regulation

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konuzultant: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Praha 2011

**Prohlašuji:**

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze.....

.....  
Podpis

V úvodu své práce bych ráda poděkovala své konzultantce, RNDr. Lence Maletínské, CSc. (ÚOCHB, v.v.i., AV ČR Praha), za obětavou pomoc, trpělivost a konzultace při psaní mé diplomové práce i experimentální činnosti a také vedoucí práce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc..

Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janě Maixnerové, PhD za 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, RNDr. Tomáši Elbertovi, PhD. za radioaktivní značení peptidů a laboratoři Prof. Martineze (CNRS, Montpellier, Francie) za darování membrán buněk LCC PK-1 s transfektovaným lidským receptorem GHS-R 1a.

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.

## **Abstract**

Ghrelin, to date the only known peripherally produced and centrally acting peptide that stimulates food intake, is mainly synthesized in the stomach and acts through growth-hormone-secretagogue receptor (GHS-R). In addition to its orexigenic effect, ghrelin stimulates growth hormone (GH) release, gastric motility and acid secretion. The diverse functions of ghrelin raise the possibility of its clinical application for GH deficiency, eating disorders, and gastrointestinal diseases. Ghrelin agonists could be a promising therapeutics in cachexia occurring at cancer or chronic inflammatory diseases. Octanoylation of Ser<sup>3</sup> is crucial for preservation of ghrelin activity. In this study, biological properties (binding to GHS-R, food intake stimulation in mice) of full length and shorter ghrelin analogues with octanoic acid coupled to diaminopropionic acid (Dpr) replacing Ser<sup>3</sup> or without octanoic acid were followed. This substitution resulted in a prolonged stability and orexigenic effect of above mentioned ghrelin analogues. Importance of N-terminal part of ghrelin and octanoylation peptide was also confirmed. (In Czech)

## Abstrakt

Ghrelín je v současné době jediný známý peptid, který je produkovaný periferními tkáněmi a působí centrálně na zvýšení příjmu potravy. Je syntetizovaný především v žaludku a účinkuje působením na receptor GHS-R. Kromě orexigenního účinku stimuluje ghrelín uvolňování růstového hormonu (GH), žaludeční motilitu a sekreci trávicí kyseliny. Rozmanitost fyziologických funkcí ghrelínu zvyšuje možnosti jeho klinických aplikací při deficitu GH, poruchách příjmu potravy a nemocích gastrointestinálního traktu. Agonisté ghrelínu by mohli být slibnými léčivy na kachexii, která doprovází rakovinu či chronické zánětlivé nemoci. Oktanoylace na Ser<sup>3</sup> je zásadní pro zachování biologické aktivity ghrelínu. Naše práce se zabývá charakterizací (vazbou na GHS-R, příjmem potravy u myši) dlouhých i krátkých analogů ghrelínu s oktanovou skupinou vázanou amidovou vazbou k diaminopropionové kyselině (Dpr) v pozici 3 místo serinu či bez oktanové skupiny. Tato změna vedla ke zvýšení stability a prodloužení orexigenního efektu ghrelinových analogů. Výsledky této práce potvrdily význam N-koncové části ghrelínu a oktanoylace peptidu.

# Obsah

<b>Seznam použitých zkratk:</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Teoretický úvod</b> .....	<b>12</b>
1.1. Příjem potravy .....	12
1.1.1. Regulace příjmu potravy .....	12
1.1.2. Poruchy příjmu potravy .....	14
1.1.2.1. Anorexia nervosa .....	14
1.1.2.2. Obezita .....	14
1.1.2.3. Kachexie .....	15
1.2. Ghrelin .....	16
1.2.1. Význam peptidu ghrelinu .....	16
1.2.2. Objev ghrelinu .....	16
1.2.3. Struktura ghrelinu .....	17
1.2.4. Desoktanoyl ghrelin .....	18
1.2.5. Receptor ghrelinu .....	18
1.2.6. Výskyt v organismu .....	19
1.2.7. Fyziologické funkce ghrelinu .....	19
1.2.8. Vliv ghrelinu na příjem potravy .....	21
1.2.9. Regulace energetického metabolismu působením ghrelinu v mozku .....	21
1.2.10. Intracelulární mechanismus působení ghrelinu v hypotalamu .....	23
1.3. Analogy ghrelinu .....	24
1.3.1. Studie vztahu struktury a aktivity ghrelinu a jeho analogů .....	24
1.3.2. Agonisté ghrelinu .....	25
1.3.3. Antagonisté ghrelinu .....	27
1.3.4. Radioaktivně značené ligandy receptoru GHS-R1a .....	28
1.4. Hypofyzární buněčné linie používané pro vazebné studie ghrelinu .....	28
<b>2. Cíle</b> .....	<b>29</b>
<b>3. Materiály a přístroje</b> .....	<b>30</b>
3.1. Chemikálie .....	30
3.2. Materiály .....	31
3.3. Protilátky .....	31
3.4. Růstová média .....	32

3.5. Přístroje.....	33
<b>4. Metody .....</b>	<b>34</b>
4.1. Peptidy .....	34
4.2. Jodace Ghrelinu a [Dpr <sup>3</sup> ]ghr .....	36
4.3. Pěstování hypofyzárních buněčných linií.....	36
4.5. Detekce receptoru GHS-R 1a .....	36
4.6. Saturační vazebné experimenty na celých buňkách RC-4B/C, AtT-20 a GH3 .....	38
4.7. Stabilizace vazby <sup>125</sup> I-ghr a <sup>125</sup> I-[Dpr <sup>3</sup> ]ghr k hypofyzárním liniím pomocí inhibitorů proteas a esteras .....	39
4.8. Stanovení buněčné signalizace pMAPK/ERK 1/2 na buněčné linii GH3 .....	39
4.9. Membrány LCC PK-1 buněk s tranfektovaným lidským receptorem GHS-R 1a .....	40
4.10. Vazebné experimenty na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHSR-1 .....	41
4.10.1. Saturační vazebné experimenty .....	41
4.10.2. Kompetitivní vazebné experimenty.....	41
4.11. Analýza dat získaných z vazebných pokusů a statistika.....	42
4.12. Stanovení příjmu potravy u myší.....	43
4.12.1. Použitá zvířata .....	43
4.12.2. Test příjmu potravy – orexigenní aktivita.....	43
4.12.3. Test příjmu potravy – anorexigenní aktivita .....	43
4.13. Stanovení koncentrace růstového hormonu v plasmě .....	44
4.13.1. Odběr krve/plasmy.....	44
4.13.2. Stanovení koncentrace růstové hormonu v plasmě .....	44
4.13.3. Vyhodnocení výsledků.....	44
4.14. Výpočty a statistika in vivo experimentů .....	44
<b>5. Výsledky.....</b>	<b>45</b>
5.1. Peptidy .....	45
5.2. Jodace ghrelinu a [Dpr <sup>3</sup> ]ghr.....	45
5.3. Pěstování hypofyzárních buněčných linií.....	45
5.4. Detekce receptoru GHS-R 1a .....	46
5.5. Saturační vazebné experimenty na celých buňkách RC-4B/C, AtT20 a GH3 .....	47
5.6. Stabilizace vazby <sup>125</sup> I-ghr a <sup>125</sup> I-[Dpr <sup>3</sup> ]ghr k hypofyzárním liniím pomocí inhibitorů proteas a esteras .....	49
5.7. Stanovení Fosforylace MAPK/ERK1/2 u linie GH3 metodou Western blot.....	49

5.8. Saturační vazebné experimenty na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a.....	50
5.9. Kompetitivní vazebné experimenty na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a.....	52
5.9.1. Kompetitivní vazebné experimenty se <sup>125</sup> I-ghr.....	52
5.9.2. Kompetitivní vazebné experimenty se <sup>125</sup> I-[Dpr <sup>3</sup> ]ghr .....	54
5.10. Vliv analogů ghr na příjem potravy u myši .....	56
5.10.1. Testování analogů ghrelinu na potenciální anorexigenní aktivitu .....	56
5.10.2. Testování analogů ghrelinu na potenciální orexigenní aktivitu .....	58
5.11. Stanovení koncentrace růstového hormonu v plasmě.....	62
<b>6. Diskuze.....</b>	<b>63</b>
6.1. Analogy ghrelinu .....	63
6.2. In vitro experimenty .....	64
6.3. In vivo experimenty.....	67
<b>7. Závěr .....</b>	<b>70</b>
<b>Seznam použité literatury:.....</b>	<b>71</b>



## **Seznam použitých zkratek:**

ACC – Acetyl koenzym A karboxylasa , z anglického „Acetyl Coenzym A Carboxylase“

ACTH – Adenokortikotropní hormon , z anglického „Adrenocorticotropic Hormone“

AgRP – zkratka z anglického výrazu – „Agouti related peptide“

AIDS – Syndrom získaného selhání imunity, z anglického „Acquired Immune Deficiency Syndrome“

AMPK – Adenosin monofosfát protein kinasa

ARC – Nucleus arcuatus

$B_{max}$  – Počet vazebných míst

$B_{NSB}$  – Nespecifická vazba

$B_{SB}$  – Specifická vazba

$B_T$  – Celková vazba

BMI – Index tělesné hmotnosti, z anglického „Body mass index“

BNPP – Bis-[p-nitrophenyl] phoshate

CAMKK2 – Kalmodulin kinasa – kinasa 2, z anglického „Calmodulin Kinase – Kinase 2“

CREB – zkratka z anglického výrazu – „cAMP Responsive Element Binding Protein“

BSA – Hovězí sérový albumin, z anglického „Bovine Serum Albumine“

CART – zkratka tz anglického výrazu „Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript“

CCK – Cholecystokinin

CNS – Centrální nervová soustava

CPT1 – Karnitin palmitoyl transferasa 1, z anglického „Carnitine Palmitoyl Transferase 1“

DMEM medium – zkratka pochází z anglického výrazu „Dulbecco's modified Eagle Medium“

EGF – Epidermální růstový faktor, z anglického „Epidermal Growth Factor“

$EC_{50}$  – Poloviční inhibiční koncentrace

FBS – Fetální hovězí sérum, z anglického „Fetal Bovine Serum“

FSH – Folikulstimulující hormon

GH – Růstový hormon, z anglického „Growth hormone“

Cha - Cyklohexylalanin

Ghr – Ghrelin

GHRH – Hormon uvolňující růstový hormon, z anglického „Growth hormone-Releasing Hormon“

GHS – Látky uvolňující růstový hormon, z anglického „Growth hormone secretagogues“

GHS-R 1a – receptor pro látky uvolňující růstový hormon typu 1a, z anglického „Growth hormone secretagogues – Receptor“

GLP-1 – Glukagonu podobný peptid 1, z anglického „Glucagon Like Peptide-1“

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

IC<sub>50</sub> – Poloviční inhibiční koncentrace

IGF – Inzulinu podobný růstový faktor, z anglického „Insulin-like Growth Factor“

IHS – Inaktivované koňské sérum, z anglického „Inactivated Horse Serum“

LH – Luteinizační hormon

LHA – Laterální hypotalamus

K<sub>d</sub> – Rovnovážná disociační konstanta radioligandu

K<sub>i</sub> – Rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu

MAPK/ERK1/2 – Mitogenem aktivovaná proteinová kinasa/Extracelulárním signálem regulovaná kinasa 1/2, z anglického „Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal – Regulation Kinase 1/2“

MCH – Melanin koncentrující hormon, z anglického „Melanin Concentrating Hormone“

mRNA – Mediátorová ribonukleová kyselina, z anglického „Messenger Ribonucleic Acid“

Nal - Naftylalanin

NPY – Neuropeptid Y

NTS – Nucleus Tractus Solitarius

PEI – Polyethylenimin

PMSF – Phenylmethylsulfonyl fluorid

PMA – Phorbol-myristoyl-acetate

POMC – Pro-opiomelanokortin, z anglického „Pro-opiomelanocortin“

PRL – Prolaktin

PVN – Paraventriculární jádro

RP-HPLC - Vysokotlaká kapalinná chromatografie s reverzní fází, z anglického „Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography“

RIA – Radioimunochemické stanovení, z anglického „Radioimmunoassay“

ROS – Reaktivní formy kyslíku, z anglického „Reactive Oxygen Species“

SC podání – Subkutánní podání

TFA – Kyselina tri-fluoroctová, z anglického „Tri-fluorAcid“

Tris – Tris-hydroxymethyl aminomethan

TSH – Tyreotropin, z anglického „Thyroid Stimulating Hormone“

TRH – Thyrotropin-uvolňující hormon, z anglického „Thyrotropin Releasing Hormone“

UCP2 – zkratka z anglického výrazu – „Uncoupling protein“

VNM – Ventromediální jádro

# 1. Teoretický úvod

## 1.1. Příjem potravy

### 1.1.1. Regulace příjmu potravy

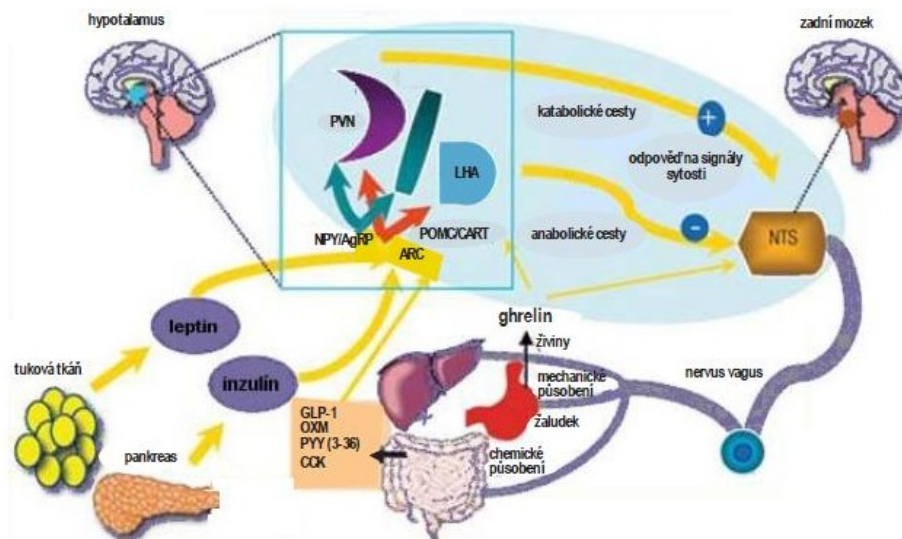
Příjem potravy a jeho regulace je složitý proces, který je řízen centrálními i periferními signály, které se navzájem ovlivňují. Hypotalamus je hlavním řídícím centrem regulujícím příjem potravy [1]. V této části mozku se nachází mnoho jader (zřetelně odlišitelných shluků buněčných neuronů), pro řízení příjmu potravy je nejvýznamnější jádro nucleus arcuatus (ARC), které obsahuje tzv. primární neurony. Jedna skupina primárních neuronů produkuje anorexigenně působící peptidy (snižující příjem potravy) – neuropeptidy peptid CART (Cocaine and amphetamine regulated transcript – kokainem a amphetaminem regulovaný transkript) a POMC (Pro-opiomelanocortin), druhá skupina neuronů produkuje orexigenní peptidy (zvyšující příjem potravy) – NPY (Neuropeptid Y) a AgRP (Agouti related peptide) [1]. Obě populace neuronů komunikují s přilehlými oblastmi hypotalamu, které se také podílejí na regulaci chuti k jídlu, s tzv. sekundárními neurony. Jsou to především paraventriculární jádro (PVN) produkující anorexigenní neuropeptidy: kortikoliberin (CRH) a tyrotropin uvolňující hormon (TRH) a laterální hypotalamus (LHA) produkující látky zvyšující příjem potravy: melanin koncentrující hormon (MCH) a orexin A a B [2]. Další oblastí hypotalamu významnou pro regulaci příjmu potravy je ventromediální jádro (VNM), které je spojeno s dalšími jádry hypotalamu a obsahuje receptory pro orexigenní i anorexigenní neuropeptidy. Centrální regulace příjmu potravy je výsledkem souhry dějů v hypotalamických jádrech a také v oblasti mozkového kmene nucleus tractus solitarius (NTS), kam jsou přiváděny nervem vagem signály z periferie [1, 3].

Příjem potravy je řízen také peptidovými hormony produkovanými v periferních orgánech, zejména v gastrointestinálním traktu (GIT). Mezi nejvýznamnější anorexigenně působící periferní peptidy patří inzulin (produkovaný  $\beta$ -buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní), leptin (vytvářený v tukové tkáni), glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1) a cholecystokinin (CCK) vytvářené v GIT. Jediným periferním orexigenním hormonem je peptid ghrelin, který je vytvářen v žaludeční sliznici [1, 3].

Způsob, jakým hormony vytvářené na periférii přenášejí signál do CNS, je různý. Např. leptin a inzulin procházejí hematoencefalickou bariérou do ARC, zatímco signál CCK a GLP-1 je do mozku přenášen přes nervus vagus do NTS, kde jsou signály spojeny s dalšími

nervovými drahami hypotalamických jader (ARC, PVN a LHA) [1, 3]. Ghrelin zřejmě působí oběma způsoby, tj. přímo přes hematoencefalickou bariéru i přes nervus vagus [4]. Schéma centrální a periferní regulace příjmu potravy stručně zobrazuje obrázek (Obr. 1) [5].

Peptidy ovlivňující příjem potravy mohou být dále rozděleny na krátkodobě působící, kterými jsou např. CART, CCK a GLP-1, a dlouhodobě působící, např. inzulin a leptin. Krátkodobě působící peptidy účinkují před jídlem, či bezprostředně po jídle. Dlouhodobě působící peptidy jsou (tzv.) ukazateli energetických zásob, a tak regulují energetickou rovnováhu organismu a také ovlivňují krátkodobě působící peptidy [1]. Zajímavostí peptidu ghrelinu je nejen fakt, že je to jediný periferní orexigenně působící peptid, ale dále také skutečnost, že jeho působení je jak krátkodobé, tak dlouhodobé (Obr. 1) [6].



**Obr. 1 – Centrální a periferní regulace příjmu potravy [5].** Leptin a inzulin působící na příjem potravy dlouhodobě, pronikají přes hematoencefalickou bariéru do mozku, do oblasti ARC, kde stimulují expresi anorexigenních neuropeptidů POMC a CART a potlačují expresi orexigenních neuropeptidů AgRP a NPY. Ghrelin reguluje příjem potravy dlouhodobě stimulací exprese a sekrece AgRP a NPY v hypotalamickém ARC. Krátkodobě působící hormony, např. CCK a GLP-1 vznikají v GIT a přes nervus vagus je jejich signál přenášen do oblasti mozkového kmene – nucleus tractus solitarius (NTS), kde jsou tyto signály spojeny s nervovými drahami hypotalamických jader (ARC, PVN a LHA), a tak dochází k regulaci příjmu potravy. Takovým způsobem je realizováno i krátkodobé působení ghrelinu.

## **1.1.2. Poruchy příjmu potravy**

### **1.1.2.1. Anorexia nervosa**

Anorexia nervosa, česky mentální anorexie, je syndrom neznámého původu, charakterizovaný ztrátou hmotnosti (pod 85% očekávané váhy dle věku a výšky), strachem z obezity, porušeným vnímáním vlastního vzhledu a ztrátou menstruace. Nejčastěji je mentální anorexie pozorována u mladých žen do 25 let (nejvíce mezi 15-19 lety). Incidence mentální anorexie má trvale stoupající trend. Úmrtnost pacientek je mezi 2-10%, přičemž riziko úmrtí se zvyšuje s dlouhodobým trváním onemocnění [7].

Pacientky s mentální anorexií výrazně omezují především tučná a kaloricky bohatá jídla, což má v počátečních fázích za následek snížení množství tuku v organismu, postupně však dochází i k úbytku beztukové tělesné hmoty a celkovému zhoršování stavu organismu [8].

Mentální anorexie je doprovázena řadou endokrinních odchylek. Předpokládá se, že tyto změny nejsou primární příčinou rozvoje tohoto onemocnění, ale jsou vyvolány reakcí organismu na hladovění. Zvýšené bazální koncentrace jsou pozorovány především u kortizolu, růstového hormonu (GH – growth hormone), ghrelinu, zatímco snižené u trijodtyroninu ( $T_3$ ), inzulínu podobného růstového faktoru (IGF-1) a leptinu [7].

### **1.1.2.2. Obezita**

Nadváha a obezita jsou způsobeny nadměrným ukládáním tělesného tuku, spojeného s nárůstem hmotnosti. Pro určení stupně nadváhy či obezity se nejčastěji používá tzv. Body Mass Index (BMI), který je definován jako hmotnost (kg) / (výška v m)<sup>2</sup>. Za obézní jsou považováni jedinci s BMI nad 30 a o nadváze mluvíme již od BMI nad 25 [9].

Za příčinu obezity lze považovat především stravovací (výběr a množství stravy) a pohybové návyky. Obezita je následkem dlouhodobé pozitivní energetické bilance, tedy nerovnováhy mezi příjmem a výdejem energie, způsobené nedostatkem fyzické aktivity a nadměrnou konzumací vysokokalorické potravy [9].

Obezita, v dnešní době často nazývaná epidemií 3. tisíciletí, je považována za závažné chronické onemocnění, které je provázeno řadou zdravotních komplikací a nemocí. Obézní jedinci, ale i jedinci s nadváhou, jsou vystaveni mnohem vyššímu riziku vzniku kardiovaskulárních onemocnění (vysoký krevní tlak, ischemická choroba srdeční, angina

pectoris) a rozvoji metabolických onemocnění, především diabetu mellitu typu II. Obezita přispívá ke vzniku onemocnění pohybového aparátu, což souvisí se zvýšenou zátěží. Dále je závažným problémem vyšší výskyt některých druhů nádorových onemocnění u obézních pacientů (děložního čípku, prsu, tlustého střeva a dalších orgánů) [9].

Přestože je obezita považována za vážný zdravotní problém, neexistuje téměř žádná farmakoterapie. Na českém trhu je v současnosti schválena na léčbu obezity pouze jediná léčivá látka - Orlistat (Xenical – Hoffman-La Roche, Alli – GlaxoSmithKline), který reverzibilně blokuje střevní lipázu a zamezuje tak vstřebávání asi 1/3 přijatých tuků z gastrointestinálního traktu [10].

### **1.1.2.3. Kachexie**

Za kachexii lze označit soubor příznaků vedoucích k celkovému chřadnutí organismu. Jde o klinický stav, kdy dochází k úbytku tukové tkáně i ke změně metabolismu proteinů a s tím souvisejícímu úbytku svalové hmoty. Tento stav je paradoxně doprovázen nechutenstvím. Kachexie je častým doprovodným jevem mnoha chronických a zánětlivých onemocnění (např. rakovina, městnavé srdeční selhání, AIDS, tuberkulóza, onemocnění jater, revmatické choroby a mnoho dalších vážných onemocnění). Často je také pozorována u starých pacientů. Pro pacienty s chronickým onemocněním má kachexie negativní vliv na kvalitu života, výrazně zhoršuje prognózu onemocnění a zvyšuje mortalitu [11].

