

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Obor Biochemie

**VAZBA FRAGMENTŮ PEPTIDŮ CART
K FEOCHROMOCYTOMÁLNÍM BUŇKÁM PC12**

Bakalářská práce

Darja Blokešová

Školitelka: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Garantka: Prof. RNDr. Danuše Sofrová, CSc.

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233141140

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto balalářskou práci vypracovávala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Lenky Maletínské, CSc. (ÚOCHB, v.v.i., AV ČR, Praha) a garantky prof. RNDr. Danuše Sofrové, CSc. (PřF UK, Praha), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze.....*1.6. 2014*.....

Dana Bleštinová
.....

podpis

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Maletínské, CSc. (ÚOCHB, v.v.i., AV ČR, Praha) za její cenné rady, odbornou a obětavou pomoc, přívětivost a trpělivost při psaní mé bakalářské práce a při experimentální činnosti.

Dále děkuji za ochotu a cenné připomínky při psaní mé bakalářské práce prof. RNDr. Danuši Sofrové, CSc. (PřF UK, Praha).

Chtěla bych také upřímně poděkovat Mgr. Janě Maixnerové za odborné rady a obětavost nejen při experimentální části práce.

Kolektivu oddělení Biochemie a molekulární biologie ÚOCHB, v.v.i., AV ČR děkuji za vytvoření příjemného a milého pracovního prostředí, Ing. Blance Železné, CSc. a Reshe Matyškové za vynikající podporu a pomoc při psaní mé bakalářské práce.

Děkuji Doc. RNDr. Tomáši Elbertovi, Ph.D. za provedení radioaktivního značení peptidu CART, dále RNDr. Janu Hlaváčkovi, CSc. za syntézu fragmentů a Mgr. Miloslavu Šandovi za proměření hmotnostních spekter.

V neposlední řadě patří mé velké díky mým rodičům a příteli za jejich oporu a trpělivost při mých studiích.

Tato práce byla podporována grantovou agenturou ČR č. 303/05/0614.

Obsah

Seznam použitých zkratek	6
1. Úvod	7
1.1. CART (Cocaine- and amphetamine-regulated transcript)	7
1.1.1. Objev	7
1.1.2. Výskyt a význam	7
1.1.3. Struktura peptidů CART	8
1.1.4. Vliv peptidu CART na příjem potravy	9
1.1.5. Úloha peptidu CART v hypotalamo-hypofyzární ose a sympato- adrenálním systému	9
1.1.6. Fragmenty peptidů CART	11
1.1.7. Receptory	11
1.2. Buněčná linie - feochromocytomální buňky PC12	12
1.2.1. Původ	12
1.2.2. Charakteristika buněčné linie PC12	12
2. Cíl bakalářské práce	14
3. Materiál	15
4. Metody	16
4.1. Peptidy CART a jejich fragmenty	16
4.1.1. Peptidy	16
4.1.2. Jodace CART (61-102)	16
4.2. Buněčná linie PC12	18
4.2.1. Pěstování buněčné linie PC12	18
4.2.2. Měření růstové křivky	18
4.3. Kompetitivní vazebné experimenty	19
4.3.1. Kompetitivní vazba na celé buňky na destičkách	20
4.3.2. Kompetitivní vazba radioaktivně značených peptidů CART(61- 102) k nediferencovaným buňkám PC12	21
4.3.3. Kompetitivní vazba na buněčné membrány z nediferencovaných buněk PC12	21

4.4. Analýza dat získaná z vazebných pokusů a statistika	22
5. Výsledky	23
5.1. Peptidy CART a jejich fragmenty	23
5.1.1. Peptidy	23
5.1.2. Jodace CART(61-102)	23
5.2. Buněčná linie PC12	23
5.2.1. Pěstování buněčné linie PC12	23
5.2.2. Měření růstové křivky	24
5.3. Kompetitivní vazebné experimenty	25
5.3.1. Kompetitivní vazba k nediferencovaným buňkám PC12 a buněčným membránám	25
5.3.2. Kompetitivní vazba k diferencovaným buňkám PC12	29
5.3.3. Kompetitivní vazba radioaktivně značených peptidů CART(61- 102) k nediferencovaným PC12 buňkám	30
6. Diskuze	31
7. Souhrn	33
Seznam použité literatury	34