Kachektické osoby rychle ztrácejí tukovou i svalovou tkáň. Ztráta hmotnosti je obvyklá, ale v některých případech je kompenzována zvýšeným množstvím extracelulární tekutiny. Úbytek svalové hmoty u kachektických pacientů nelze zvrátit zvýšeným přísunem potravin, čímž se příznaky kachexie odlišují od následků hladovění [11, 12].

Hydrolázy, které se uvolňují z poškozených nebo zánětlivých buněk, dále zvyšují poškození okolní tkáně. Obrannou reakcí organismu je snaha lokalizovat poškození pomocí reakce akutní fáze, doprovázenou zvýšenou tvorbou proteinů v játrech (např. inhibitory proteas, složky komplementu aj.). To má za následek zvýšenou potřebu esenciálních aminokyselin a tato potřeba je kryta jejich získáváním z kosterního svalstva [12].

## **1.2. Ghrelin**

### **1.2.1. Význam peptidu ghrelinu**

Jak již bylo popsáno výše, působení ghrelinu vede v krátkodobém časovém horizontu ke zvýšení příjmu potravy: ghrelin iniciuje příjem potravy a pod jeho vlivem se zkracuje doba mezi jednotlivými jídly. Dlouhodobé působení ghrelinu pozitivně ovlivňuje energetickou bilanci organismu (zvyšuje příjem a snižuje výdej energie), což vede ke zvýšení hmotnosti [13]. Na základě těchto faktů je patrné možné využití antagonistů ghrelinu jako potenciálních antiobezitních látek. Dále je známo, že snížením hmotnosti dochází ke zvýšení plasmatické koncentrace ghrelinu a citlivosti ghrelinových receptorů vůči ghrelinu, a proto by bylo možné využití antagonistů ghrelinu k předcházení výkyvů hmotnosti [6].

Naopak agonisté ghrelinu by mohli být využíváni na léčbu kachexie a anorexie. Přestože u kachektických pacientů jsou pozorovány vysoké koncentrace ghrelinu, podání ghrelinu vedlo ke zvýšení chuti k jídlu a dlouhodobým podáváním bylo dosaženo zvýšení hmotnosti [14]. Navíc byly popsány i protizánětlivé účinky ghrelinu, což by také bylo přínosné v léčbě kachexie [15]. Někteří nepeptidoví agonisté ghrelinu jsou nyní v klinických testech pro léčbu kachexie. Díky schopnosti uvolňovat růstový hormon je jejich potenciální využití hlavně u pacientů s deficitem růstového hormonu [13].

### **1.2.2. Objev ghrelinu**

Objev ghrelinu je typickým příkladem tzv. obrácené farmakologie. Nejprve byly při studiu enkefalinu a jeho analogů syntetizovány látky, které měly schopnost uvolňovat růstový hormon (growth hormone – GH) z potkaních hypofyzárních buněk. Tyto peptidy byly označeny jako GHS (growth-hormone secretagogues). Ovšem mechanismus uvolnění GH analogy GHS je odlišný od účinku hormonu uvolňujícího růstový hormon (growth hormone releasing hormone – GHRH), který působí na receptor pro GHRH [16]. Díky těmto poznatkům byl v roce 1996 objeven receptor GHS-R, jehož stimulací GHS dochází k uvolnění GH [17]. Charakterizace receptoru GHS-R vedla k objevení přirozeného ligandu – ghrelinu, který byl v roce 1999 izolován ze žaludečního extraktu skupinou vědců pod vedením M. Kojimy [18]. Objev ghrelinu pomohl k pochopení souhry fyziologických procesů mezi žaludkem, adenohipofýzou a hypotalamem.

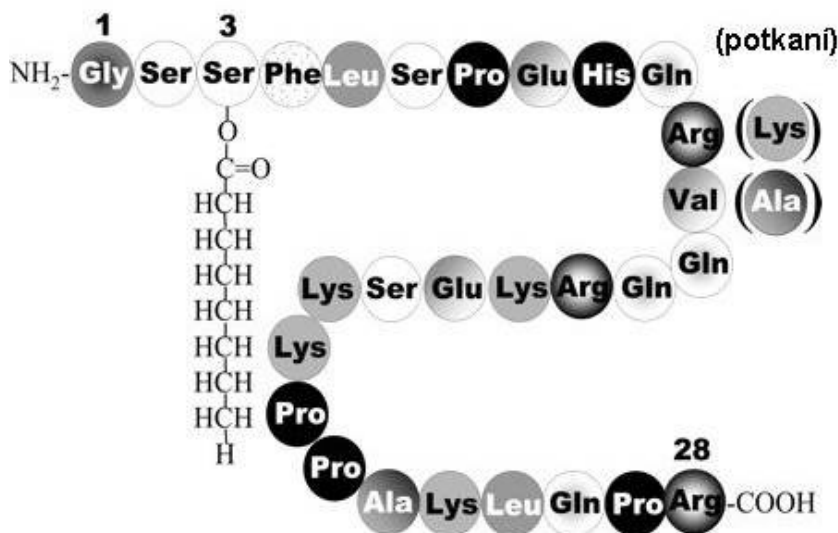


### 1.2.3. Struktura ghrelinu

Preproghrelin je tvořen 117 aminokyselinami, 23 N-terminálních aminokyselinových zbytků nese charakteristické rysy signálního sekrečního peptidu [18]. 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 1a [18]. Enzym, který katalyzuje vazbu n-oktanové kyseliny na hydroxylovou skupinu Ser<sup>3</sup> se nazývá ghrelin-O-acyl transferasa (GOAT). GOAT se vyskytuje v žaludku a střevech, tedy v místech nejvyšší produkce ghrelinu [19].

Proteolytický fragment preproghrelinového prekurzoru je obestatin, tvořený 23 aminokyselinami, jehož význam není dosud zcela znám. Obestatin byl izolován z potkaního žaludečního extraktu, ovšem jestli je stejně tak vylučován i z lidského žaludku, zatím není známo [20].

Ghrelin je mezidruhově velmi konzervovaný. Strukturu lidského a krysího ghrelinu ukazuje obrázek (Obr.2) [21]. U krysího ghrelinu jsou v pozici 11 a 12 místo argininu a valinu lysin a alanin [18].



**Obr. 2 – Struktura ghrelinu [21].** Na obrázku je zobrazena aminokyselinová sekvence lidského ghrelinu. Potkaní ghrelin se od lidského liší pouze dvěma aminokyselinami – v pozici 11 a 12, které jsou na obrázku v závorce. K serinu v pozici 3 je vázána oktanová skupina.

#### 1.2.4. Desoktanoyl ghrelin

Neacylovaná forma ghrelinu (v naší studii nazývána desoktanoyl ghrelin) se v krvi vyskytuje ve větší míře než ghrelin (50 - 60% celkového ghrelinu v buňkách GIT a téměř 90% celkového ghrelinu v plasmě) [22]. Tato forma ghrelinu není schopna vázat se na receptor pro ghrelin (GHS-R1a), ale zatím nebyl objeven receptor, který by zprostředkoval odpověď desoktanoyl ghrelinu [22, 23]. V lidském séru katalyzuje desoktanoylaci ghrelinu enzym butyrylcholinesterasa a lysophospholipasa [22, 24]. Fyziologické funkce desoktanoyl ghrelinu nejsou doposud zcela objasněny. Publikované výsledky týkající se ovlivnění příjmu potravy desoktanoyl ghrelinem jsou sporné. Řada studií na hladových myších (16-20 hodin hladovění) ukazuje snížení příjmu potravy po centrálním i periferním podání desoktanoyl ghrelinu [13, 22]. Naproti tomu bylo publikováno mnoho studií, v nichž podání desoktanoyl ghrelinu (centrální nebo periferní) sytým zvířatům nemělo žádný vliv [25] na příjem potravy a v několika málo případech dokonce vedlo ke zvýšení příjmu potravy [13, 22].

#### 1.2.5. Receptor ghrelinu

Jsou známy dva typy receptorů – GHS-R1a a GHS-R1b. Zkrácená isoforma GHS-R 1b není biologicky aktivní – není aktivována ligandy GHS-R, jeho funkce zatím není zcela známa [23].

Receptor pro ghrelin (GHS-R 1a) je receptor spřažený s G-proteinem, tvořený sedmi transmembránovými doménami [17]. Receptor GHS-R1b je tvořen jen pěti transmembránovými doménami [23].

mRNA pro GHS-R se nachází v mnoha částech mozku. Ve velké míře se vyskytuje v hypothalamu (zejména v ARC, VNM a LHA). Velké množství receptorů je v somatotropních buňkách adenohypofýzy [17, 23].

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 břišní a tukovou tkáň. Tato skutečnost poukazuje na rozmanitost funkcí ghrelinu v organismu [18, 23].

Expresí receptoru GHS-R byla také popsána v různých typech tumorových tkání (jako např. rakoviny prsu, varlat, prostaty) [26].

### 1.2.6. Výskyt v organismu

U všech druhů obratlovců je ghrelin vylučován především v žaludku, a to specializovanými buňkami žaludeční sliznice [27]. Buňky produkující ghrelin byly také nalezeny v tenkém a tlustém střevě. Koncentrace ghrelinu postupně klesá od dvanáctníku k tlustému střevu [23, 27].

Ghrelinový receptor se nachází hlavně v hypotalamu a hypofýze [17]. Bylo zjištěno, že obsah ghrelinu v mozku je velmi nízký, byl nalezen v hypotalamickém nucleu arcuatu a hypofýze [23].

Dalším orgánem produkujícím ghrelin je slinivka břišní. Vylučování ghrelinu slinivkou břišní je nejvyšší během prenatálního stádia (kdy je naopak vylučování žaludkem nízké). Navíc pankreatická hladina ghrelinu není ovlivňována hladověním [23].

mRNA pro ghrelin byla odhalena i v glomerulech ledvin. Na druhé straně jsou ledviny důležitým místem pro degradaci ghrelinu [23].

V malé míře se ghrelinová mRNA vyskytuje i v dalších periferních tkáních jako jsou plíce, srdce, kosti, tuková tkáň a placenta [18, 23].

### 1.2.7. Fyziologické funkce ghrelinu

Stejně jako výskyt, i fyziologické funkce ghrelinu jsou velmi rozmanité. Mezi nejvýznamnější funkce ghrelinu patří jeho schopnost stimulovat sekreci růstového hormonu [18], zvýšení příjmu potravy a ukládání energetických zásob [13, 23].

Ghrelin působí stimulačně na sekreci GH z hypofyzárních buněk. Mechanismus uvolnění GH po působení ghrelinu je odlišný od působení GHRH, bylo ovšem zjištěno, že jejich účinek na sekreci GH je synergistický [18, 23].

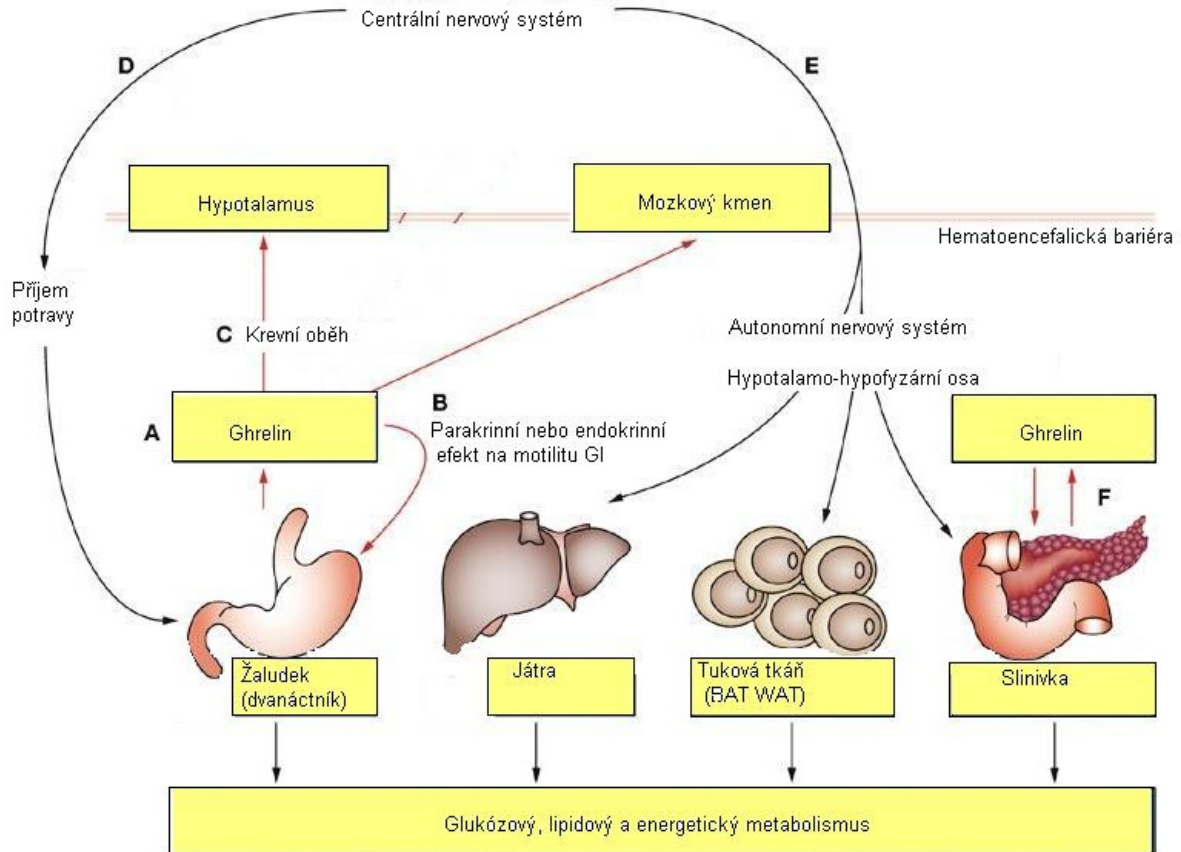
Mezi další účinky ghrelinu v organismu patří stimulace sekrece žaludeční kyseliny a motility GIT, což souvisí s přípravou GIT na proces příjmu potravy [28].

Dále ghrelin ovlivňuje funkci slinivky břišní a metabolismus glukosy. Ovšem výsledky studií zkoumající vliv ghrelinu na sekreci inzulínu jsou kontroverzní [29]. Z dalších účinků stojí za zmínku vliv ghrelinu na kardiovaskulární systém. Ghrelin má kardioprotektivní účinky, je exprimován v aortě i srdci. Pozitivní hemodynamický efekt (na krevní proudění, činnost srdce a cév a snížení krevního tlaku) po podání ghrelinu byl pozorován u zdravých dobrovolníků i pacientů s městnavým srdečním selháním [23]. Významný je také účinek ghrelinu v játrech, kde působí proti inhibici glukoneogeneze

způsobené inzulímem [23].

Ghrelinu je kromě výše zmíněných připisováno mnoho dalších funkcí. Jednou z nich je např. vliv na metabolismus kostí. Studie *in vitro* a *in vivo* prokazují účinek vedoucí k proliferaci a diferenciaci osteoblastů [28].

Schéma fyziologických účinků ghrelinu shrnuje obrázek (Obr. 3) [30].



**Obr. 3 – Fyziologické funkce ghrelinu [30].** (A) Ghrelin, který je sekretován především v žaludku, může mít parakrinní nebo endokrinní efekt na motilitu GIT (B), nebo může cirkulovat v krvi (C) a působit po přechodu hematoencefalickou bariérou v CNS (především v hypothalamu) na receptor GHS-R1a. Působením v CNS se ghrelin podílí na regulaci příjmu potravy (D) a tkáňově specifických účincích v periferních tkáních (E), kterými ovlivňuje metabolismus glukosy, lipidů a energetického metabolismu. Účinky ghrelinu na metabolismus v periferních tkáních a CNS jsou zprostředkovány autonomním nervovým systémem a stejně tak i hypothalamo-hypofyzární osou. Kromě žaludku je ghrelin produkován v malé míře také jinými periferními tkáněmi, především slinivkou břišní (F).

### 1.2.8. Vliv ghrelinu na příjem potravy

Ghrelín je jedinou dosud známou periferní látkou, která zvyšuje příjem potravy. Úloha ghrelinu v krátkodobém působení na příjem potravy tedy spočívá v navození pocitu hladu, často je proto nazýván „hormonem hladu“ [13]. V krvi se ghrelín nachází ve vysokých koncentracích před jídlem a během hladovění a do jedné hodiny po jídle klesá na minimální hodnoty [14]. Rapidnějšího snížení plasmatické koncentrace je dosaženo po příjmu vysokokalorické stravy. Potrava bohatá na proteiny a cukry potlačuje plasmatické hladiny ghrelinu více než potrava vysokotučná. Tento fakt je jedním z možných vysvětlení zvyšování hmotnosti po stravě bohaté na tuky [13].

Plasmatické koncentrace ghrelinu jsou nízké u obézních lidí a vysoké u lidí štíhlých. Ke zvýšení hladiny dochází po ztrátě hmotnosti vyvolané nízkokalorickou dietou, zvýšené hladiny ghrelinu byly pozorovány i u dobrovolníků, kteří dosáhli ztráty hmotnosti aerobním cvičením (po dobu 1 roku) beze změny kalorického příjmu [6]. Naproti tomu u myší podrobených omezenému kalorickému příjmu, (který nevedl ke ztrátě hmotnosti), nebyly pozorovány změny hladiny ghrelinu [6]. V souladu s těmito fakty je skutečnost, že vysoké plasmatické hladiny byly pozorovány u pacientek se syndromem anorexie nervosy a bulimie nervosy, u nichž se hladina ghrelinu dostala do obvyklých hodnot po zvýšení tělesné hmotnosti vyvolané vysokokalorickou dietou [28].

U pacientů s chirurgickým zmenšením žaludku dochází ke ztrátě hmotnosti spojené se snížením plasmatické koncentrace ghrelinu, což potvrzuje, že žaludek je hlavním místem produkce ghrelinu [4, 27].

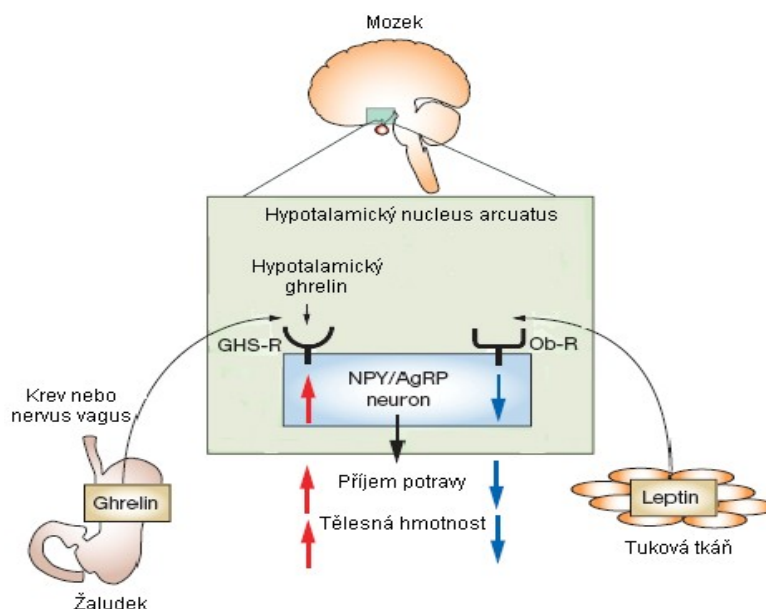
### 1.2.9. Regulace energetického metabolismu působením ghrelinu v mozku

Hypotalamický ARC je důležitým centrem regulujícím příjem potravy [1]. *In vivo* studie na potkanech s poškozeným ARC potvrzují, že ARC je klíčovým místem pro orexigenní působení ghrelinu. V ARC se nacházejí receptory pro ghrelín, jejichž stimulací dochází ke zvýšené expresi a sekreci orexigenních neuropeptidů AgRP a NPY, což vede ke zvýšení příjmu potravy [31]. V ARC se také nacházejí receptory pro leptin, jehož působení na AgRP a NPY vede ke snížení příjmu potravy. Leptin je tedy funkčním antagonistou ghrelinu [27, 31]. Schéma působení ghrelinu a leptinu v hypotalamickém ARC je znázorněné na obrázku na následující straně (Obr. 4) [27].

Je tedy zřejmé, že pro orexigenní působení ghrelinu je nutné jeho působení na neurony

v ARC. Ovšem účinek periferního ghrelinu v CNS není zcela objasněn. Ghrelin patrně působí v hypothalamické oblasti mozku dvojitým mechanismem. Jedním je pravděpodobně nepřímá cesta, a to působením přes nervus vagus, což bylo podpořeno zjištěním, že vagotomie (chirurgické přetrnutí bloudivého nervu - nervu vagu) potlačuje schopnost ghrelinu zvyšovat příjem potravy a uvolňovat GH u potkanů a myši [4].

Další možností působení ghrelinu v mozku je přechod hematoencefalickou bariérou do mozku. Lidský ghrelin prochází hematoencefalickou bariérou, zatímco myší ghrelin, který se liší od lidského pouze dvěma aminokyselinami, prochází v menší míře [4]. Ghrelin může přecházet hematoencefalickou bariérou jednak aktivním transportem, nebo také prostou difuzí. Zajímavé je, že myší desoktanoyl ghrelin prochází hematoencefalickou bariérou rychleji než ghrelin, což by nasvědčovalo možnosti „aktivace“ (oktanoylace) desoktanoylovaného ghrelinu až v mozku [4]. To je ovšem v rozporu se skutečností, že enzym katalyzující oktanoylaci ghrelinu (GOAT) byl doposud nalezen pouze v žaludku (tedy místě syntézy ghrelinu) a nikoli v CNS [19]. Dále byla také vyslovena hypotéza, že ghrelin by mohl aktivovat receptory vně hematoencefalické bariéry a tím spustit odpověď v hlubších oblastech mozku [4].



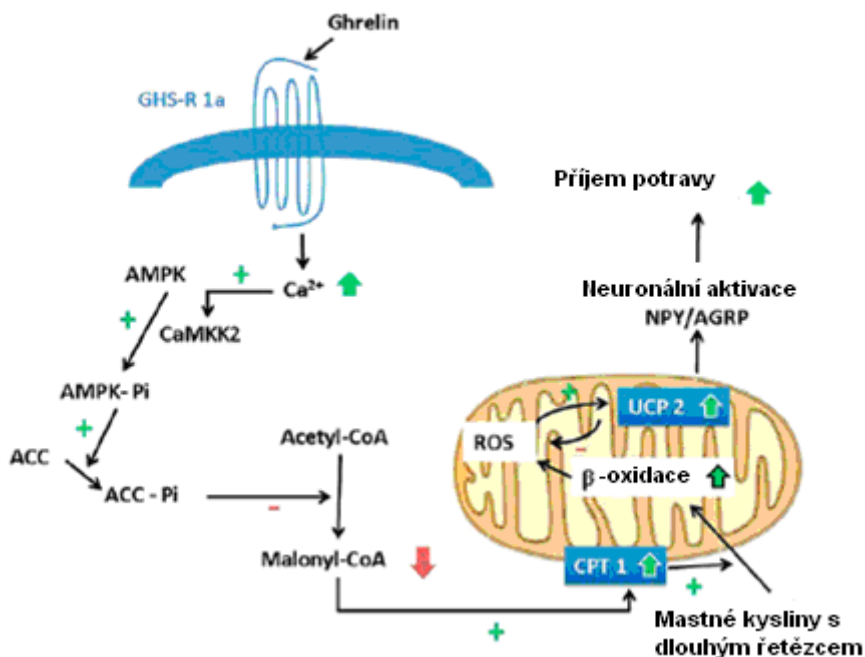
**Obr. 4 – Schéma regulace příjmu potravy ghrelinem a leptinem v hypothalamu [27]. Ghrelin je periferní orexigenní signál – stimuluje sekreci NPY a AgRP v ARC, čímž působí centrálně na zvýšení příjmu potravy a tělesné hmotnosti, zatímco leptin jako periferní anorexigenní signál má účinky opačné.**

### 1.2.10. Intracelulární mechanismus působení ghrelinu v hypotalamu

Jak již bylo řečeno, orexigenní působení ghrelinu je zprostředkováno prostřednictvím neuropeptidů AgRP a NPY [31]. Neurony sekretující tyto orexigenní neuropeptidy se nacházejí v ARC [1], kde je nejvyšší koncentrace GHS-R1a receptorů [17].

Vazba ghrelinu na GHS-R 1a vede především k aktivaci fosfolipasy C a uvolnění inositol-trifosfátu. Tím dojde k přechodně zvýšené koncentraci iontů  $Ca^{2+}$ , které aktivují kalmodulin kinasu – kinasu 2 (CaMKK2). CaMKK2 fosforyluje adenosin monofosfát protein kinasu (AMPK). Fosforylovaná AMPK způsobí fosforylaci acetyl-koenzym A karboxylasy (ACC), fosforylovaná ACC inhibuje utváření malonyl-koenzymu A a v důsledku toho je aktivována karnitin palmitoyl transferasu 1 (CPT1). Následně je zvýšená mitochondriální  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a prostřednictvím UCP2 (zkratka pochází z anglického výrazu – „Uncoupling“ protein) a ROS (zkratka pochází z anglického výrazu – „Reactive Oxygen Species“) je stimulována transkripce AgRP a NPY [14]. Dále bylo popsáno, že aktivovaný AMPK může fosforylovat CREB (zkratka pochází z anglického výrazu – „cAMP Responsive Element Binding Protein“), který se může vázat na promotor NPY, a zvýšit tak expresi neuropeptidu NPY [13]. Schéma intracelulárního mechanismu zvýšení chuti k jídlu působením ghrelinu v hypotalamu je znázorněno na obrázku (Obr.5 na str. 24) [14].

Dále byla po centrálním podání ghrelinu detekována zvýšená exprese Fos v neuronech produkujících orexiny v LHA. Experimenty s protilátkami proti NPY ukazují, že ghrelinem navozená aktivace neuronů produkujících orexiny je nezávislá na NPY. To nasvědčuje skutečnosti, že ghrelinem navozené zvýšení příjemu potravy je zprostředkováno nejen NPY a AgRP systémem, ale i orexiny [32].



**Obr. 5 – Schéma intracelulárního mechanismu zvýšení chuti k jídlu po působení ghrelinu v hypothalamu [14].** Vazbou ghrelinu na jeho receptor GHS-R1a dojde k přechodně zvýšené intracelulární koncentraci  $Ca^{2+}$  iontů, které prostřednictvím CaMKK2 (kalmodulin kinasa 2) aktivují AMPK (adenosin monofosfát protein kinasa). Fosforylovaná AMPK dále aktivaci ACC (acetyl koenzym A karboxylasa) inhibuje tvorbu malonyl-CoA, v důsledku čehož je aktivována CPT1 (karnitin palmitoyl transferasa 1). Tím je zvýšena  $\beta$ -oxidace přijatých mastných kyselin a prostřednictvím ROS (reaktivních forem kyslíku) a UCP2 („uncoupling“ protein) je stimulována transkripce AgRP a NPY.

### 1.3. Analogy ghrelinu

#### 1.3.1. Studie vztahu struktury a aktivity ghrelinu a jeho analogů

S cílem určit minimální sekvenci fragmentů ghrelinu potřebnou k zachování biologické aktivity byla studována schopnost řady syntetických fragmentů ghrelinu vázat se na receptor GHS-R.

Jako neaktivní se ukázaly C-koncové fragmenty ghrelinu, stejně tak desoktanoyl ghrelin [33, 34].

Minimální struktura potřebná pro zachování biologické aktivity (vazby na GHS-R), tedy aktivní jádro ghrelinu, je N-koncový tetrapeptid se sekvencí Gly-Ser-Ser-Phe, acylovaný oktanovou kyselinou na serinovém zbytku v pozici 3 [33]. S rostoucím řetězcem se zvyšuje



schopnost vazby na receptor. Nicméně při testování schopnosti N-terminálních fragmentů ghrelinu stimulovat sekreci GH se ukázalo, že ačkoli byla *in vitro* prokázána schopnost těchto peptidů vázat se na GHS-R1a receptor [33], v *in vivo* experimentech nebyly krátké ghrelinové analogy schopné stimulovat sekreci GH [35]. Závěrem dalších experimentů je zjištění, že ačkoliv C-koncové fragmenty nejsou schopny vazby na receptor, C-konec peptidu hraje významnou roli v zachování biologické aktivity *in vitro* i *in vivo*. Důvodem je zřejmě stabilizace oktanové skupiny na Ser<sup>3</sup> [36]. Stejně tak i volná NH<sub>2</sub> skupina na N-konci je nezbytná pro zachování biologické aktivity, acetylace či deaminace N-koncové aminokyseliny vedla ke ztrátě schopnosti vazby na receptor [33].

Dále byl zkoumán vliv řetězce navázaného na serin v pozici 3. Výsledky ukazují, že pro vazbu na GHS-R je důležitá hydrofobicita navázaného řetězce. Záměnou serinu v pozici 3 za aromatickou aminokyselinu (např. tryptofan, naftylalanin) byla zachována vazba takového analogu k GHS-R, zatímco záměna za aminokyselinu s alifatickým postranním řetězcem (např. valin, leucin) vedla zcela ke ztrátě schopnosti vazby na tento receptor [33]. Tento fakt potvrzuje i studie, při které N-koncový pentapeptid s tryptofanem místo serinu<sup>3</sup> v závislosti na dávce zvyšoval příjem potravy a sekreci GH [37]. Důležitá je L-konfigurace aminokyseliny v této pozici [34]. Záměna esterové vazby oktanové kyseliny k serinu<sup>3</sup> za amidovou nesnížila biologickou aktivitu. [33]. Tyto výsledky potvrzuje několik nedávných *in vitro* studií, popisujících specifickou vazbu analogu ghrelinu s oktanovou kyselinou vázanou na řetězec amidovou místo esterovou vazbou [26, 38, 39].

Další aminokyselinou podstatnou pro biologickou aktivitu je fenylyalanin v pozici 4. Záměna Phe<sup>4</sup> za Ala<sup>4</sup> vedla ke ztrátě biologické aktivity, zatímco záměna za Tyr<sup>4</sup> zvýšila biologickou odpověď takového analogu [40].

V souladu s těmito poznatky jsou i nedávno publikované výsledky *in vitro* metabolismu ghrelinu. Inkubací ghrelinu s homogenáty různých tkání potkanů (žaludek, játra, ledviny, sérum) bylo zjištěno, že nejčastěji dochází k odštěpení oktanové kyseliny (ve všech testovaných tkáních) a další štěpná místa se nacházejí na N-konci peptidu, tedy v aktivním centru ghrelinu [41].

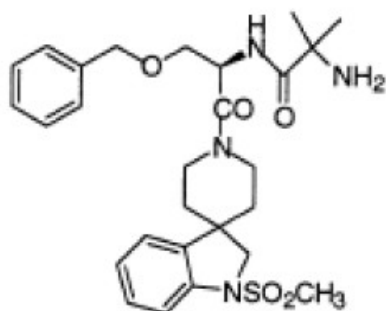
### 1.3.2. Agonisté ghrelinu

První agonisté receptoru GHS-R1a byli objeveni a testováni *in vitro* a *in vivo* ještě před objevením samotného ghrelinu. Jako první byl zkoumán peptid GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) [16]. V *in vivo* experimentech byla prokázána schopnost peptidu GHRP-6

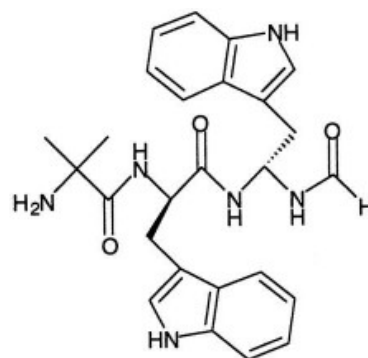
v závislosti na dávce uvolňovat GH a zvyšovat hmotnost. O několik let později byli na základě struktury GHRP-6 odvozeni další agonisté receptoru GHS-R: GHRP-2, GHRP-1 a hexarelin [42]. Aby bylo možno tyto analogy použít pro vazebné studie, byly na N-konec peptidů GHRP-6 a hexarelinu připojeny aminokyselinové zbytky Tyr-Ala. Tím bylo umožněno tyto peptidy označit radioaktivním jódem a využít je pro vazebné studie. Připojením Tyr-Ala nebyla narušena biologická aktivita peptidů. Vznikli tak další agonisté – Tyr-Ala-GHRP 6 a Tyr-Ala-hexarelin. Vazebnými experimenty se  $^{125}\text{I}$ -Tyr-Ala-GHRP-6 byla určena specifická vazba k receptoru GHS-R na membránách buněk izolovaných z přední hypofýzy a hypotalamu potkana [43].  $^{125}\text{I}$ -Tyr-Ala-GHRP-6 byl používán i v naší laboratoři ve vazebných experimentech na hypofyzárních tumorových buněčných liniích. Z důvodu velmi vysoké nespecifické vazby se však ukázalo, že není vhodným agonistou pro studium vazby k tomuto receptoru [44]. Pomocí  $^{125}\text{I}$ -Tyr-Ala-hexarelinu byla vazebnými experimenty dokázána specifická vazba k receptoru GHS-R v membránách buněk izolovaných z lidské hypofýzy a hypotalamu [45].

Ghrelin a stejně tak i další peptidoví agonisté vykazují krátký poločas degradace. Bylo proto navrženo mnoho nepeptidových agonistů ghrelinu. Za zmínění stojí nejúčinnější sloučeniny MK-0677 [46] a JMV1843 [47] (Obr.6), které byly zařazeny do klinických testů. JMV1843 má schopnost stimulovat uvolňování GH vyšší, než ghrelin [48] a nyní je již ve druhé fázi klinického testování na uvolňování růstové hormonu [13].

A)



B)



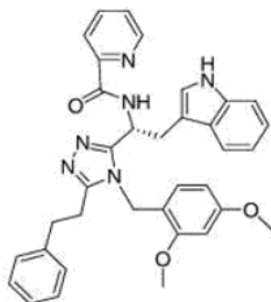
**Obr. 6 – Struktura vybraných nepeptidových agonistů receptoru GHS-R1a - A) MK-0677 a B) JMV1843**

### 1.3.3. Antagonisté ghrelinu

Z peptidových analogů se jako účinný antagonist GHS-R ukazuje [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a [D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>]substance P (dále jen SPa). Antagonistické působení těchto peptidů bylo prokázáno *in vitro* potlačením ghrelinem vyvolaného uvolnění Ca<sup>2+</sup> a u [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 také vytěsněním ghrelinu z vazby k buněčné linii RC-4B/C (potkaní hypofyzární tumorová linie) [49]. Dále na linii HEK 293 s transfektovaným receptorem GHS-R1a [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 i SPa potlačovaly ghrelinem vyvolanou fosforylaci ERK 1/2 (zkratka pochází z anglického výrazu – Extracellular Signal-Regulated Kinase typ 1/2) [50]. V *in vivo* experimentech bylo působením [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa dosaženo snížení příjmu potravy po centrálním i periferním podání u myši [51].

Je známo i mnoho nepeptidových antagonistů GHS-R. Jako první byl identifikován isoxazol-karboxamid [47]. Strukturně aktivní studie této sloučeniny vedly k objevení série molekul působících antagonisticky na GHS-R. Další GHS-R 1a antagonisté jsou odvozeni od tetralin-karboxamidu [47]. Tyto sloučeniny měly při studiích *in vivo* lepší farmakodynamické vlastnosti (např. vyšší biologickou dostupnost), než sloučeniny odvozené od isoxazol karboxamidu [47]. V laboratoři profesora Martineze bylo syntetizováno velké množství nepeptidových antagonistů GHS-R1a receptoru. *In vivo* antagonistické působení bylo popsáno např. u sloučeniny JMV 3002 (Obr. 7). Tato látka snížila orexigenní působení hexarelinu u sytých potkanů [52].

Firmou Abbott byly syntetizovány a následně podrobeny testům *in vivo* antagonisticky působící sloučeniny odvozené od 2,4 diaminopyrimidinu. Tyto sloučeniny v *in vivo* pokusech (na potkanech) dosáhly velmi dobrých výsledků. Mají dobrou biologickou dostupnost, jsou schopny procházet hematoencefalickou bariérou a 14 denní terapií bylo u pokusných potkanů dosaženo 5 % úbytku tělesné hmotnosti [47].



**Obr. 7 – Nepeptidový antagonist receptoru GHS-R1a JMV 3002**

### 1.3.4. Radioaktivně značené ligandy receptoru GHS-R1a

Jako radioligand, čili radioaktivně označený agonista receptoru GHS-R, jsou používány různé sloučeniny, které se také často používají pro strukturně aktivní studie analogů ghrelinu k buňkám s transfektovaným receptorem GHS-R [53].

V několika studiích, (stejně jako v naší studii), byl používán ghrelin s radioaktivním jódem  $^{125}\text{I}$  navázaným na histidin v pozici 9 označovaný [ $^{125}\text{I}$ -His<sup>9</sup>]-ghrelin [54]. Pro vazebné studie je používán [ $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>4</sup>]-ghrelin [55], který bylo možno radioaktivně označit díky záměně fenylalaninu v pozici 4 v přirozeně se vyskytujícím ghrelinu za tyrosin.

Při strukturně aktivních studiích analogů ghrelinu byl také používán nepeptidový agonista receptoru GHS-R [ $^{35}\text{S}$ ]MK-0677 [33].

$^{125}\text{I}$ -Tyr-Ala-GHRP-6 a  $^{125}\text{I}$ -Tyr-Ala-hexarelinu mají na N-konec těchto původních hexapeptidů (agonistů receptoru GHS-R) přidány aminokyselinové zbytky Tyr-Ala, čímž bylo umožněno tyto sloučeniny radioaktivně označit navázáním  $^{125}\text{I}$  na tyrosinovém zbytku [43, 45].

### 1.4. Hypofyzární buněčné linie používané pro vazebné studie ghrelinu

Pro vazebné studie ghrelinu byly v naší studii používány hypofyzární buněčné linie RC-4B/C, AtT-20 a GH3. Linie RC-4B/C byla získána z nezahoubného nádoru (adenomu) přední hypofýzy potkaních samců. Linie RC-4B/C obsahuje buňky, které produkují GH, luteinizační hormon (LH), hormon stimulující folikuly (FSH), prolaktin, adenokortikotropní hormon (ACTH) a tyreotropin (TSH). V této linii byla detekována exprese GHS-R1a receptoru [56]. Bylo prokázáno, že ghrelin v buňkách linie RC-4B/C prostřednictvím GHS-R1a receptoru vyvolává zvýšenou (v závislosti na dávce) koncentraci nitrobuněčných  $\text{Ca}^{2+}$  iontů [49, 57].

Linie AtT-20 pochází z tumoru přední hypofýzy myši. Tato linie produkuje adenokortikotropní hormon [58].

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 prolaktin [59]. Bylo zjištěno, že ghrelin v linii GH3 prostřednictvím GHS-R1a receptoru spouští signalizační kaskádu MAPK/ERK1/2 (zkratka pochází z anglického výrazu – Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal – Regulation Kinase 1/2) [60]. Fosforylací MAPK/ERK1/2 je regulována aktivita mnoha transkripčních faktorů.

## 2. Cíle

- Na hypofyzárních buněčných liniích přirozeně exprimujících receptor ghrelinu GHS-R 1a optimalizovat podmínky pro vazbu radioaktivně značeného ghrelinu a [Dpr<sup>3</sup>]ghr a provést saturační vazebnou studii.
- Kompetitivní vazbou analogů ghrelinu k buněčným membránám linie LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a porovnat *in vitro* afinitu analogů ghrelinu.
- Testovat analogy ghrelinu *in vivo* na příjem potravy u myší a určit jejich agonistickou nebo antagonistickou aktivitu.

### 3. Materiály a přístroje

#### 3.1. Chemikálie

Akrylamid ( $\geq 99\%$ )	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bisakrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
BSA	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
BNPP	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bromfenolová modř	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dodecyl sulfát sodný (SDS)	Sigma, St. Louis, MO, USA
DMEM – high glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
EGF	Sigma, St. Louis, MO, USA
EDTA	Lachema, Brno, Česká republika
FBS Standard quality	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Fyziologický roztok	Infusia, Hořátev, ČR
L-glutamin 200 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Glycerin bezvodý (p.a.)	PENTA, Chrudim, ČR
Glycin (p.a.)	PENTA, Chrudim, ČR
HEPES (99,5 %)	Sigma, St. Louis, MO, USA
IHS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Iodo-Gen	Pierce Chemicals Co., Rockford, IL, USA
Merkaptoethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
NaF (p.a.)	PENTA, Chrudim, ČR
Na <sup>125</sup> I	MP Biomedicals, Illkirch, Francie
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (minimum 90 %)	Sigma, St. Louis, MO, USA

PEI	Sigma, St. Louis, MO, USA
PMA	Sigma, St. Louis, MO, USA
PMSF	Sigma, St. Louis, MO, USA
Persíran amonný (>98 %)	Fluka, Buchs, Švýcarsko
Penicilín	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Standard dual color	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
TEMED	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trizma base Primary Standard and Buffer (> 99,9 %)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Koch-Light Lab. Colnbrook, Berks, VB

### 3.2. Materiály

Nitrocelulóková membrána	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
PVDF-Immobilon membrána	Sigma, St. Louis, MO, USA
Filtry GF/C	Whatman, Maidstone, Velká Británie

### 3.3. Protilátky

Anti GHSR-1a králičí polyklonální protilátka	Milipore, Billerica, MA, USA
Anti $\beta$ -aktin myší monoklonální protilátka	Sigma, St. Louis, MO, USA
Fosfo-p44/42MAPK(Thr202/Tyr204) myší monoklonální protilátka	Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA
P44/42 MAPK (ERK1/2) (3A7) myší monoklonální protilátka	Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA
Proti myší IgG peroxidázový konjugát	Sigma, St. Louis, MO, USA
Proti králičí IgG peroxidázový konjugát	Sigma, St. Louis, MO, USA

### 3.4. Růstová média

Hypofyzární buněčné linie byly pěstovány v umělých tekutých růstových médiích. Do médií byla přidávána séra, která poskytují nezbytné růstové faktory. Dále byl do všech médií přidáván L-glutamin (do konečné koncentrace 2 mM) a antibiotika (penicilin/streptomycin do konečné koncentrace 1% obj.). Antibiotika byla přidávána ze 100x koncentrovaného zásobního roztoku, přesnou koncentraci výrobce (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) neuvádí. Základní média obsahují esenciální aminokyseliny, zdroj energie, vitaminy a anorganické 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. Množství do médií přidávaných látek přehledně shrnuje tabulka (Tab. 1).

*Tab. 1 Přehled použitých růstových médií*

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



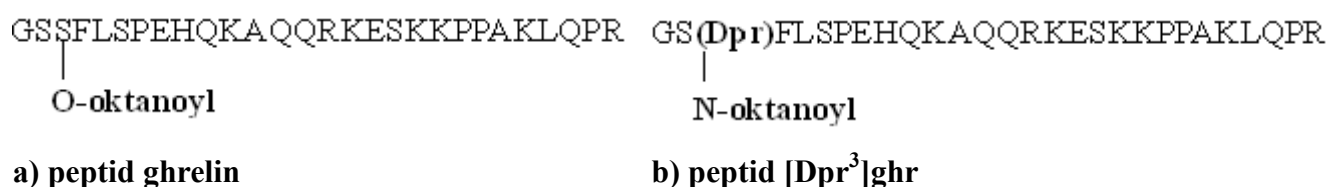
### 3.5. Přístroje

Biohazardní box	(EuroFlow S41, Clean Air, Woerden, Nizozemí)
Blotovací zařízení	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Brandelův přístroj	Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MA, USA
CCD kamera LAS-3000	Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, Německo
Centrifuga HETTICH Univerzal 320	Tuttlingen, Německo
CO <sub>2</sub> 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
Elektorforetická souprava	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

## 4. Metody

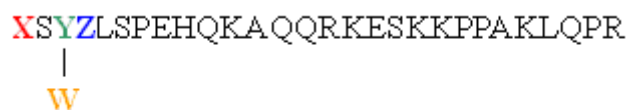
### 4.1. Peptidy

Peptid ghrelin (dále jen ghr) a jeho analogy byly syntetizovány v Ústavu organické chemie a biochemie, v.v.i., AVČR, Praha, na oddělení Syntézy peptidů, metodou syntézy na pevné fázi [61]. Základním syntetickým analogem ghrelinu v naší studii je [Dpr<sup>3</sup>]ghr, u kterého je serin v pozici 3 zaměněn za diamino-propionovou (Dpr) kyselinu, ke které je oktanová skupina vázána stabilnější amidovou vazbou. Aminokyselinová sekvence přirozeně se vyskytujícího ghrelinu (potkaní) a [Dpr<sup>3</sup>]ghr je na obrázku (Obr.8). Strukturu všech námi používaných analogů přehledně shrnuje tabulka (Tab.2 na str. 35).



**Obr. 8 – Sekvence peptidů ghr a [Dpr<sup>3</sup>]ghr.** (a) – peptid ghrelin je tvořen 28 AMK a k serinu v pozici 3 je esterovou vazbou připojen oktanoyl. (b) – peptid [Dpr<sup>3</sup>]ghr – je tvořen 28 AMK, serin v pozici 3 je zaměněn za Dpr (diamino-propionovou kyselinu), ke které je oktanoyl připojen stabilnější amidovou vazbou.

**Tab. 2 – Sekvence analogů ghrelinu.** Analogy ghrelinu měly modifikace v aminokyselinách v pozicích 1 (X), 3 (Y) a 4 (Z) a řetězci (W) navázaném na pozici na pozici 3. Význam zkratk: Sar – sarkosin, Dpr – diamino-propionová kyselina, Nal – naftylalanin, Cha – cyklohexylalanin, Trp – tryptofan.



	Název	Počet				
		AMK	W	X	Y	Z
1	ghr	28	O-oktanoyl	G	S	F
2	[Dpr <sup>3</sup> ]ghr	28	N-oktanoyl	G	Dpr	F
3	[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> ]ghr	28	N-oktanoyl	Sar	Dpr	F
4	[Dpr <sup>3</sup> , Nal <sup>4</sup> ]ghr	28	N-oktanoyl	G	Dpr	Nal
5	[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> , Nal <sup>4</sup> ]ghr	28	N-oktanoyl	Sar	Dpr	Nal
6	[Dpr <sup>3</sup> , Cha <sup>4</sup> ]ghr	28	N-oktanoyl	G	Dpr	Cha
7	[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> , Cha <sup>4</sup> ]ghr	28	N-oktanoyl	Sar	Dpr	Cha
8	Ghr (1-5)	5	O-oktanoyl	G	S	F
9	[Dpr <sup>3</sup> ]ghr (1-5)	5	N-oktanoyl	G	Dpr	F
10	[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> ]ghr (1-5)	5	N-oktanoyl	Sar	Dpr	F
11	[Dpr <sup>3</sup> ]ghr (1-8)	8	N-oktanoyl	G	Dpr	F
12	[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> ]ghr (1-8)	8	N-oktanoyl	Sar	Dpr	F
13	desoktanoyl ghr	28	-	G	S	F
14	desoktanoyl [Dpr <sup>3</sup> ]ghr	28	-	G	Dpr	F
15	[Trp <sup>3</sup> ]ghr (1-5)	5	-	G	Trp	F
16	[Nal <sup>3</sup> ]ghr (1-5)	5	-	G	Nal	F

## 4.2. Jodace Ghrelinu a [Dpr3]ghr

Ghrelinu a [Dpr<sup>3</sup>]ghr byly jodovány na histidinovém zbytku v pozici 9 pomocí Na<sup>125</sup>I či neradioaktivním NaI s použitím činidla 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 ghrelinu, nebo [Dpr3]ghr byly separovány pomocí RP-HPLC po 30 minut působení. Jako mobilní fáze byl použit 20% až 40% gradient acetonitrilu ve vodě s 1% TFA (kyselinou trifluoroctovou). Molekulová hmotnost neradioaktivně jodovaného peptidu byla ověřena hmotnostní spektrometrií.

Mono-jodovaný [<sup>125</sup>I-His<sup>9</sup>]-ghrelinu (dále jen <sup>125</sup>I-ghr) a mono-jodovaný [<sup>125</sup>I-His<sup>9</sup>]-[Dpr3]ghr (dále jen <sup>125</sup>I-[Dpr3]ghr) používané pro vazebné experimenty byly uchovány v alikvotech při -20 °C a spotřebovány v průběhu jednoho měsíce.

## 4.3. Pěstování hypofyzárních buněčných linií

Buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 95 % vzduchu a 5 % oxidu uhličitého.

Buňky byly při pěstování vyživovány tekutými růstovými médii (viz kapitola 3). Hypofyzární buněčné linie RC-4B/C, AtT-20 a GH3 jsou adherentní. Při kultivaci adherentních kultur je třeba dbát na to, aby buňky nedosáhly 100% konfluency (kompletní porost na dně nádoby). Pasážování bylo prováděno po 2 – 4 dnech exponenciálního růstu. Pro vazebné pokusy byly buňky pěstovány ve 24-jamkových destičkách (Nunclon<sup>TM</sup>, NUNC, Roskilde, Dánsko), s průměrem jamky 15 mm. Pro lepší adhezi buněk bylo dno jamek potaženo polyethyleniminem. Před pokusem byly buňky asi z 80 % konfluentní.

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

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

## 4.5. Detekce receptoru GHS-R 1a

Buňkám na 24-jamkových vazebných destičkách bylo odsáto růstové médium, jamky byly 3x promyty promývacím pufrům (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM NaHPO<sub>4</sub>,

1,76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a následně byly lyzovány lyzačním pufrem (62,5 mM Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř). Obsah jamek po 5 minutách působení lyzačního pufru byl přenesen do mikrozkušavek a zamražen při  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Počet buněk byl počítán v kontrolních jamkách vždy před a po pokusu.

Lyzát buněk byl před elektroforézou denaturován (sonikace po dobu 30-ti sekund, zahřátí na  $100\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 2 minut). Množství vzorku pro elektroforézu bylo určeno dle počtu buněk v lyzátu (po pokusu). Jako standard molekulové hmotnosti byl použit Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, Herkules, CA, USA).

Elektroforéza probíhala ve 5/12% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného na přístroji MiniProtean 3 (Bio-rad, Herkules, CA, USA) v elektrodovém pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 1% SDS) při konstantním napětí 100 V (prvních 10 minut) a dále při 150 V (cca 1 h). Postup SDS-PAGE byl proveden dle doporučeného protokolu firmy BioRad (Herkules, CA, USA).

Po proběhnutí SDS-PAGE byly proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Přenos probíhal v blotovacím pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol, 0,1% SDS) pomocí blotovacího zařízení (Bio-Rad, Herkules, CA, USA) při konstantním napětí 30 V, po dobu 18 hodin, při  $6\text{ }^\circ\text{C}$ .

Po přenesení proteinů byla membrána promyta po dobu 5 minut promývacím pufrem (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20). Dále byla membrána inkubována 1 hodinu s blokujícím pufrem (5 % sušené netučné mléko, 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20) a po té byla třikrát po 5-ti minutách promyta promývacím pufrem.

Po blokaci a promytí byla membrána inkubována s primární protilátkou (Tab. 3), která byla ředěna v blokovacím pufru v poměru dle doporučení výrobce. Membrána byla inkubována s primární protilátkou 1 hodinu a po té byla třikrát po 5-ti minutách promyta promývacím pufrem.

Dále byla membrána inkubována 1 hodinu se sekundární protilátkou (Tab. 3). Peroxidázový konjugát sekundární protilátky byl ředěn v blokovacím pufru dle doporučení výrobce. Po inkubaci byla membrána opět třikrát po dobu 5-ti minut promyta promývacím pufrem. Postup byl proveden za pokojové teploty, podle doporučeného protokolu firmy Cell signalling technology (Beverly MA, USA).

Poté byla membrána 5 minut inkubována (bez přístupu světla) s činidlem Femto (Pierce SuperSignal, Thermo Fischer Scientific, Rocford, IL, USA). Chemilumiscence vyvolaná reakcí sekundární protilátky s činidlem Femto byla detekována v CCD kameře LAS-3000 (Phuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, Německo).

Vzorky použité k detekci GHS-R 1a byly použity ke stanovení aktinu. Tato metoda sloužila jako stanovení celkových proteinů ve vzorcích buněčných lyzátů. Aktin byl detekován pomocí specifické primární protilátky metodou Western blot postupem popsaným výše. Druh a ředění použitých protilátek shrnuje tabulka (Tab. 3)

**Tab. 3 – Přehled použitých protilátek a ředění**

<b>Protilátka</b>	<b>Základní látka</b>
Primární anti GHS-R 1a	Králičí GHS-R 1a polyklonální protilátka, ředění 1 : 320 (Millipore, Billerica, MA, USA)
Primární anti $\beta$ -aktin	Myší anti $\beta$ -aktin monoklonální protilátka, Ředění 1 : 500 (Sigma, St. Louis, MO, USA)
Sekundární proti králičí	Proti králičí IgG připravený v koze, konjugovaný s peroxidázou, ředění 1:12000 (Sigma, St. Louis, MO, USA)
Sekundární proti myší	Proti myší IgG připravený v koze, konjugovaný s peroxidázou, ředění 1:12000 (Sigma, St. Louis, MO, USA)

#### 4.6. Saturační vazebné experimenty na celých buňkách RC-4B/C, AtT-20 a GH3

Buňky na 24-jamkových destičkách byly před pokusem z 80% konfluentní. Z jamek bylo odsáto médium a jamka byla promyta 1 ml promývacího pufru o pH 7,4 (10mM HEPES, 120 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl). Pokusy byly prováděny za dříve optimalizovaných inkubačních podmínek [44]. Vazebné experimenty probíhaly ve vazebném pufru o pH 7,4 (50 mM Tris/HCl, 120 mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl). Pro stanovení celkové vazby - B<sub>T</sub> byly použity <sup>125</sup>I-ghr nebo <sup>125</sup>I-[Dpr<sup>3</sup>]ghr v koncentraci 0,5 – 5 nM, pro určení nespecifické vazby – B<sub>NSB</sub> byl do jamek vedle radioligandu napipetován neznačený ghr nebo [Dpr<sup>3</sup>]ghr o koncentraci 10<sup>-5</sup> M. Inkubace probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byly jamky třikrát promyty promývacím pufrům a buňky byly solubilizovány 0,1 M NaOH. Po 15 minutách působení NaOH byl obsah jamek přenesen do

zkumavek a množství radioaktivity navázané na buňkách bylo určeno pomocí Gama-čítače (Wizard 1470, Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). Každý pokus byl prováděn v duplikátech a minimálně třikrát opakován. Počet buněk byl počítán v kontrolních jamkách vždy před a po pokusu. Saturační vazebné experimenty byly navrženy dle principů Motulského a Neubiga [62].

#### **4.7. Stabilizace vazby $^{125}\text{I}$ -ghr a $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr k hypofyzárním liniím pomocí inhibitorů proteas a esterasy**

Saturační vazebné experimenty s  $^{125}\text{I}$ -ghr a  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr byly dále prováděny s přidavkem inhibitorů proteas a esterasy ve vazebném pufru (viz kapitola 4.6.). Za účelem snížení degradace proteinů během inkubace byly do vazebného pufru přidávány tyto inhibitory: EDTA o koncentraci 2,5 mM, dále EDTA ve stejné koncentraci spolu s BNPP (bis-[p-nitrophenyl] phosphate) o koncentraci 0,3 mg/ml a PMSF (phenylmethylsulfonyl florid) o koncentraci 1mM. Roztok PMSF byl připravován vždy těsně před pokusem [41]. Průběh experimentů i inkubace probíhala za stejných podmínek jako v předchozí kapitole (viz kapitola 4.6.).

#### **4.8. Stanovení buněčné signalizace pMAPK/ERK 1/2 na buněčné linii GH3**

Buňky byly narostlé na 24-jamkových vazebných destičkách do 80 % konfluence. Zhruba 18 hodin před pokusem bylo buňkám vyměněno médium za médium bez séra. Následující den byly buňky inkubovány s PMA (phorbol-myristoyl-acetát, jako pozitivní kontrola), ghr nebo [Dpr3]ghr v konečné koncentraci  $10^{-5}$  M, nebo TRH v konečné koncentraci  $10^{-6}$  M. Buňky byly inkubovány za stálého míchání 10 minut při 37°C. Po skončení inkubace bylo médium s látkami z jamek odsáto, každá jamka byla třikrát promyta promývacím pufrem (viz kapitola 4.5.) a buňky byly ponechány 5 minut při 4°C inkubovat s lyzačním pufrem (62,5 mM Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 50 mM NaF, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Zlyzované buňky byly přeneseny do mikroskopických zkumavek, 10-15 sekund sonikovány a zamrazeny při -20 °C. Počet buněk byl počítán v kontrolních jamkách vždy před a po pokusu.

Se vzorky byla dále provedena elektroforéza (viz kapitola 4.5.). Po proběhnutí byly proteiny přeneseny na membránu PVDF (polyvinylidenfluorid) - PVDF-Immobilon<sup>TM</sup> (Sigma-Aldich, USA). Přenos probíhal v blotovacím pufrem (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20%

methanol). Po přenesení proteinů byla membrána promyta po dobu 5 minut promývacím pufrem (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20). Dále byla membrána inkubována 1 hodinu s blokujícím pufrem (5 % sušené netučné mléko, 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 50 mM NaF, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) a po té byla třikrát po 5-ti minutách promyta promývacím pufrem. Dále byla membrána inkubována s primární a později sekundární protilátkou, dle postupu v předchozí kapitole (viz kapitola 4.5.). Druh a ředění použitých protilátek shrnuje tabulka (Tab. 4)

Vzorky použité k detekci pMAPK/ERK1/2 byly také použity ke stanovení celkového MAPK/ERK1/2. Tato metoda sloužila jako stanovení celkových proteinů ve vzorcích buněčných lysátů. MAPK byl detekován pomocí specifické primární protilátky metodou Western blot, postupem popsáným výše. Druh a ředění použitých protilátek shrnuje tabulka (Tab. 4).

**Tab. 4 – Přehled použitých protilátek a ředění**

<b>Protilátka</b>	<b>Základní látka</b>
Primární Fosfo MAPK/ERK1/2	Myší Fosfo-p44/42MAPK (Thr202/Tyr204) monoklonální protilátka, ředění 1 : 2000 (Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA)
Primární MAPK/ERK1/2	Myší p44/42MAPK (3A7) monoklonální protilátka, ředění 1 : 2000 (Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA)
Sekundární proti králičí	Proti králičí IgG připravený v koze, konjugovaný s peroxidázou, ředění 1:12000 (Sigma, St. Louis, MO, USA)

#### **4.9. Membrány LCC PK-1 buněk s tranfektovaným lidským receptorem GHS-R 1a**

Pro saturační a kompetitivní vazebné experimenty byly použity membrány LCC PK-1 buněk s tranfektovaným lidským receptorem GHS-R 1a (dar od Prof. Martinez, CNRS, Montpellier, Francie). Transfekce byla provedena metodou elektroporace [53].



Suspenze buněk byla rozmrazena vždy před pokusem, po rozmražení byla ředěna ve vazebném pufru o pH 7,4 (50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % BSA) na konečnou koncentraci proteinů 10 µg/zkumavku. Po naředění byly membrány homogenizovány ve skleněném homogenizátoru s teflonovým dříkem. Během celého pokusu byly membrány míchány a uchovány na ledu.

#### **4.10. Vazebné experimenty na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHSR-1**

##### **4.10.1. Saturační vazebné experimenty**

Vazebné experimenty probíhaly za optimalizovaných podmínek [53], ve vazebném pufru (viz kapitola 4.4.). Pro určení B<sub>T</sub> byl do zkumavek napipetován <sup>125</sup>I-[Dpr<sup>3</sup>]ghr nebo <sup>125</sup>I-ghr o koncentraci 0,5 – 8 nM, do zkumavek v nichž se určovala B<sub>NSB</sub> byl vedle radioligandu napipetován nezařazený peptid [Dpr<sup>3</sup>]ghr nebo ghr o koncentraci 10<sup>-5</sup> M. Pokus byl spuštěn přidáním suspenze membrán buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a (viz kapitola 4.4.) do konečné koncentrace 10 ng/zkumavku. Inkubace probíhala 45 minut za stálého míchání při pokojové teplotě a byla ukončena rychlou filtrací na Brandelově přístroji (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MA, USA). Použité filtry GF/C (Whatman, Maidstone, Velká Británie) byly před pokusem namočené 60 minut ve vazebném pufru s 0,5 % PEI. Zkumavky byly pomocí Brandelova přístroje třikrát promyty vychlazeným (4°C) promývacím pufrům o pH 7,4 (20mM Tris, 5 mM EDTA, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,015% Triton-20). Množství radioaktivity navázané na membránách bylo určeno pomocí Gamačítače. Každý pokus byl prováděn v duplikátech a minimálně třikrát opakován. Schéma saturačních vazebných experimentů bylo provedeno dle Motulského a Neubiga [62].

##### **4.10.2. Kompetitivní vazebné experimenty**

Kompetitivní vazebné experimenty probíhaly za stejných podmínek jako saturační vazebné experimenty na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a (viz kapitola 4.7.1.). Pro určení B<sub>T</sub> byl do vazebného pufru napipetován <sup>125</sup>I-[Dpr<sup>3</sup>]ghr nebo <sup>125</sup>I-ghr o koncentraci 5x10<sup>-11</sup> M. Do zkumavek, v nichž se určovala B<sub>NSB</sub>, byl vedle

radioligandu přidán neznačený peptid [Dpr<sup>3</sup>]ghr nebo ghr o koncentraci 10<sup>-5</sup> M. Kompetující peptidy byly používány v koncentracích 10<sup>-12</sup> – 10<sup>-4</sup> M. Pokusy byly prováděny v duplikátech a minimálně třikrát opakovány. Kompetitivní vazebné experimenty byly navrženy dle principů Motulského a Neubiga [62].

#### 4.11. Analýza dat získaných z vazebných pokusů a statistika

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

Z těchto křivek byly získány hodnoty: B<sub>max</sub> (Počet vazebných míst/buňka v případě pokusů na celých buňkách, fmol receptorů/mg membránových proteinů v případě pokusů na buněčných membránách), K<sub>d</sub> – rovnovážná disociační konstanta radioligandu [M] (označující koncentraci radioligandu, při které se radioligand za rovnováhy váže na polovinu vazebných míst), IC<sub>50</sub> – poloviční inhibiční konstanta [M] (označující koncentraci neznačeného ligandu, při které se neznačený ligand váže na polovinu vazebných míst v přítomnosti radioligandu) [62] a byly statisticky zpracovány a vyjádřeny jako průměr ± střední chyba průměru (SEM). Hodnota K<sub>i</sub> – rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu [M] (označující koncentraci neznačeného ligandu, při které se neznačený ligand váže na polovinu vazebných míst v rovnováze za nepřítomnosti radioligandu či jiných kompetitorů) byla získána pomocí hodnoty IC<sub>50</sub> a K<sub>d</sub> dosazením do rovnice Cheng-Prusoffa (Obr. 9) [63].

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

**Obr. 9** *Rovnice Cheng-Prusoffa pro výpočet K<sub>i</sub>. K<sub>i</sub> – rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu [M] byla vypočítána dosazením hodnot: IC<sub>50</sub> – poloviční inhibiční konstanty [M] (získané z kompetitivních vazebných experimentů), K<sub>d</sub> – rovnovážné disociační konstanty radioligandu [M] (získané ze saturačních vazebných experimentů) a [radioligand] [M] – koncentrace radioligandu používané při kompetitivních experimentech [62, 63].*

## **4.12. Stanovení příjmu potravy u myši**

### **4.12.1. Použitá zvířata**

Pokusy příjmu potravy byly prováděny na přibližně 3 měsíce starých myších samcích inbredního kmene C57Bl/6 (AnLab, ČR) o průměrné hmotnosti 30 g. Zvířata byla chována v akreditovaném zvěřinci ÚMG AV ČR při teplotě  $22 \pm 2$  °C, měla volný přístup k potravě i pití a rytmus světlo/tma byl 12/12 hodin (světlo od 6 hodin ráno). Myši byly krmené standardní dietou St-1 (Velaz, Koleč, ČR). Hmotnost myši byla sledována pravidelně jednou týdně. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.) a pokusy byly schváleny komisí pro experimenty se zvířaty AV ČR.

### **4.12.2. Test příjmu potravy – orexigenní aktivita**

V pokusu byla použita sytá zvířata chovaná jednotlivě v klecích, která měla přístup k potravě do začátku pokusu, přístup k pití měla zvířata během celého pokusu. Každá skupina byla tvořena 5-6ti zvířaty. Testované látky byly zvířatům podávány subkutánně (SC) v objemu 0,2 ml o koncentraci 0,1 – 10 mg/kg, kontrolním zvířatům byl SC podán fyziologický roztok (0,2 ml). Po aplikaci látky byla zvířatům odebrána potrava, která jim byla vrácena za 15 minut od aplikace látky (předem zvážené pelety). Množství zkonsumované potravy bylo stanoveno vážením pelety každých 30 minut po dobu 6 – 8 hodin.

### **4.12.3. Test příjmu potravy – anorexigenní aktivita**

V pokusu byla použita hladová zvířata (po 17 hodinách hladovění) chovaná jednotlivě v klecích, která měla přístup k pití během celého pokusu. Každá skupina byla tvořena 5-ti zvířaty. Testované látky byly zvířatům podávány subkutánně v objemu 0,2 ml o koncentraci 10 mg/kg, kontrolním zvířatům byl SC podán fyziologický roztok (0,2 ml). Za 15 minut od aplikace látky byla zvířatům podána potrava (předem zvážené pelety). Množství zkonsumované potravy bylo měřeno vážením pelety každých 30 minut po dobu 6 – 8 hodin.

### **4.13. Stanovení koncentrace růstového hormonu v plasmě**

#### **4.13.1. Odběr krve/plasmy**

Myším kmene C57 o přibližném stáří 3 měsíce a průměrné hmotnosti 30 g byly aplikovány SC látky (ghr, [Dpr<sup>3</sup>]ghr, [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr a [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr) v množství 0,2 ml v dávce 3 mg/kg, kontrolním zvířatům byl podán SC pouze fyziologický roztok. Každá skupina byla tvořena 5-7 zvířaty. Pět minut po aplikaci látek byla zvířata usmrcena cervikální dislokací a byla jim odebrána krev do zkumavky s roztokem EDTA (konečná koncentrace EDTA činila v 500 µl krve přibližně 10%). Z celé krve byla po oddělení krevního koláče získána plasma (centrifugací 3000 x g, 15 min při 10 °C), která byla uchována v alikvotech při – 20 °C.

#### **4.13.2. Stanovení koncentrace růstové hormonu v plasmě**

Koncentrace růstového hormonu byla v plasmě stanovena pomocí RIA kitu pro potkaní růstový hormon (Izotop, Budapešť, Maďarsko) dle instrukcí výrobce.

#### **4.13.3. Vyhodnocení výsledků**

### **4.14. Výpočty a statistika *in vivo* experimentů**

Výsledky z příjmu potravy jsou vyhodnoceny v gramech příjmu potravy v závislosti na čase od podání látek. Vynesením gramů přijaté potravy v závislosti na dávce podané látky byly v programu Graph-Pad Prism Software získány křivky, z nichž byly pro jednotlivé látky určeny hodnoty EC<sub>50</sub> (poloviční efektivní koncentrace) [62].

Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pro zjištění směrodatnosti rozdílů mezi skupinami a jsou uvedeny jako průměrná hodnota ± střední chyba průměru (SEM). Statistika byla prováděna metodou one-way ANOVA, za použití Dunnetova srovnávacího testu. Rozdíly byly považovány za signifikantní pokud  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) a  $P < 0,001$  (\*\*\*)

## 5. Výsledky

### 5.1. Peptidy

Molekulová hmotnost syntetizovaných peptidů (viz Tab. 2 na str. 35) byla ověřena na hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Bylo prokázáno, že se shoduje s teoretickou hmotností. Čistota peptidů byla vyšší než 95 %.

### 5.2. Jodace ghrelinu a [Dpr<sup>3</sup>]ghr

Ghrelín a [Dpr<sup>3</sup>]ghr byly jodovány radioaktivně i neradioaktivně na oddělení Radioizotopy ÚOCHB, v.v.i., AVČR Praha. Produktem reakcí byl mono-jodovaný a di-jodovaný ghrelín (nebo [Dpr<sup>3</sup>]ghr) v poměru 2:1, přičemž část peptidu zůstala nezreagovaná.

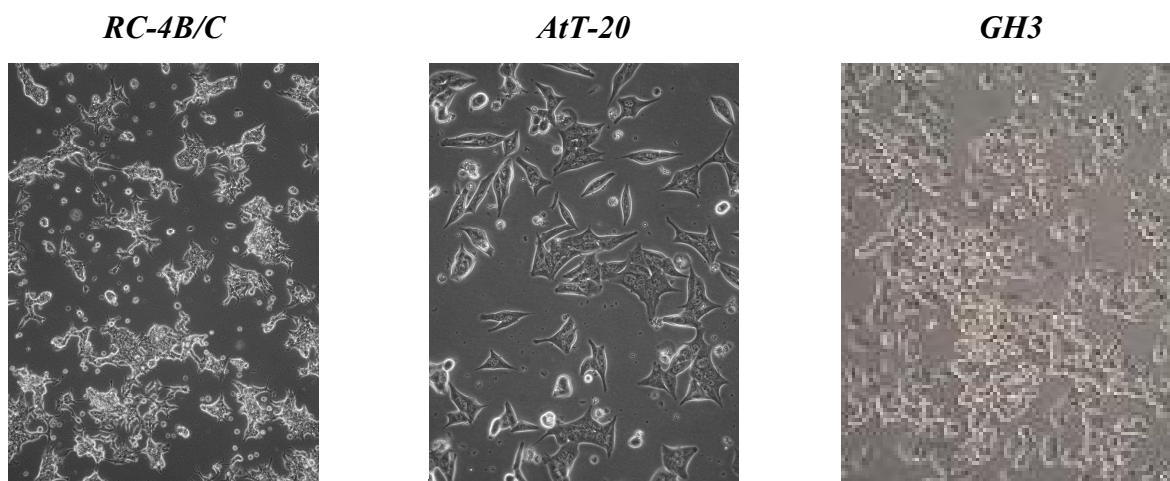
Mono-jodovaný <sup>125</sup>I-ghr (nebo [Dpr<sup>3</sup>]ghr) používaný při našich experimentech byl od di-jodovaného a nezreagovaného peptidu oddělen pomocí RP-HPLC.

### 5.3. 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 vazebném pokusu. Správný růst buněčných linií byl zajištěn kultivací za sterilních a teplotně optimálních podmínek ve vhodném růstovém médiu.

Fotografie buněčných linií jsou na obrázku (Obr. 10 na str. 46).

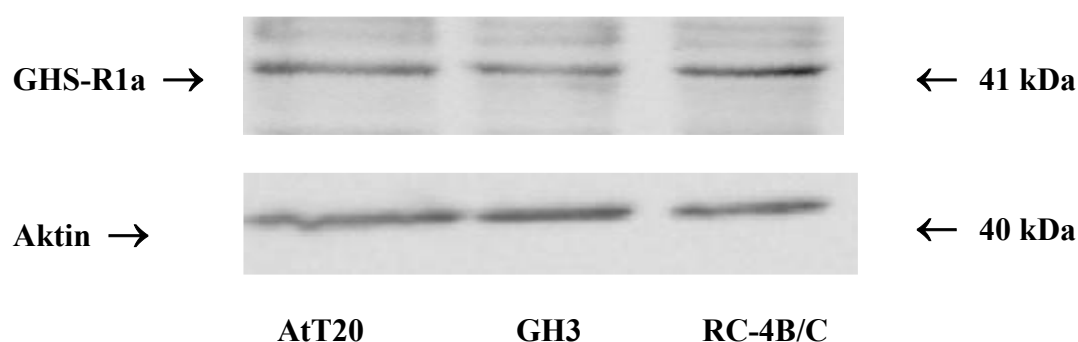


**Obr. 10 – Buněčné linie**

*Hypofyzární buněčné linie byly fotografovány po 72-96 hodinách růstu se zvětšením 20x.*

#### **5.4. Detekce receptoru GHS-R 1a**

Přítomnost receptoru GHS-R 1a v buněčných liniích RC 4B/C, AtT-20 a GH3 byla prokázována metodou Western Blot pomocí specifické primární protilátky. Na membránách byl u všech linií prokázán protein odpovídající molekulové hmotnosti GHS-R 1a o velikosti 41 kDa dle polohy standardu molekulové hmotnosti a proužek odpovídající molekulové hmotnosti aktinu o velikosti 40 kDa dle polohy standardu molekulové hmotnosti (Obr. 11). Přítomnost receptoru pro ghrelin (GHS-R 1a ) tak byla touto metodou prokázána ve všech námi používaných liniích. Stanovením aktinu bylo potvrzeno stejné množství naneseného proteinu ve všech vzorcích hypofyzárních linií (Obr. 11).



**Obr. 11 – Detekce receptoru pro ghrelin (GHS-R 1a) a aktinu na linii RC-4B/C, AtT20 a GH3 metodou Western blot. Lyzace buněk a postup Western blotu bylo popsáno v metodách (viz kapitola 4.5.).**

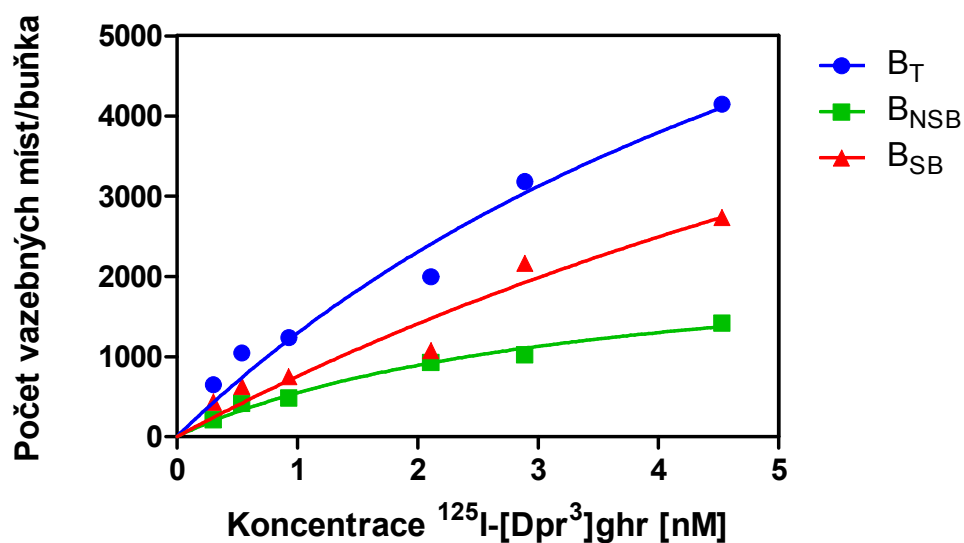
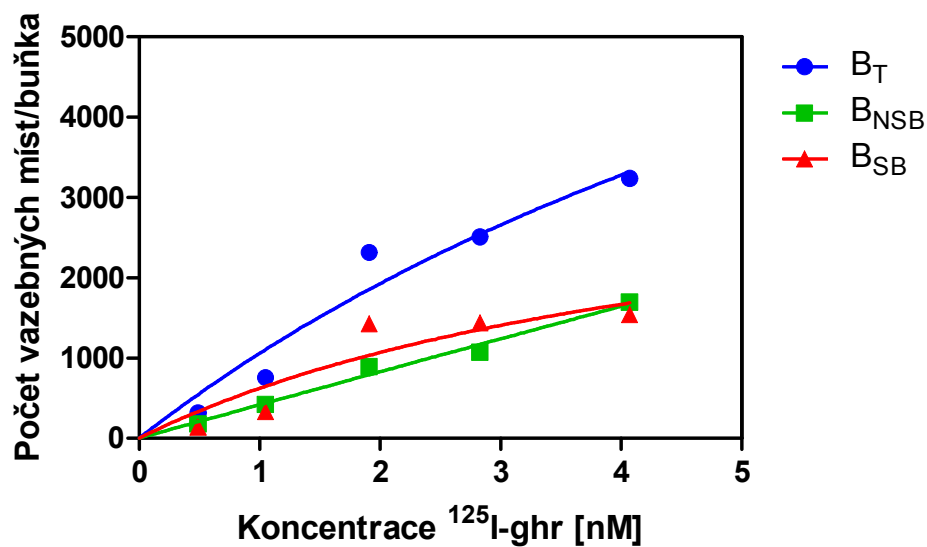
### 5.5. Saturační vazebné experimenty na celých buňkách RC-4B/C, AtT20 a GH3

Saturační vazebné experimenty s  $^{125}\text{I-ghr}$  a  $^{125}\text{I-[Dpr}^3\text{]ghr}$  na celých buňkách linií RC-4B/C, AtT20 a GH3 byly prováděny za podmínek optimalizovaných předchozími experimenty – 1 hodinu, při pokojové teplotě ve vazebném pufru bez přidavku inhibitorů proteas a esteras. Nеспецифická vazba vzrůstala lineárně se zvyšující se koncentrací radioligandu, činila téměř 50% z celkové vazby  $^{125}\text{I-ghr}$  a téměř 30% z celkové vazby  $^{125}\text{I-[Dpr}^3\text{]ghr}$ . Odečtením nespecifické vazby od vazby celkové byl získán graf specifické vazby –  $B_{\text{SB}}$ . Z grafu specifické vazby byly odečteny hodnoty rovnovážné disociační konstanty  $K_d$  a počet vazebných míst na buňku  $B_{\text{max}}$ , které jsou se střední chybou průměru (SEM) uvedeny v tabulce (Tab. 5). Reprezentativní vazebné křivky pro linii GH3 jsou ukázány na obrázku (Obr. 12 na str. 48).

**Tab. 5 – Konstanty  $B_{\text{max}}$  a  $K_d \pm \text{SEM}$  určené saturačními experimenty z grafu specifické vazby  $^{125}\text{I-ghr}$  a  $^{125}\text{I-[Dpr}^3\text{]ghr}$  k buňkám RC-4B/C, AtT-20 a GH3**

$B_{\text{max}}$  je počet vazebných míst 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, ve vazebném pufru bez přidavku inhibitorů proteas. Výsledné hodnoty  $B_{\text{max}}$  a  $K_d$  jsou průměrem výsledků minimálně ze tří experimentů.

Buněčná linie	$B_{\text{max}}$ [vazebná místa/buňka]		$K_d$ [nM]	
	$^{125}\text{I-ghr}$	$^{125}\text{I-[Dpr}^3\text{]ghr}$	$^{125}\text{I-ghr}$	$^{125}\text{I-[Dpr}^3\text{]ghr}$
<b>RC-4B/C</b>	13400 ± 3700	10600 ± 2700	3,79 ± 1,47	4,25 ± 0,85
<b>AtT 20</b>	2800 ± 1200	7300 ± 2300	3,40 ± 2,44	4,17 ± 0,90
<b>GH3</b>	19800 ± 10000	19700 ± 2600	6,85 ± 1,10	8,53 ± 1,73



**Obr. 12 – Reprezentativní křivky saturačních vazebných experimentů  $^{125}\text{I-ghr}$  nebo  $^{125}\text{I-[Dpr}^3\text{]ghr}$  k buněčné líně GH3**

Buňky byly inkubovány při 25 °C po 60 minut, ve vazebném pufru s rostoucí koncentrací  $^{125}\text{I-ghr}$  nebo  $^{125}\text{I-[Dpr}^3\text{]ghr}$  v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba)  $1 \times 10^{-5} \text{ M ghr [Dpr}^3\text{]ghr}$ . Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby. Křivky byly vyneseny pomocí nelineární regrese.



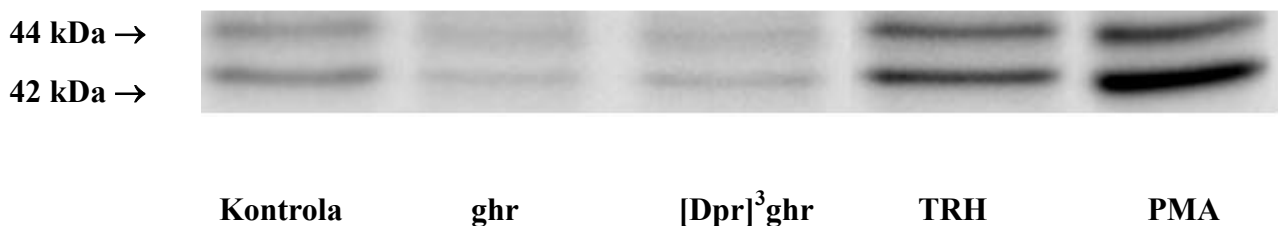
## 5.6. Stabilizace vazby $^{125}\text{I}$ -ghr a $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr k hypofyzárním liniím pomocí inhibitorů proteas a esteras

Za účelem snížení degradace peptidů  $^{125}\text{I}$ -ghr a  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr během inkubace, k dosažení nižší nespecifické vazby k hypofyzárním buňkám, byly do vazebného pufru přidávány tyto inhibitory proteas a esteras: EDTA, EDTA +BNPP a PMSF [41]. Přídavek žádné z těchto látek nevedl ke snížení nespecifické vazby.

## 5.7. Stanovení Fosforylace MAPK/ERK1/2 u linie GH3 metodou Western blot

Pro aktivaci MAPK/ERK1/2 bylo na buňky působeno peptidy ghr a [Dpr<sup>3</sup>]ghr v koncentraci  $10^{-5}$  M. Jako pozitivní kontrola byly použity PMA v koncentraci  $10^{-5}$  M a TRH v koncentraci  $10^{-6}$  M. Inkubace probíhala po dobu 10 minut, při 37 °C. Působením peptidů ghr a [Dpr<sup>3</sup>]ghr nedošlo ke zvýšení fosforylace MAPK/ERK1/2 oproti kontrole, jak je patrné z obrázku (Obr. 13). Inkubace s TRH a PMA jako standardních látek způsobila zvýšenou fosforylací MAPK/ERK1/2 oproti kontrole.

Se stejnými vzorky lyzátů buněk GH3 byl metodou Western blot pomocí specifické primární protilátky detekován celkový MAPK/ERK1/2. Tímto stanovením bylo potvrzeno stejné celkové množství protein MAPK/ERK1/2 ve všech použitých vzorcích lyzátů buněk GH3.



**Obr. 13 – Stanovení Fosforylace MAPK/ERK1/2 na linii GH3 metodou Western blot.** Pro stimulaci bylo na buňky působeno ghr a [Dpr<sup>3</sup>]ghr v koncentraci  $10^{-5}$  M 10 minut při 37 °C, jako pozitivní kontrola sloužil PMA ( $10^{-5}$  M) a TRH ( $10^{-6}$ ). Lyzace buněk po působení a stanovení metodou Western blot bylo popsáno v Metodách (viz kapitola 4.5.).

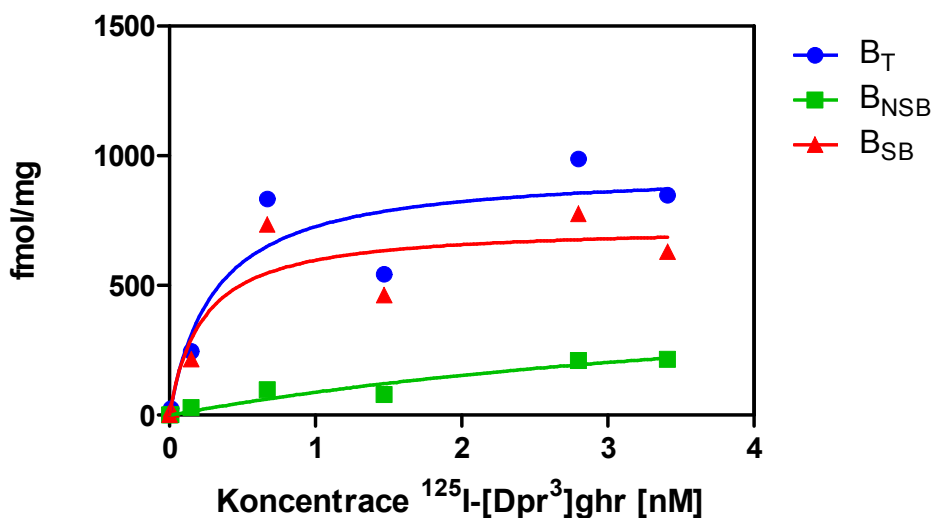
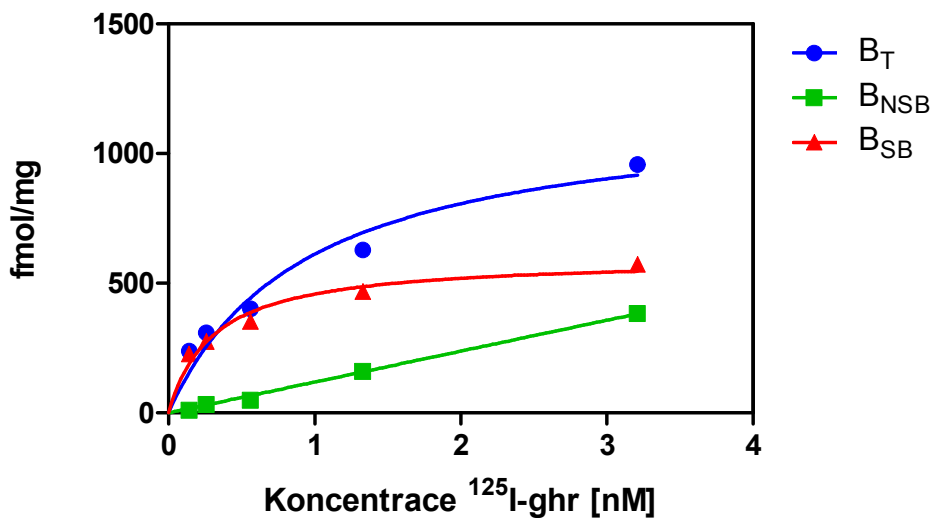
## 5.8. Saturační vazebné experimenty na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a

Saturační vazebné experimenty na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a byly prováděny s  $^{125}\text{I}$ -ghr a  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr za optimalizovaných podmínek [53] – 10 ng/zkumavku, inkubace 45 minut, při pokojové teplotě a za stálého míchání. Nespecifická vazba vzrůstala lineárně se zvyšující se koncentrací radioligandu, a byla asi 20 % z celkové vazby. Odečtením nespecifické vazby od vazby celkové byl získán graf specifické vazby –  $B_{\text{SB}}$ . Z grafu specifické vazby byly odečteny hodnoty  $K_d$  a  $B_{\text{max}}$ , které jsou se střední chybou průměru (SEM) uvedeny v tabulce (Tab. 6). Reprezentativní grafy jsou znázorněny na obrázku (Obr. 14 na str. 51).

**Tab. 6 – Konstanty  $B_{\text{max}}$  a  $K_d \pm \text{SEM}$  určené saturačními experimenty z grafu specifické vazby  $^{125}\text{I}$ -ghr a  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr k membránám buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a**

*$B_{\text{max}}$  je uvedena ve fmol/mg (fmol receptorů na mg membránových proteinů),  $K_d$  je rovnovážná disociační konstanta. Obě hodnoty byly zjišťovány při saturačních vazebných experimentech probíhajících při době inkubace 45 minut a teplotě 25 °C. Výsledné hodnoty  $B_{\text{max}}$  a  $K_d$  jsou průměrem výsledků minimálně ze tří experimentů.*

Látka	$K_d$ [nM]	$B_{\text{max}}$ [fmol/mg]
$^{125}\text{I}$ -ghr	0,44 ± 0,12	860 ± 160
$^{125}\text{I}$ -[Dpr <sup>3</sup> ]ghr	0,79 ± 0,28	800 ± 70



**Obr. 14 – Reprezentativní křivky saturačních vazebných experimentů. Vazba  $^{125}\text{I-ghr}$  a  $^{125}\text{I-[Dpr}^3\text{]ghr}$  k membránám buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a** Buňky byly inkubovány při 25 °C po 60 minut, ve vazebném pufru s rostoucí koncentrací  $^{125}\text{I-ghr}$  nebo  $^{125}\text{I-[Dpr}^3\text{]ghr}$  v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba)  $1 \times 10^{-5}$  M ghr nebo  $[\text{Dpr}^3\text{]ghr}$ . Specifická vazba  $B_{SB}$  byla vypočítána jako rozdíl celkové  $B_T$  a nespecifické vazby  $B_{NSB}$ . Křivky byly vyneseny pomocí nelineární regrese.

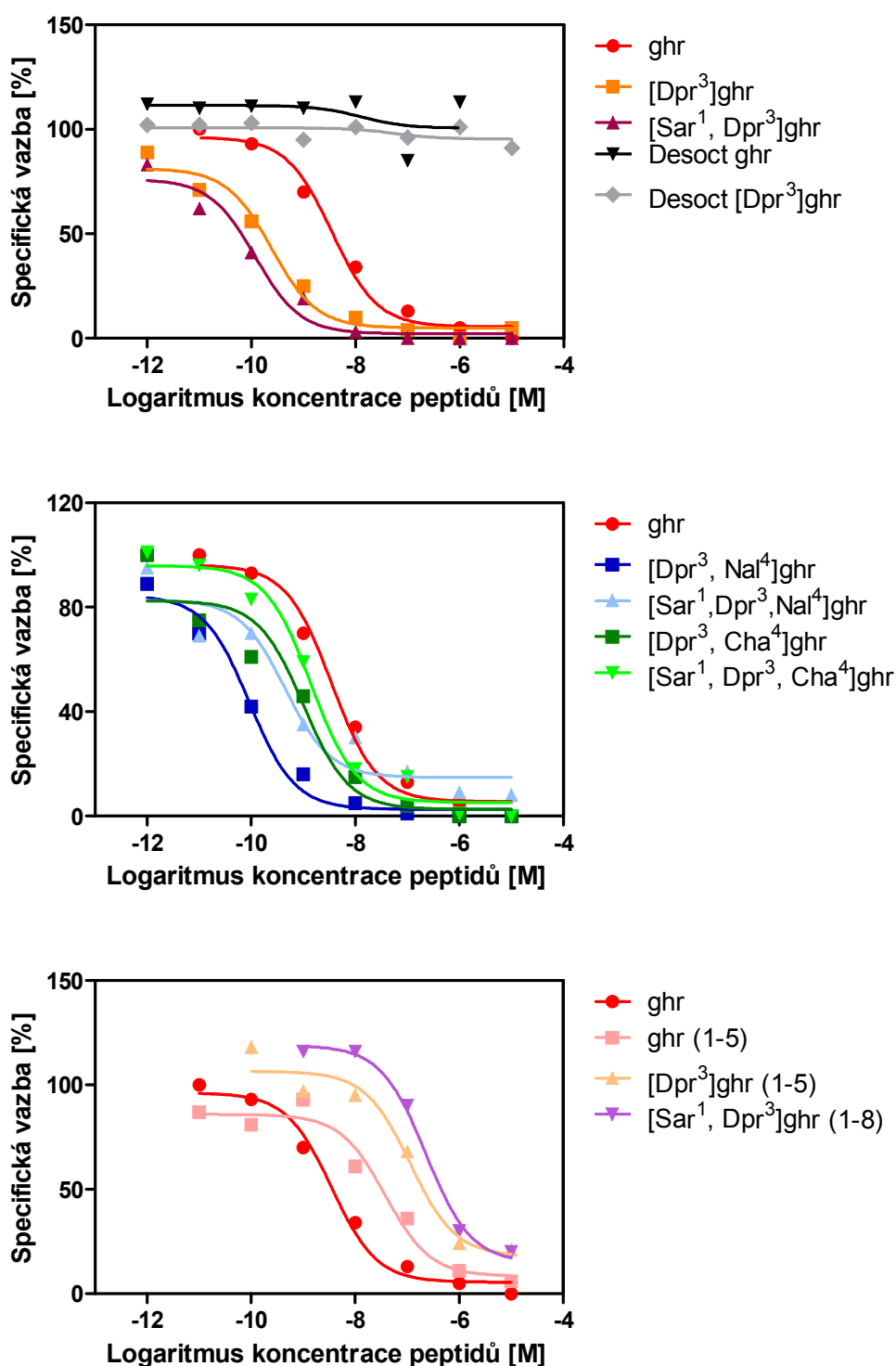
## 5.9. Kompetitivní vazebné experimenty na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a

### 5.9.1. Kompetitivní vazebné experimenty se $^{125}\text{I}$ -ghr

Kompetitivní vazebné experimenty na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a byly prováděny se  $^{125}\text{I}$ -ghr za optimalizovaných podmínek [53] – 10 ng/zkumavku, inkubace 45 minut, při pokojové teplotě a za stálého míchání.  $^{125}\text{I}$ -ghr byl vytěšňován vzrůstající koncentrací neznačených analogů ghrelinu. Typické vazebné křivky jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 15 na str. 53), kde jsou proti logaritmu koncentrace peptidu vynášeny procenta specifické vazby. Každý pokus byl prováděn v duplikátech a minimálně třikrát opakován. Pro stanovení nespecifické vazby byl použit ghr v koncentraci  $10^{-5}$  M.

Z grafu specifické vazby byla získána hodnota  $\text{IC}_{50}$  a pomocí hodnoty  $K_d$ , získané z předchozích saturačních experimentů na membránách LCC PK-1 buněk s transfektovaným receptorem GHS-R 1a (viz. kapitola 5.6.), byla vypočítána hodnota  $K_i$ , dle rovnice Chenga-Prusoffa [63]. Výsledné hodnoty  $K_i$  a  $\text{IC}_{50}$  přehledně shrnuje tabulka (Tab. 7 na str. 54).

Analogy s nekódovými aminokyselinami se vázaly na membrány LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a buněk s hodnotou  $K_i$  řádově  $10^{-9}$  M. Výrazně lepší vazbu vykazovaly analogy s naftylalaninem v pozici 4, které se vázaly s hodnotou  $K_i$   $10^{-10}$  M. N-koncové fragmenty peptidů (ghr(1-5),  $[\text{Dpr}^3]\text{ghr}(1-5)$ ,  $[\text{Sar}^1, \text{Dpr}^3]\text{ghr}(1-8)$ ) se vázaly s hodnotou  $K_i$  řádově  $10^{-6}$  M. Analogy bez oktanové skupiny (desoktanoyl ghr a desoktanoyl  $[\text{Dpr}]^3\text{ghr}$ ) vytěšňovaly  $^{125}\text{I}$ -ghr s hodnotou  $\text{IC}_{50}$  větší než  $10^{-5}$  M.



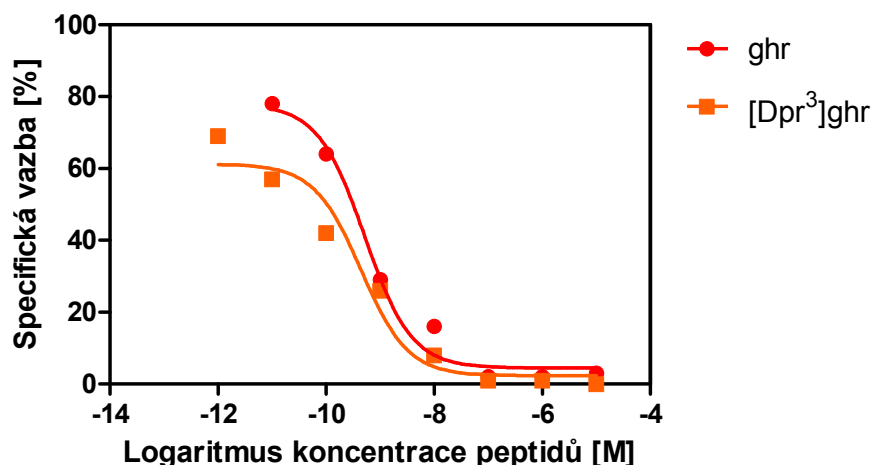
**Obr. 15 – Kompetitivní vazebné křivky  $^{125}\text{I}$ -ghr a analogů ghr na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a.  $^{125}\text{I}$ -ghr byl vytěšňován vzrůstající koncentrací neznačených peptidů. Reprezentativní křivky jsou vyneseny jako % specifické vazby  $^{125}\text{I}$ -ghr (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti ghr  $10^{-5}$  M) z vazby celkové v závislosti na koncentraci neznačených peptidů.**

**Tab. 7 – Konstanty  $IC_{50}$  a  $K_i$  určené kompetitivními experimenty z grafu specifické vazby  $^{125}I$ -ghr k membránám buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a.  $^{125}I$ -ghr byl vytěšňován vzrůstající koncentrací nezačtených peptidů. Hodnoty  $IC_{50}$  a  $K_i \pm SEM$  jsou průměrem minimálně ze tří experimentů a byly získány dosazením do rovnice Chenga-Prusoffa [63] ( $K_d = 0,44 \pm 0,22$  nM, určeno v kapitole 5.6.)**

Analog	$IC_{50}$ [M]	$K_i$ [M]
ghr	$(3,71 \pm 1,06) \times 10^{-9}$	$(3,67 \pm 1,05) \times 10^{-9}$
[Dpr <sup>3</sup> ]ghr	$(3,32 \pm 1,04) \times 10^{-9}$	$(3,28 \pm 1,03) \times 10^{-9}$
[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> ]ghr	$(2,58 \pm 1,66) \times 10^{-9}$	$(2,56 \pm 1,64) \times 10^{-9}$
[Dpr <sup>3</sup> , Nal <sup>4</sup> ]ghr	$(4,95 \pm 0,95) \times 10^{-10}$	$(4,89 \pm 0,94) \times 10^{-10}$
[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> , Nal <sup>4</sup> ]ghr	$(3,26 \pm 1,17) \times 10^{-10}$	$(3,22 \pm 1,15) \times 10^{-10}$
[Dpr <sup>3</sup> , Cha <sup>4</sup> ]ghr	$(1,69 \pm 0,32) \times 10^{-9}$	$(1,67 \pm 0,31) \times 10^{-9}$
[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> , Cha <sup>4</sup> ]ghr	$(2,73 \pm 1,44) \times 10^{-9}$	$(2,70 \pm 1,42) \times 10^{-9}$
ghr(1-5)	$(1,85 \pm 1,17) \times 10^{-6}$	$(1,83 \pm 1,16) \times 10^{-6}$
[Dpr <sup>3</sup> ]ghr(1-5)	$(1,95 \pm 0,65) \times 10^{-6}$	$(1,93 \pm 0,65) \times 10^{-6}$
[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> ]ghr (1-8)	$(3,28 \pm 1,70) \times 10^{-6}$	$(3,24 \pm 1,68) \times 10^{-6}$
[Nal <sup>3</sup> ]ghr(1-5)	$> 10^{-5}$	$> 10^{-5}$
desoktanoyl ghr	$> 10^{-5}$	$> 10^{-5}$
desoktanoyl [Dpr <sup>3</sup> ]ghr	$> 10^{-5}$	$> 10^{-5}$

### 5.9.2. Kompetitivní vazebné experimenty se $^{125}I$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr

Kompetitivní vazebné experimenty na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a byly prováděny se  $^{125}I$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr za stejných podmínek jako se  $^{125}I$ -ghr (viz kapitola 5.7.1.).  $^{125}I$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr byl vytěšňován vzrůstající koncentrací nezačtených peptidů ghr a [Dpr<sup>3</sup>]ghr. Typické vazebné křivky jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 16 na str. 55), kde jsou proti logaritmu koncentrace peptidu vynášena procenta specifické vazby z vazby celkové. Každý pokus byl prováděn v duplikátech a minimálně třikrát opakován.



**Obr. 16 – Kompetitivních vazebné křivky  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a.  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr byl vytěšňován vzrůstající koncentrací neznačených peptidů. Reprezentativní křivky jsou vyneseny jako % specifické vazby  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti [Dpr<sup>3</sup>]ghr  $10^{-5}$  M) z vazby celkové v závislosti na koncentraci neznačených peptidů.**

Z grafu specifické vazby byla získána hodnota  $\text{IC}_{50}$  a pomocí hodnoty  $K_d$ , získané z předchozích saturačních experimentů (viz. kapitola 5.6.) na membránách LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a buněk, byla vypočítána hodnota  $K_i$ . Výsledné hodnoty  $K_i$  a  $\text{IC}_{50}$  přehledně shrnuje tabulka (Tab. 8). Řádově se hodnoty shodují s výsledky získanými z kompetitivních experimentů se  $^{125}\text{I}$ -ghr.

**Tab. 8 – Konstanty  $\text{IC}_{50}$  a  $K_i$  určené kompetitivními experimenty z grafu specifické vazby  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr k membránám buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R 1a.  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr byl vytěšňován vzrůstající koncentrací neznačených peptidů. Hodnoty  $\text{IC}_{50}$  a  $K_i \pm \text{SEM}$  jsou průměrem minimálně ze tří experimentů a byly získány dosazením do rovnice Chenga-Prusoffa [63] ( $K_d = 0,79 \pm 0,4$  nM, určeno v kapitole 5.6.**

Analog	$\text{IC}_{50}$ [M]	$K_i$ [M]
ghr	$(9,65 \pm 7,95) \times 10^{-9}$	$(8,55 \pm 7,04) \times 10^{-9}$
[Dpr <sup>3</sup> ]ghr	$(1,87 \pm 0,74) \times 10^{-9}$	$(1,66 \pm 0,66) \times 10^{-9}$

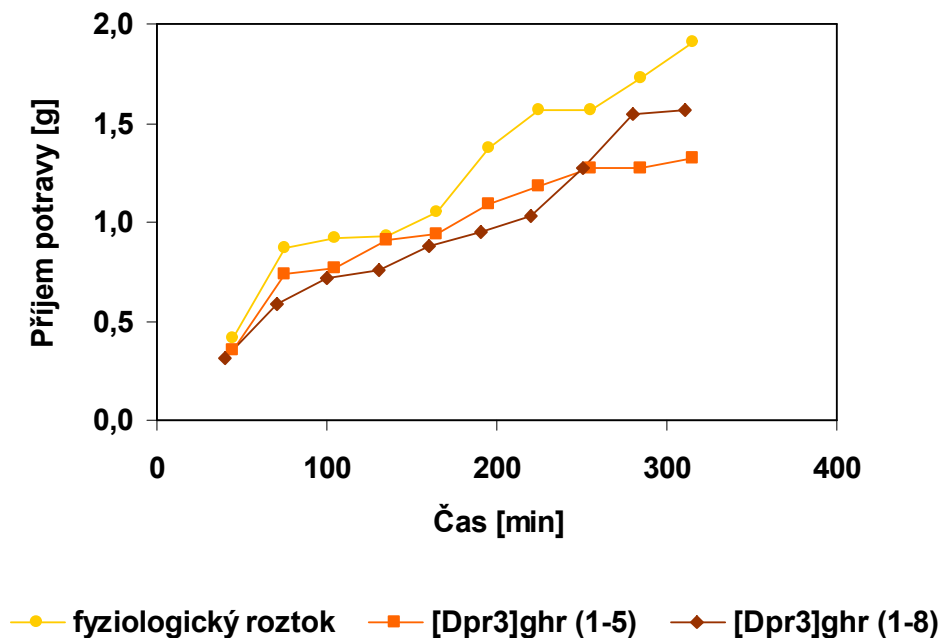
## 5.10. Vliv analogů ghr na příjem potravy u myši

### 5.10.1. Testování analogů ghrelinu na potenciální anorexigenní aktivitu

Kumulativní příjem potravy po SC podání látek byl sledován u hladových (17 hodin hladovění) myších samců kmene C57 v 30-ti minutových intervalech po dobu 5-6 hodin. Hodnoty příjmu potravy po aplikaci analogů v dávce 10 mg/kg byly zpracovány jako závislost příjmu potravy (g) na čase, jak ukazují grafy (Obr.17 a, b, c, d na str. 56-58).

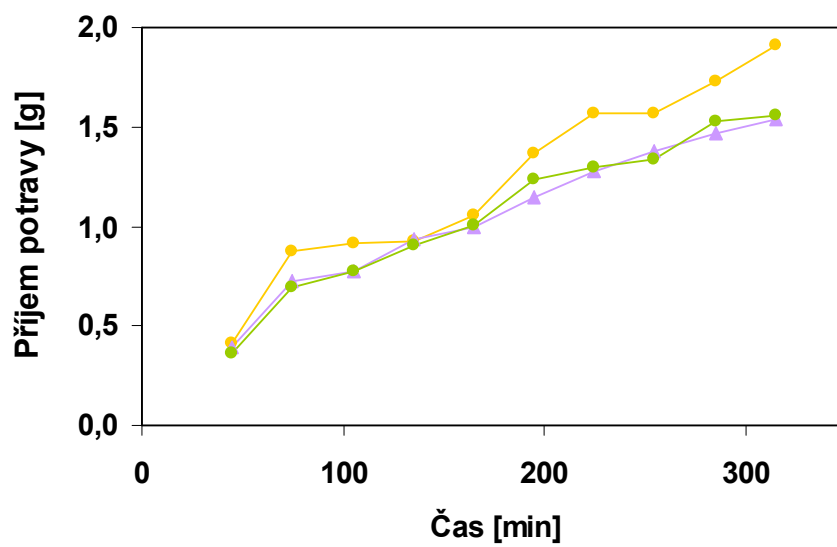
Analogy [Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-5) a [Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-8) snižovaly příjem potravy oproti zvířatům, kterým byl injektován pouze fyziologický roztok, ovšem jejich působení nebylo signifikantní (Obr. 17a). Po podání analogů [Trp<sup>3</sup>]ghr (1-5) a [Nal<sup>3</sup>]ghr (1-5) bylo dosaženo velmi malého snížení potravy oproti zvířatům, kterým byl injektován pouze fyziologický roztok, jejich působení také nebylo signifikantní (Obr. 17b). Analogy [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-5), [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-8), [Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr a [Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr neměly žádný vliv na příjem potravy (Obr. 17c a 17d).

a)



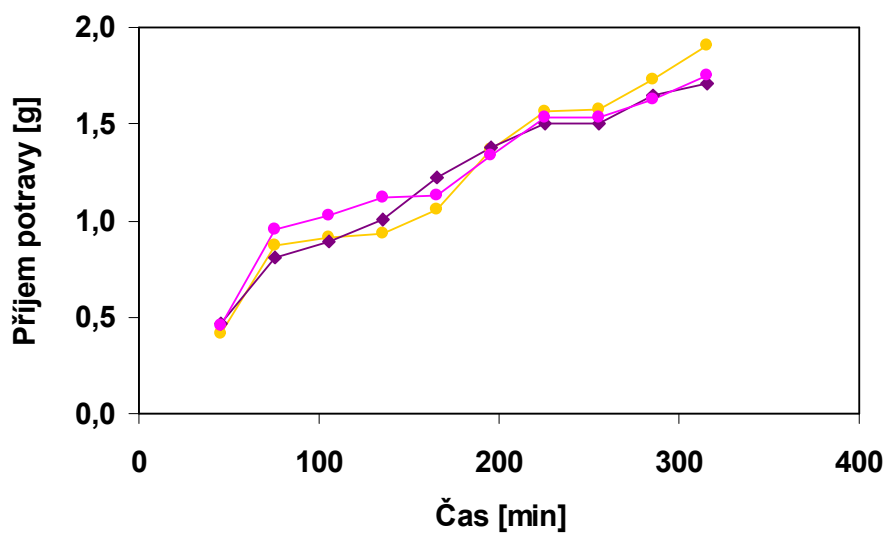


b)



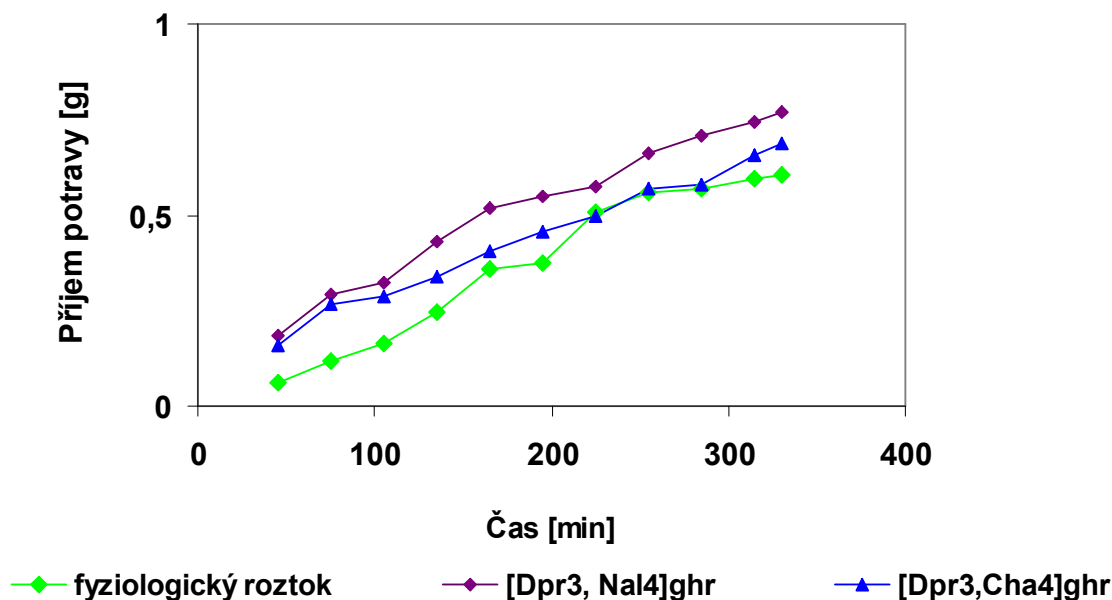
—●— fyziologický roztok      —▲— [Nal3]ghr (1-5)      —●— [Trp3]ghr (1-5)

c)



—●— fyziologický roztok      —◆— [Sar1, Dpr3]ghr (1-5)      —●— [Sar1, Dpr3]ghr (1-8)

d)



*Obr. 17 – Kumulativní příjem potravy u hladových myších samců C57. Látky byly myším podány SC v dávce 10 mg/kg, n=5-6 myši na skupinu.*

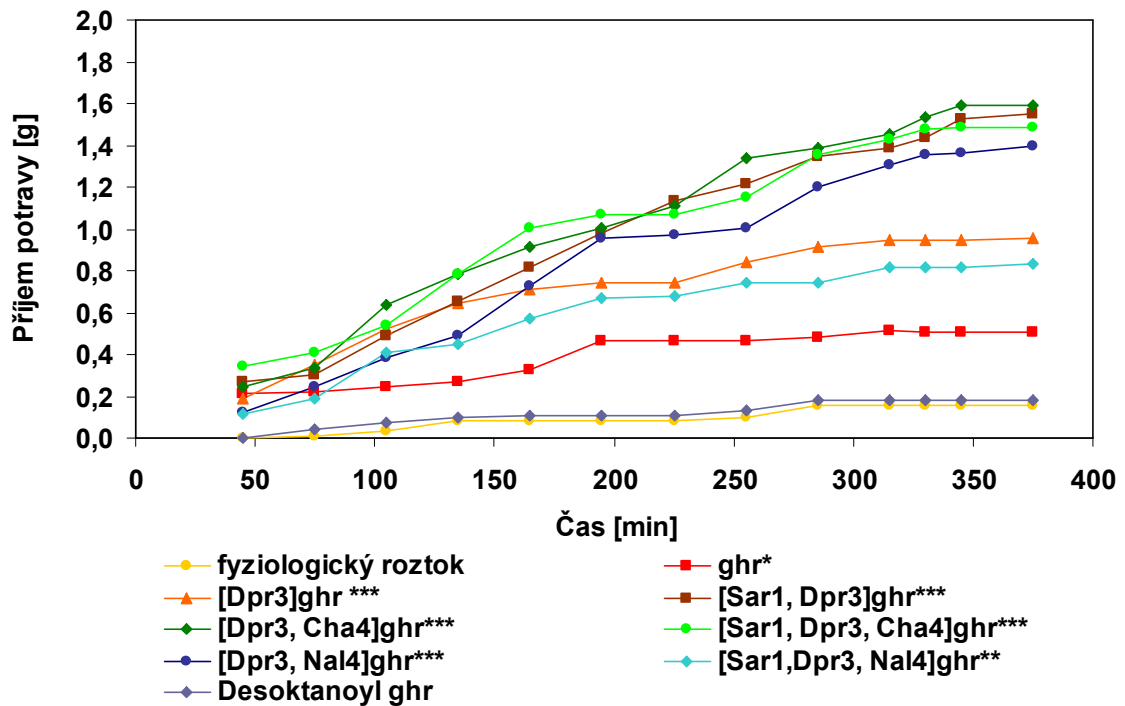
### 5.10.2. Testování analogů ghrelinu na potenciální orexigenní aktivitu

Kumulativní příjem potravy po SC podání látek byl sledován u sytých myších samců kmene C57 v 30-ti minutových intervalech po dobu 6-8 hodin v dávkách 0,1 – 10 mg/kg. Hodnoty příjmu potravy po aplikaci analogů v dávce 5mg/kg byly zpracovány jako závislost příjmu potravy (g) na čase, jak ukazuje graf (Obr. 18 na str. 59). Všechny testované, tj. dlouhé analogy ghr a [Dpr<sup>3</sup>]ghr a jeho analogy zvyšovaly příjem potravy oproti zvířatům, kterým byl injektován pouze fyziologický roztok, analogy ghrelinu tedy působily agonisticky, měly orexigenní účinek. Zkrácené analogy ghr, tj. [Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-5), [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-5) a [Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-8) a analogy bez oktanové kyseliny neměly vliv na příjem potravy po podání sytým myším.

Zvýšení příjmu potravy po podání ghrelinu i jeho analogů bylo signifikantní. Podání [Dpr<sup>3</sup>]ghr mělo za účinek výraznější zvýšení příjmu potravy oproti podání fyziologického roztoku než ghrelin. Silnější orexigenní účinek než [Dpr<sup>3</sup>]ghr měly analogy [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>]ghr a

[Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr. Nejvyššího zvýšení příjmu potravy bylo dosaženo po podání [Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr a [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr. Analog [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr měl nižší orexigenní účinek než [Dpr<sup>3</sup>]ghr, jeho působení však bylo signifikantní.

Orexigenní působení po podání všech látek bylo dlouhodobé, trvalo déle než 7 hodin. Maximálního účinku bylo u ghr, [Dpr<sup>3</sup>]ghr a [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr dosaženo po 250 minutách od podání, u ostatních analogů po 350 minutách od podání (Obr. 18).

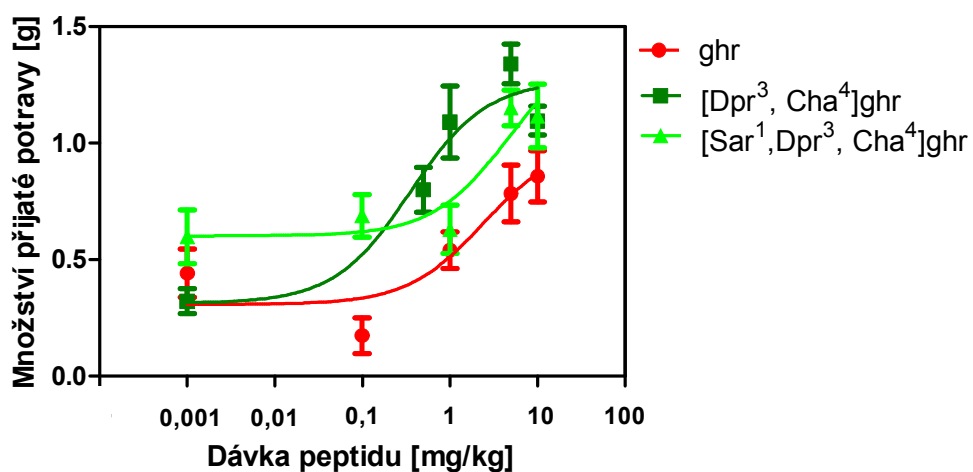
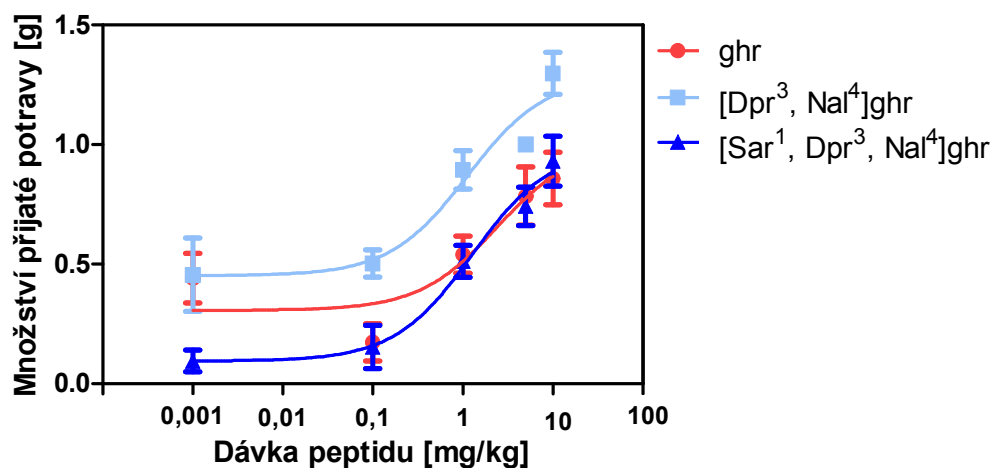
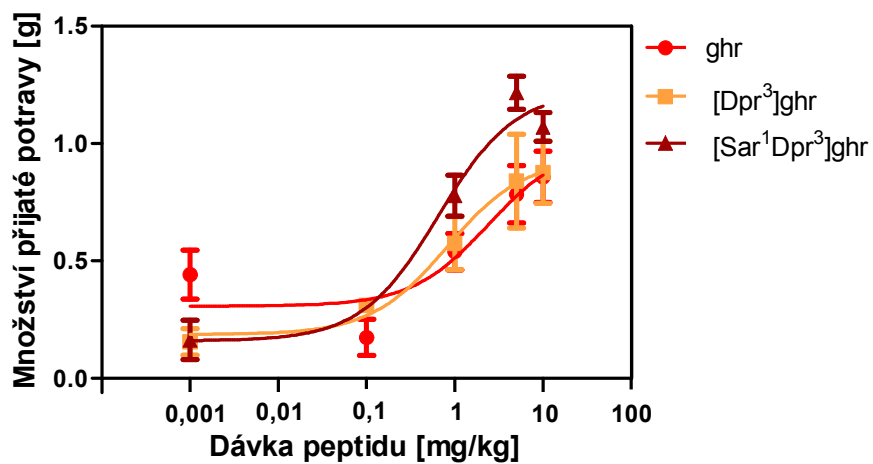


**Obr. 18 – Kumulativní příjem potravy u sytých myších samců C57. Látky byly myším podány SC v dávce 5 mg/kg, desoktanoyl ghr v dávce 10 mg/kg. n=5-6 myši na skupinu. Signifikance (vůči podání fyziologického roztoku) \*\*\* je  $P < 0,001$ , \*\* je  $P < 0,01$  \* je  $P < 0,05$ .**

Dále byla zpracována závislost příjmu potravy na podané dávce analogů. Pro výpočet poloviční efektivní koncentrace - EC<sub>50</sub> byly použity hodnoty příjmu potravy po 250 minutách (maximální efekt) od podání analogů v dávce 0,1; 0,5; 1; 5 a 10 mg/kg. Hodnoty EC<sub>50</sub> (mg/kg) shrnuje tabulka (Tab. 9 na str. 60). Výsledné křivky příjmu potravy v závislosti na dávce analogu jsou na obrázku (Obr. 19 na str. 61), byly spočítány nelineární regresí.

**Tab. 9 – Hodnoty  $EC_{50}$  (mg/kg).** Pro získání  $EC_{50} \pm SEM$  byly použity hodnoty příjmu potravy po 250 minutách od SC podání látek v dávkách 0,1; 0,5; 1; 5 a 10 mg/kg.  $n=5$  myši na skupinu.

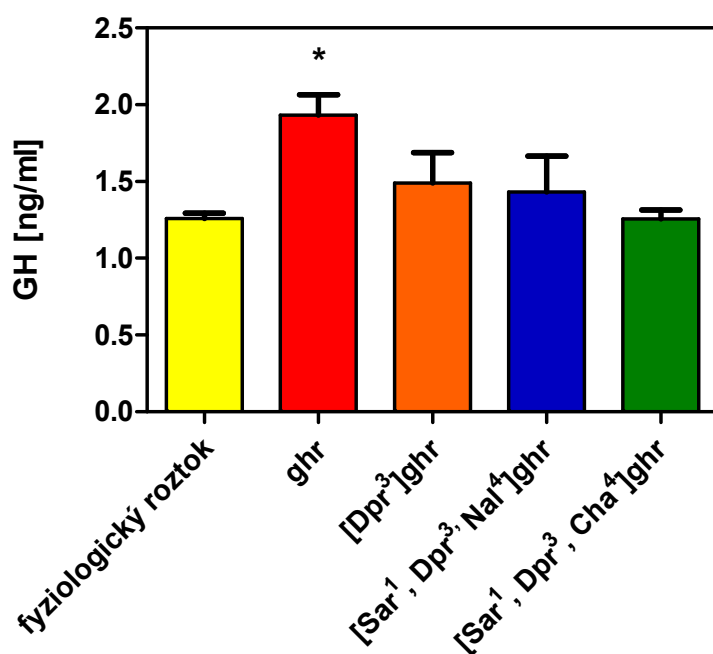
<b>Analog</b>	<b><math>EC_{50}</math> [mg/kg]</b>
ghr	$2,39 \pm 1,07$
[Dpr <sup>3</sup> ]ghr	$0,82 \pm 0,37$
[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> ]ghr	$0,65 \pm 0,29$
[Dpr <sup>3</sup> , Nal <sup>4</sup> ]ghr	$1,13 \pm 0,51$
[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> , Nal <sup>4</sup> ]ghr	$1,27 \pm 0,57$
[Dpr <sup>3</sup> , Cha <sup>4</sup> ]ghr	$0,35 \pm 0,16$
[Sar <sup>1</sup> , Dpr <sup>3</sup> , Cha <sup>4</sup> ]ghr	$4,63 \pm 2,07$



**Obr. 19 – Křivky závislosti účinku na dávce podané látky.** Látky byly podávány SC v dávce 0,1; 0,5; 1; 5 a 10 mg/kg. Byly použity hodnoty množství přijaté potravy (g) po 250 minutách od podání látek. n=5 myši na skupinu.

### 5.11. Stanovení koncentrace růstového hormonu v plasmě

Testované látky byly myším SC injektovány v dáce 3 mg/kg, po 5 minutách od aplikace látek byla zvířata usmrcena a byla získána plasma. Koncentrace růstového hormonu (GH) byla v plasmě stanovena metodou RIA. Zvýšená koncentrace GH (oproti hladině po podání fyziologického roztoku) byla stanovena po aplikaci všech látek, nicméně signifikantního zvýšení koncentrace bylo dosaženo pouze po podání ghrelinu (3mg/kg), podáním ostatních analogů ghr bylo dosaženo nesignifikantně zvýšeného uvolnění GH (oproti uvolnění po podání fyziologického roztoku). Výsledné hodnoty plasmatické koncentrace GH jsou zobrazeny v grafu (Obr. 20).



Obr. 20 – Plasmatické koncentrace růstového hormonu [ng/ml].  $n=5-7$  myší na skupinu, signifikance (vůči hodnotě po podání fyziologického roztoku) \* je  $P<0,05$ .

## 6. Diskuze

Ghrelin je doposud jediný známý peptid zvyšující příjem vytvářený periferními tkáněmi potravy a působící periferně i v CNS. Objev ghrelinu v roce 1999 [18] byl velmi významný: stejně jako objev leptinu v roce 1994 [64], i tento objev vedl k velkému nárůstu studií zabývajících se regulací příjmu potravy a následně novým poznatkům, které by mohly vést jak k léčbě obezity (použití antagonistů ghr), tak nemocí spojených s nechutenstvím, malnutricí a kachexií (agonisté ghrelinu). Jednou z velkých výhod ghrelinu a jeho analogů je možnost podávat ghrelin a jeho analogy periferně, ačkoliv přesný mechanismus působení ghrelinu v CNS zatím není znám. Nepeptidové analogy pak přinášejí možnost perorální aplikace, protože jsou odolné proti proteolytické degradaci.

### 6.1. Analogy ghrelinu

Struktura analogů ghrelinu v naší studii byla navržena na základě poznatků ze strukturně aktivních studií [33, 34, 40]. Pro vazbu ghrelinu (či jeho syntetického analogu) k receptoru je nutná přítomnost oktanové kyseliny vázané k serinu v pozici 3. V přirozeně se vyskytujícím ghrelinu je oktanoyl vázan nestabilní esterovou vazbou. Výsledkem studie zabývajících se degradací ghrelinu *in vitro* v homogenátech různých tkání bylo zjištění, že nejčastěji dochází k odštěpování oktanové kyseliny od peptidového řetězce [41]. Např. v krvi cirkuluje velké množství 90% ghrelinu v desoktanoyl formě a jen 10% v acylované formě [4]. Přesný fyziologický význam desoktanoyl ghrelinu stále není znám. Stejně tak i v naší předchozí studii bylo hmotnostní spektroskopii prokázáno, že při vazebných studiích dochází během inkubace ghrelinu s hypofyzárními buněčnými liniemi z velké části k odštěpování oktanoylu [44]. Proto byl jako základní syntetický analog ghrelinu v naší studii navržen peptid [Dpr<sup>3</sup>]ghr, který má serin v pozici 3 zaměněn za diaminopropionovou kyselinu (Dpr), ke které je oktanoyl vázán stabilnější amidovou vazbou. Ze strukturně aktivních studií je známo, že záměna esterové vazby za amidovou nevede ke ztrátě biologické aktivity [33]. Dále je z těchto studií známo, že minimální sekvence zachovávající si biologickou aktivitu je N-koncový tetrapeptid [34]. Výše zmiňovaná studie zabývajících se degradací ghrelinu *in vitro* bylo zjištěno, že ke štěpení peptidu ghrelinu dochází právě mezi prvními pěti N-koncovými aminokyselinami (mezi Ser<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>, Ser<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>, Phe<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>) [41]. Naše syntetické analogy ghrelinu proto obsahují v molekule (na N-konci) ještě další nekódové aminokyseliny (kromě Dpr) – pro zvýšení stability peptidu a prodloužení účinku analogu. Pro biologickou aktivitu je

významný fenylalanin v pozici 4 [40], který byl u našich analogů nahrazen nekódovými aminokyselinami naftylalaninem (Nal) nebo cyklohexylalaninem (Cha). Dále je pro zachování biologické aktivity důležitá volná NH<sub>2</sub> skupina na N-konci, acetylace či deaminace N-koncové aminokyseliny vedla ke ztrátě biologické aktivity [33]. Několik analogů v naší studii má v pozici 1 místo glycinu sarkosin. Sarkosin (methylglycin), který má volnou NH<sub>2</sub> skupinu a je odolnější vůči degradaci aminopeptidásami, než glycin.

Byly připraveny také kratší N-koncové fragmenty ghrelinu a jeho analogů a ghrelin a [Dpr<sup>3</sup>]ghr bez oktanové skupiny, abychom zhodnotili význam oktanoylace a délky řetězce u nových analogů [Dpr<sup>3</sup>]ghr.

## 6.2. *In vitro* experimenty

Je známo, že hypofýza obsahuje velké množství receptorů GHS-R1a [17], a proto pro vazebné studie ghrelinu a jeho analogů byly vybrány hypofyzární buněčné linie RC-4B/C, AtT-20 a GH3. V literatuře byly publikovány výsledky ukazující přítomnost receptoru GHS-R1a u linie RC-4B/C a GH3 [57, 60]. U linie AtT-20 se jeho výskyt předpokládá nejen díky hypofyzárnímu původu, ale i díky prokázané produkci ACTH [58], na jehož sekreci má ghrelin vliv [23]. V naší studii byla metodou Western blot pomocí specifické primární protilátky prokázána přítomnost receptoru pro ghrelin (GHS-R) ve všech námi používaných liniích.

Aby bylo možno u saturačních vazebných experimentů z křivky závislosti specifické vazby na koncentraci radioligandu určit počet receptorů B<sub>max</sub> a hodnotu rovnovážné disociační konstanty K<sub>d</sub> (vypovídající o afinitě radioligandu), je základním předpokladem dosažení rovnováhy mezi asociací ligandu a receptoru a disociací komplexu ligand-receptor [62]. 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. Optimalizace vazebných podmínek byla provedena dřívějšími experimenty [44] a za takto optimalizovaných podmínek (60 minut při 25 °C, složení vazebného pufru viz metody) byly prováděny saturační vazebné experimenty se <sup>125</sup>I-ghr a <sup>125</sup>I-[Dpr<sup>3</sup>]ghr.

Při saturačních experimentech se <sup>125</sup>I-ghr na hypofyzárních liniích jsme se potýkali s příliš vysokou nespecifickou vazbou, která se pohybovala mezi 40-50% z celkové vazby. Tento fakt si vysvětlujeme především degradací ghrelinu během inkubace, a to zejména odštěpováním oktanové skupiny od peptidového řetězce. Saturačními vazebnými pokusy se <sup>125</sup>I-[Dpr<sup>3</sup>]ghr bylo dosaženo snížení nespecifické vazby k hypofyzárním liniím, nespecifická



vazba  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr činila přibližně 30 % z celkové vazby. Navázáním oktanové skupiny amidovou vazbou na peptidový řetězec se tak tedy podařilo částečně snížit nespecifickou vazbu, což je zřejmě z důvodu nižší degradace  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr, nicméně 30% nespecifická vazba je stále příliš vysoká. Zřejmě tedy důvodem vysoké nespecifické vazby  $^{125}\text{I}$ -ghr a  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr není jen odštěpování oktanové skupiny, ale i štěpení peptidů v jiných částech molekuly. V další sérii experimentů byly do vazebního pufru za účelem snížení nespecifické vazby přidávány inhibitory proteas a esterasy – PMSF, BNPP a EDTA, či jejich kombinace. Přídavkem žádné z těchto látek nebylo dosaženo nižší nespecifické vazby radioligandů k hypofyzárním buněčným liniím.

Výsledné hodnoty  $K_d$  pro vazbu  $^{125}\text{I}$ -ghr i  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr ke všem používaným hypofyzárním liniím jsou v nanomolární oblasti, počty vazebních míst  $B_{\max}$  pro  $^{125}\text{I}$ -ghr i  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr jsou přibližně deset tisíc vazebních míst na buňkách linií RC-4B/C a GH3 a přibližně tisíce vazebních míst na buňkách linie AtT-20.

Bylo popsáno, že ghrelin stimuluje fosforylaci MAPK/ERK1/2 v buňkách GH3 [60]. V naší studii se metodou Western blot pomocí specifické primární protilátky nepodařilo prokázat zvýšenou fosforylaci MAPK/ERK1/2 v buňkách GH3 oproti kontrole po působení ghrelu a [Dpr<sup>3</sup>]ghr, přičemž byla pozorována zvýšená fosforylace MAPK/ERK1/2 oproti kontrole po působení PMA a TRH jako standardních látek působících na buňky GH3. U ghr a [Dpr<sup>3</sup>]ghr docházelo patrně k rychlé degradaci peptidů.

Cílem našich vazebních experimentů s hypofyzárními liniemi bylo vytvoření optimálního systému pro určování afinity analogů ghrelu. Afinitu jednotlivých analogů lze určit kompetitivními vazebními experimenty. Ty je ošem možné provádět pouze, pokud nespecifická vazba radioligandu v daném systému nečiní více 20% z celkové vazby [62]. Tento požadavek v našem systému splněn nebyl a proto lze říci, že námi používané hypofyzární buněčné linie nejsou vhodné pro určování afinity analogů ghrelu kompetitivními vazebními experimenty. Toto naše zjištění je v souladu se skutečností, že většina *in vitro* experimentů s ligandy receptoru GHS-R1a je prováděna na buňkách s transfektovaným receptorem GHS-R1a. Naší laboratoři se podařilo získat v rámci spolupráce od Prof. Martineze (CNRS – Faculté Pharmacie, Montpellier, Francie) membrány buněk LCC PK-1 s transfektovaným lidským receptorem GHS-R1a. S použitím těchto membrán byly naměřeny saturační i kompetitivní vazebné experimenty se  $^{125}\text{I}$ -ghr a  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr, které probíhaly za podmínek optimalizovaných skupinou Prof. Martineze (viz metody).

Saturačními experimenty byly získány hodnoty rovnovážné disociační konstanty  $K_d$  –

pro  $^{125}\text{I}$ -ghr  $0,44\pm 0,12$  nM a pro  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr  $0,79\pm 0,28$  nM. Nespecifická vazba  $^{125}\text{I}$ -ghr k membránám buněk LCC PK-1 s transfektovaným receptorem GHS-R1a byla vyšší, než nespecifická vazba  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr, nečinila však více než 20% z celkové vazby a proto bylo možno v tomto systému naměřit afinitu jednotlivých ghrelinových analogů pomocí kompetitivních experimentů.

Při kompetitivních vazebných experimentech s membránami LCC PK-1 buněk s transfektovaným receptorem GHS-R 1a byl  $^{125}\text{I}$ -ghr vytěšňován vzrůstající koncentrací neznámených peptidů. Z grafu byla získána hodnota poloviční inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> (koncentrace kompetitoru, kterou je z vazebných míst vytěšněna polovina radioligandu) a pomocí této konstanty a K<sub>d</sub> ze saturačních experimentů byla pro jednotlivé analogy vypočtena rovnicí Chenga-Prusoffa hodnota K<sub>i</sub>, která vyjadřuje rovnovážnou disociační konstantu pro neznámený ligand. Tato hodnota má význam koncentrace neznámeného ligandu, která se v rovnováze váže na polovinu vazebných míst v nepřítomnosti radioligandu. K<sub>i</sub> pro ghrelin, [Dpr<sup>3</sup>]ghr, [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>]ghr, [Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr a [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr jsou řádově srovnatelné – 10<sup>-9</sup> M. Výrazně silněji byl  $^{125}\text{I}$ -ghr vytěšňován analogy [Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr a [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr, tyto analogy se vázaly s hodnotou K<sub>i</sub> 10<sup>-10</sup> M, mají tedy vyšší afinitu k receptoru GHS-R1a než samotný ghrelin či [Dpr<sup>3</sup>]ghr. Naopak výrazně slaběji byl  $^{125}\text{I}$ -ghr vytěšňován kratšími N-koncovými fragmenty ghrelinu - ghr (1-5), [Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-5) a [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-8), které se vázaly s hodnotou K<sub>i</sub> 10<sup>-6</sup> M. Je známo, že zkrácení ghrelinu od C-konce snižuje afinitu, ale aktivita takových analogů zůstává částečně zachována [34]. Nás zajímaly kratší N-koncové fragmenty (1-5 a 1-8) a vliv modifikace v podobě aminokyselin Dpr<sup>3</sup> a Sar<sup>1</sup>. Všechny tyto analogy vykazovaly nízkou afinitu ke GHS-R 1a. Nejslabšími kompetitory byly analogy ghrelinu, které nemají v molekule oktanovou skupinu, vázaly se s hodnotou K<sub>i</sub> > 10<sup>-5</sup> M. Potvrdili jsme tak ztrátu afinity desoktanoyl analogů ke GHS-R [33, 34]. Receptor pro desoktanoyl ghrelin zatím není znám, přesná funkce desoktanoyl ghrelinu v organismu také ne [13].

Výsledné hodnoty K<sub>i</sub> pro ghrelin jsou řádově srovnatelné s literaturou. Výsledky vypovídající o afinitě ghrelinových analogů jsou v souladu se strukturně aktivními studiemi: N-koncové fragmenty jsou schopné se vázat na receptor GHS-R1a, ovšem mají nižší afinitu než analogy obsahující stejný počet aminokyselin jako přirozeně se vyskytující ghrelin. Analogy bez oktanové skupiny ztrácejí schopnost vázat se na receptor pro ghrelin. Vnesením nekódových aminokyselin na N-konec molekuly peptidů nebyla snížena afinita takových analogů k receptoru GHS-R1a, právě naopak, tyto analogy vykazovaly vyšší afinitu, což je zřejmě způsobeno především nižší degradací těchto analogů. Nejefektivnější se ukázalo

zabudování aminokyseliny Nal do pozice 4.

Dále byly prováděny kompetitivní experimenty na membránám buněk LCC PK-1 s transfektovaným lidským receptorem GHS-R1a, při kterých byl ghrelinem a [Dpr<sup>3</sup>]ghr vytěšňován <sup>125</sup>I-[Dpr<sup>3</sup>]ghr. Výsledné hodnoty K<sub>i</sub> pro ghrelin i [Dpr<sup>3</sup>]ghr jsou řádově srovnatelné s hodnotami pro tyto peptidy získané vytěšňováním <sup>125</sup>I-ghr.

### 6.3. *In vivo* experimenty

Z vazebných pokusů nevyplývalo, zda analogy ghrelinu schopné vazby na receptor GHS-R 1a budou mít agonistický (orexigenní) či antagonistický (anorexigenní) účinek. Anorexigenní aktivita analogů ghrelinu byla testována po subkutánní aplikaci látek hladovým (17 hodin) myším samcům kmene C57. Analogy [Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr a [Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr, kratší N-koncové fragmenty [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-5), [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-8) a ani kratší N-koncové fragmenty bez oktanové skupiny – [Nal<sup>3</sup>]ghr (1-5), [Trp<sup>3</sup>]ghr (1-5) nesnižovaly příjem potravy oproti kontrolním zvířatům. Aplikace analogů [Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-5) a [Dpr<sup>3</sup>]ghr (1-8) vedla k mírnému snížení příjmu potravy oproti kontrolním zvířatům, jejich působení však nebylo signifikantní, i přesto, že byly aplikovány ve vysoké dávce 10 mg/kg. Lze tedy říci, že žádný z testovaných analogů nemá anorexigenní účinek, nejsou antagonisty ghrelinu.

Orexigenní aktivita byla testována po subkutánní aplikaci látek sytým myším samcům kmene C57. Všechny testované analogy ghrelinu (v dávce 5 mg/kg) signifikantně zvyšovaly příjem potravy oproti kontrolním zvířatům, vyjma desoktanoyl ghrelinu (v dávce 10 mg/kg), který neměl žádný vliv na příjem potravy. Nejnižšího orexigenního efektu bylo dosaženo po podání ghrelinu, nicméně i toto zvýšení příjmu potravy bylo signifikantní vůči kontrole. Silnější orexigenní efekt než ghrelin měl [Dpr<sup>3</sup>]ghr a [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr a ještě výraznějšího zvýšení příjmu potravy bylo dosaženo po podání [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>]ghr, [Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr, [Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr a [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr. Můžeme tedy říci, že všechny analogy, u kterých byla testována orexigenní aktivita, jsou agonisty ghrelinu, jejich působení je dlouhodobější a orexigenní efekt silnější.

Výsledky našich experimentů ukazují, že analogy ghrelinu bez oktanové skupiny nemají vliv na příjem potravy: desoktanoyl ghrelin nezvyšoval příjem potravy u sytých myší a analogy [Nal<sup>3</sup>]ghr (1-5) a [Trp<sup>3</sup>]ghr (1-5) neovlivnily příjem potravy u hladových myší. Stejně tak je i v literatuře popsáno několik studií [13, 22], ve kterých desoktanoyl ghrelin neměl vliv na příjem potravy. Nicméně publikované výsledky testů příjmu potravy po podání desoktanoyl ghrelinu jsou sporné. Řada studií popisuje anorexigenní působení desoktanoyl

ghrelinu, několik studií popisuje orexigenní efekt [13, 22]. Závěrem našich studií je, že všechny analogy ghrelinu bez oktanové skupiny neovlivňovaly příjem potravy.

Podobně jako desoktanoyl analogy ghrelinu, ani kratší (1-5 a 1-8) N-koncové analogy nemají vliv na příjem potravy. Výsledky týkající se ovlivnění příjmu potravy po podání takových analogů nebyly zatím publikovány. Byla však provedena farmakokinetická studie s N-koncových fragmentem ghrelinu (1-7), která ukazuje, že pro zachování biologické aktivity *in vivo* i *in vitro* je důležitý C-konec peptidu [36].

Maximální orexigenní účinek u ghr a [Dpr<sup>3</sup>]ghr byl pozorován po 250 minutách od aplikace analogů, u analogů s nekódovými aminokyselinami po 350 minutách od podání. Tyto výsledky dokazují, že vnesení nekódových aminokyselin do molekuly peptidu vede k prodloužení účinku. Pro výpočet poloviční efektivní koncentrace EC<sub>50</sub> byly použity hodnoty příjmu potravy po 250 minutách od aplikace analogů v dávce 0,1; 0,5; 1; 5 a 10 mg/kg. Hodnoty EC<sub>50</sub> se pohybují od desetin mg/kg po mg/kg. Ghrelin působí orexigenně s hodnotou EC<sub>50</sub> 2,39±1,07 mg/kg, zatímco hodnota EC<sub>50</sub> [Dpr<sup>3</sup>]ghr je o řád nižší – 0,82±0,37 mg/kg. Nejnížší hodnoty EC<sub>50</sub> mají analogy [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>]ghr – 0,65±0,29 mg/kg a analog [Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr – 0,35±0,16 mg/kg. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky *in vitro* experimentů. Vnesením nekódových aminokyselin do molekuly peptidu je dosaženo výraznějšího efektu takového peptidu, což je nejspíše způsobeno sníženou degradací analogů, která vede k zesílení a prodloužení účinků těchto analogů.

Další významnou fyziologickou funkcí ghrelinu je jeho schopnost stimulovat sekreci GH [23] a proto byla *in vivo* testována schopnost analogů ghr, [Dpr<sup>3</sup>]ghr, [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr a [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr po subkutánním podání zvyšovat uvolňování GH. Všechny testované analogy zvyšovaly uvolňování GH oproti kontrolním zvířatům, nicméně signifikantního zvýšení bylo dosaženo pouze po podání ghrelinu. Důvodem, proč analogy [Dpr<sup>3</sup>]ghr, [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Nal<sup>4</sup>]ghr a [Sar<sup>1</sup>, Dpr<sup>3</sup>, Cha<sup>4</sup>]ghr nezvyšovaly uvolňování GH signifikantně, může být pravděpodobně také stáří myši (3 měsíce). Běžně se uvolňování GH testuje na mladších zvířatech. V těchto studiích se vylučoval GH po periferním působení ghrelinem jak u potkanů, tak u myši či u lidí [65]. V naší studii byla ovšem použita zvířata přibližně stejného stáří, jaká byla použita na testy příjmu potravy. Můžeme tedy shrnout, že u dospělých myši působí námi používané analogy ghrelinu specificky orexigenně, GH tyto analogy zvyšují jen mírně.

Naše výsledky vedou k závěru, že syntetické analogy ghrelinu (dlouhé formy) testované v naší studii jsou agonisty ghrelinu. Struktura těchto analogů je založena na stabilizaci k peptidu navázané oktanové skupiny, která je důležitá pro biologickou aktivitu,

tedy vazbu na receptor. Oktanová skupina je vázána amidovou vazbou místo esterové vazby, kterou je připojena v přirozeně se vyskytujícím ghrelinu. Tyto analogy (stabilizované ještě vnesením dalším nekódových aminokyselin do molekuly) mají v experimentech *in vitro* vyšší afinitu k receptoru GHS-R1a a v experimentech *in vivo* vykazují prodloužený účinek a silnější orexigenní efekt než ghrelin.

Nejvyšším přínosem této studie jsou dlouhé analogy [Dpr<sup>3</sup>]ghr – agonisté, jejichž vysoká orexigenní aktivita a prodloužený účinek bychom v budoucnu rádi využili v dalších studiích *in vivo*. Budeme se snažit zmapovat účinek těchto analogů v hypothalamu sledováním aktivace proteinu Fos (odráží neuronální aktivitu po účincích látek v CNS) a pomocí imunohistochemie také chceme sledovat buněčnou signalizaci pomocí fosforylace AMPK (adenosin monofosfát protein kinas) metodou Western blot.

V dlouhodobém *in vivo* pokusu budou analogy [Dpr<sup>3</sup>]ghr testovány v modelu kachexie u myši – artritidy indukované kolagenem. Zde by dlouhodobě působící analogy [Dpr<sup>3</sup>]ghr měly působit jak proti kachexii a podvýživě, tak by měly také působit protizánětlivě [15].

Tyto analogy by tedy v budoucnu mohly být použity jako potenciální léčiva při podvýživě a úbytku svalové hmoty u pacientů s nádorovými onemocněními, artritidou, nebo některými ledvinovými a kardiovaskulárními onemocněními.

## 7. Závěr

- 1) V naší studii používané hypofyzární buněčné linie RC-4B/C, AtT-20 a GH3 nejsou vhodné pro stanovení afinity ghrelinových analogů. Přestože v těchto liniích byla prokázána přítomnost receptoru GHS-R 1a (ověřeno pomocí metodou Western blot pomocí specifické primární protilátky), při saturačních vazebných experimentech se  $^{125}\text{I}$ -ghr a  $^{125}\text{I}$ -[Dpr<sup>3</sup>]ghr vázaly s příliš vysokou nescifickou vazbou.
- 2) Kompetitivními vazebnými experimenty se  $^{125}\text{I}$ -ghr byla určena afinita ghrelinových analogů na membránách buněk LCC PK-1 s transfektovaným lidským receptorem GHS-R 1a. Nejvyšší afinitu vykazovaly analogy ghrelinu s oktanovou kyselinou vázanou amidovou vazbou k diaminopropionové kyselině v pozici 3 a zároveň obsahující naftylalanin v pozici 4, naopak nejnižší afinitu měly kratší N-koncové analogy ghrelinu a analogy ghrelinu bez oktanové skupiny.
- 3) V testech příjmu potravy na myších neměly N-koncové analogy ghrelinu a analogy ghrelinu bez oktanové skupiny (vázané na serinu v pozici 3) anorexigenní ani orexigenní účinek. Orexigenní účinek dlouhých analogů ghrelinu s oktanovou kyselinou a nekódovými aminokyselinami v molekule byl vyšší a dlouhodobější než orexigenní účinek přirozeného ghrelinu.
- 4) Při testování schopnosti uvolňovat GH bylo signifikantního zvýšení koncentrace GH v plasmě dosaženo pouze po podání ghrelinu, nikoliv jeho stabilnějších analogů s agonistickým (orexigenním) účinkem.

### Seznam použité literatury:

- [1] M.W. Schwartz, S.C. Woods, D. Porte, R.J. Seeley, D.G. Baskin, *Nature*, 404 (2000) 661.
- [2] B. Meister, *Physiol Behav*, 92 (2007) 263.
- [3] J.P. Wilding, *Diabet Med*, 19 (2002) 619.
- [4] T.R. Castañeda, J. Tong, R. Datta, M. Culler, M.H. Tschöp, *Front Neuroendocrinol*, 31 (2010) 44.
- [5] M.T. Zanella, F.F. Ribeiro Filho, *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 53 (2009) 271.
- [6] D.E. Cummings, *Physiol Behav*, 89 (2006) 71.
- [7] R.K. Støving, J. Hangaard, M. Hansen-Nord, C. Hagen, *J Psychiatr Res*, 33 (1999) 139.
- [8] V. Tolle, M. Kadem, M.T. Bluet-Pajot, D. Frere, C. Foulon, C. Bossu, R. Dardennes, C. Mounier, P. Zizzari, F. Lang, J. Epelbaum, B. Estour, *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (2003) 109.
- [9] P.G. Kopelman, *Nature*, 404 (2000) 635.
- [10] R.S. Padwal, S.R. Majumdar, *Lancet*, 369 (2007) 71.
- [11] M.D. DeBoer, *Nutrition*, 24 (2008) 806.
- [12] D.P. Kotler, *Ann Intern Med*, 133 (2000) 622.
- [13] I. Depoortere, *Regul Pept*, 156 (2009) 13.
- [14] C. De Vriese, J. Perret, C. Delporte, *Nutrition*, 26 (2010) 579.
- [15] M. Granada, T. Priego, A.I. Martín, M.A. Villanúa, A. López-Calderón, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288 (2005) E486.
- [16] C.Y. Bowers, *Cell Mol Life Sci*, 54 (1998) 1316.
- [17] A.D. Howard, S.D. Feighner, D.F. Cully, J.P. Arena, P.A. Liberato, C.I. Rosenblum, M. Hamelin, D.L. Hreniuk, O.C. Palyha, J. Anderson, P.S. Paress, C. Diaz, M. Chou, K.K. Liu, K.K. McKee, S.S. Pong, L.Y. Chaung, A. Elbrecht, M. Dashkevicz, R. Heavens, M. Rigby, D.J. Sirinathsinghji, D.C. Dean, D.G. Melillo, A.A. Patchett, R. Nargund, P.R. Griffin, J.A. DeMartino, S.K. Gupta, J.M. Schaeffer, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg, *Science*, 273 (1996) 974.
- [18] M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, K. Kangawa, *Nature*, 402 (1999) 656.
- [19] T.J. Zhao, G. Liang, R.L. Li, X. Xie, M.W. Sleeman, A.J. Murphy, D.M. Valenzuela, G.D. Yancopoulos, J.L. Goldstein, M.S. Brown, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2010) 7467.

- [20] J.V. Zhang, P.G. Ren, O. Avsian-Kretchmer, C.W. Luo, R. Rauch, C. Klein, A.J. Hsueh, *Science*, 310 (2005) 996.
- [21] D.H. St-Pierre, L. Wang, Y. Taché, *News Physiol Sci*, 18 (2003) 242.
- [22] T. Inhoff, B. Wiedenmann, B.F. Klapp, H. Mönnikes, P. Kobelt, *Peptides*, 30 (2009) 991.
- [23] M. Kojima, K. Kangawa, *Physiol Rev*, 85 (2005) 495.
- [24] Y. Shanado, M. Kometani, H. Uchiyama, S. Koizumi, N. Teno, *Biochem Biophys Res Commun*, 325 (2004) 1487.
- [25] T. Inhoff, H. Mönnikes, S. Noetzel, A. Stengel, M. Goebel, Q.T. Dinh, A. Riedl, N. Bannert, A.S. Wisser, B. Wiedenmann, B.F. Klapp, Y. Taché, P. Kobelt, *Peptides*, 29 (2008) 2159.
- [26] D. Rosita, M.A. Dewit, L.G. Luyt, *J Med Chem*, 52 (2009) 2196.
- [27] M. Kojima, K. Kangawa, *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2 (2006) 80.
- [28] N.A. Tritos, E.G. Kokkotou, *Mayo Clin Proc*, 81 (2006) 653.
- [29] Y. Sun, M. Asnicar, R.G. Smith, *Neuroendocrinology*, 86 (2007) 215.
- [30] P. Wiedmer, R. Nogueiras, F. Broglio, D. D'Alessio, M.H. Tschöp, *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 3 (2007) 705.
- [31] M. Nakazato, N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa, S. Matsukura, *Nature*, 409 (2001) 194.
- [32] K. Toshinai, Y. Date, N. Murakami, M. Shimada, M.S. Mondal, T. Shimbara, J.L. Guan, Q.P. Wang, H. Funahashi, T. Sakurai, S. Shioda, S. Matsukura, K. Kangawa, M. Nakazato, *Endocrinology*, 144 (2003) 1506.
- [33] M.A. Bednarek, S.D. Feighner, S.S. Pong, K.K. McKee, D.L. Hreniuk, M.V. Silva, V.A. Warren, A.D. Howard, L.H. Van Der Ploeg, J.V. Heck, *J Med Chem*, 43 (2000) 4370.
- [34] M. Matsumoto, H. Hosoda, Y. Kitajima, N. Morozumi, Y. Minamitake, S. Tanaka, H. Matsuo, M. Kojima, Y. Hayashi, K. Kangawa, *Biochem Biophys Res Commun*, 287 (2001) 142.
- [35] A. Torsello, C. Ghe', E. Bresciani, F. Catapano, E. Ghigo, R. Deghenghi, V. Locatelli, G. Muccioli, *Endocrinology*, 143 (2002) 1968.
- [36] N. Morozumi, T. Hanada, H. Habara, A. Yamaki, M. Furuya, T. Nakatsuka, N. Inomata, Y. Minamitake, K. Ohsuye, K. Kangawa, *Peptides* (2011).
- [37] K. Ohinata, K. Kobayashi, M. Yoshikawa, *Peptides*, 27 (2006) 1632.
- [38] J. Iqbal, Y. Kurose, B. Canny, I.J. Clarke, *Endocrinology*, 147 (2006) 510.
- [39] J. Yang, T.J. Zhao, J.L. Goldstein, M.S. Brown, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (2008)



10750.

- [40] M. Van Craenenbroeck, F. Gregoire, P. De Neef, P. Robberecht, J. Perret, *Peptides*, 25 (2004) 959.
- [41] C. De Vriese, F. Gregoire, R. Lema-Kisoka, M. Waelbroeck, P. Robberecht, C. Delporte, *Endocrinology*, 145 (2004) 4997.
- [42] E. Ghigo, G. Aimaretti, E. Arvat, F. Camanni, *Endocrine*, 15 (2001) 29.
- [43] K. Sethumadhavan, K. Veeraragavan, C.Y. Bowers, *Biochem Biophys Res Commun*, 178 (1991) 31.
- [44] M. Pýchová: Vazebné studie peptidů jako potenciálních látek pro léčbu obezity: Bakalářská práce, PřF UK Praha, katedra biochemie (2009).
- [45] G. Muccioli, C. Ghè, M.C. Ghigo, M. Papotti, E. Arvat, M.F. Boghen, M.H. Nilsson, R. Deghenghi, H. Ong, E. Ghigo, *J Endocrinol*, 157 (1998) 99.
- [46] C. Chollet, K. Meyer, A.G. Beck-Sickinger, *J Pept Sci*, 15 (2009) 711.
- [47] A. Moulin, J. Ryan, J. Martinez, J.A. Fehrentz, *ChemMedChem*, 2 (2007) 1242.
- [48] A. Moulin, L. Demange, J. Ryan, C. M'Kadmi, J.C. Galleyrand, J. Martinez, J.A. Fehrentz, *Bioorg Med Chem Lett*, 18 (2008) 164.
- [49] H.D. Falls, B.D. Dayton, D.G. Fry, C.A. Ogiela, V.G. Schaefer, S. Brodjian, R.M. Reilly, C.A. Collins, W. Kaszubska, *J Mol Endocrinol*, 37 (2006) 51.
- [50] K.M. Chu, K.B. Chow, P.K. Leung, P.N. Lau, C.B. Chan, C.H. Cheng, H. Wise, *Int J Biochem Cell Biol*, 39 (2007) 752.
- [51] A. Asakawa, A. Inui, T. Kaga, G. Katsuura, M. Fujimiya, M.A. Fujino, M. Kasuga, *Gut*, 52 (2003) 947.
- [52] A. Moulin, L. Demange, J. Ryan, D. Mousseaux, P. Sanchez, G. Bergé, D. Gagne, D. Perrissoud, V. Locatelli, A. Torsello, J.C. Galleyrand, J.A. Fehrentz, J. Martinez, *J Med Chem*, 51 (2008) 689.
- [53] L. Demange, D. Boeglin, A. Moulin, D. Mousseaux, J. Ryan, G. Bergé, D. Gagne, A. Heitz, D. Perrissoud, V. Locatelli, A. Torsello, J.C. Galleyrand, J.A. Fehrentz, J. Martinez, *J Med Chem*, 50 (2007) 1939.
- [54] S.D. Katugampola, Z. Pallikaros, A.P. Davenport, *Br J Pharmacol*, 134 (2001) 143.
- [55] P. Cassoni, C. Ghé, T. Marrocco, E. Tarabra, E. Allia, F. Catapano, R. Deghenghi, E. Ghigo, M. Papotti, G. Muccioli, *Eur J Endocrinol*, 150 (2004) 173.
- [56] I. Hurbain-Kosmath, A. Berault, N. Noel, J. Polkowska, A. Bohin, M. Jutisz, E.H. Leiter, W.G. Beamer, H.G. Bedigian, M.T. Davisson, *In Vitro Cell Dev Biol*, 26 (1990) 431.
- [57] E. Perdonà, F. Faggioni, A. Buson, F.M. Sabbatini, C. Corti, M. Corsi, *Eur J*

Pharmacol, 650 (2011) 178.

- [58] V. BUONASSISI, G. SATO, A.I. COHEN, Proc Natl Acad Sci U S A, 48 (1962) 1184.
- [59] A.H. Tashjian, Y. Yasumura, L. Levine, G.H. Sato, M.L. Parker, Endocrinology, 82 (1968) 342.
- [60] A.M. Nanzer, S. Khalaf, A.M. Mozid, R.C. Fowkes, M.V. Patel, J.M. Burrin, A.B. Grossman, M. Korbonits, Eur J Endocrinol, 151 (2004) 233.
- [61] J. Maixnerová, J. Hlaváček, D. Blokesová, W. Kowalczyk, T. Elbert, M. Sanda, M. Blechová, B. Zelezná, J. Slaninová, L. Maletínská, Peptides, 28 (2007) 1945.
- [62] H. Motulsky, R. Neubig, Curr Protoc Protein Sci, Appendix 3 (2001) Appendix 3H.
- [63] Y. Cheng, W.H. Prusoff, Biochem Pharmacol, 22 (1973) 3099.
- [64] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J.M. Friedman, Nature, 372 (1994) 425.
- [65] Y. Sun, P. Wang, H. Zheng, R.G. Smith, Proc Natl Acad Sci U S A, 101 (2004) 4679.

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

<b>Jméno a příjmení s adresou</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>