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- Abu – Kyselina aminomáselná (Aminobutyric acid)
- Acm – Amid kyseliny octové (Acetamide)
- ACTH – Adrenokortikotropní hormon (Adrenocorticotropic Hormone)
- BPTI – Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor)
- BSA – Hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)
- CART – Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript
- CCK - Cholecystokinin
- CNS – Centrální nervová soustava
- CRH – Kortikoliberin (Corticotropin releasing hormone)
- EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová (Ethylendiamintetraacetic acid)
- GnRH – Gonadoliberin (Gonadotropin Releasing Hormone)
- HEPES – N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonová kyselina)
- LC-MS/MS – Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
- MALDI-TOF – Hmotnostní spektrometrie (Matrix Assisted Laser Desorption – Time of Flight)
- mRNA – Mediátorová ribonukleová kyselina (Messenger Ribonucleotic Acid)
- NGF – Nervový růstový faktor (Nerve growth factor)
- NMR – Nukleární magnetická rezonance
- PEI - Polyethylenimin
- PVN – Paraventriculární jádro
- RP-HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
- TRH – Tyroliberin (Thyrotropin Releasing Hormone)

Dále jsou užívány zkratky podle doporučení IUPAC-IUB (53).

1. ÚVOD

1.1. CART (COCAINE- AND AMPHETAMINE-REGULATED TRANSCRIPT)

1.1.1. Objev

V roce 1995 se skupině vědců pod vedením J. Douglassa podařilo najít genový transkript, jehož množství se zvýšilo po podání kokainu a amfetaminu, a odtud tedy pochází i samotný název tohoto peptidu, produktu CART [1]. Bylo zjištěno, že se jedná o stejný peptid, jaký byl již v roce 1981 izolován z ovčího hypotalamu Spiessem a kol. [2].

1.1.2. Výskyt a význam

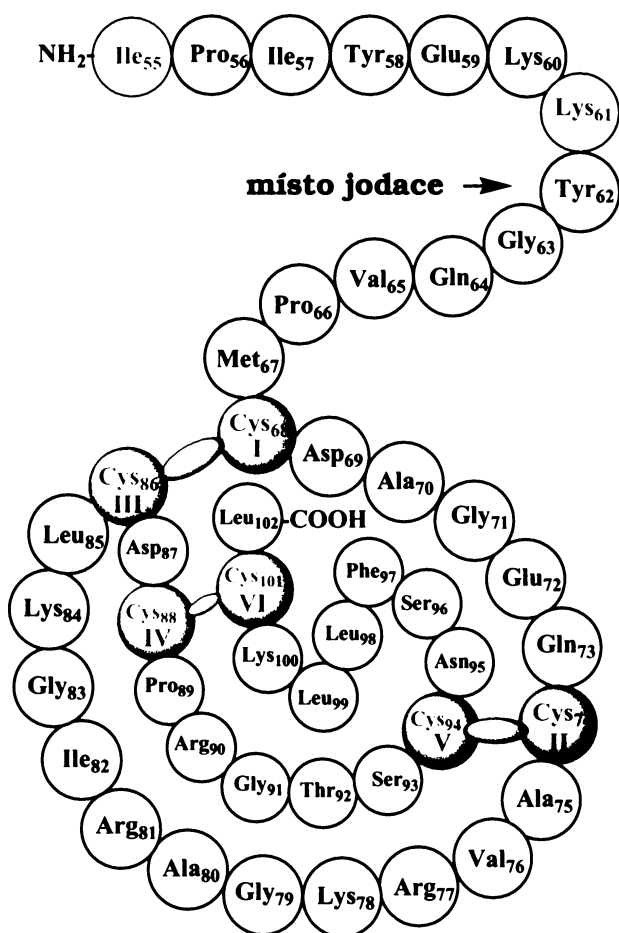
CART peptidy hrají velkou úlohu v řadě fyziologických procesů. Účastní se regulace příjmu potravy (anorexigenní účinek – snižování příjmu potravy) a energetického metabolismu, endokrinních [3,4] a kardiovaskulárních pochodů a při stresu [5], peptidy CART mohou mít také vliv na vnímání bolesti [5]. Peptidy CART mají také úlohu při sekreci inzulínu z pankreatu [6], dále mohou mít vliv při depresích [5] a při vývoji osteoporózy [7].

Peptidy CART byly nalezeny jak v centrální nervové soustavě, tak i v periferních orgánech. V CNS se vyskytují zejména v hypotalamu a hypofýze [8, 9], v periférii pak v dřeni nadledvin [10], Langerhansových ostrůvcích [11, 12] a v trávicím traktu [13]. Hypotalamus, zvláště pak jeho laterální část, nucleus arcuatus a zona inserta obsahují největší koncentrace CART mRNA [14]. Hypofýza pak obsahuje zhruba stejnou koncentraci CART mRNA jako hypotalamus [8] a to z 80% v gonadotropech (buňky produkující luteinizační a folikulostimulační hormon). Dá se tedy říci, že výskyt peptidů CART lze zařadit do hypotalamo-hypofyzární osy.

Role peptidů CART v periférii ještě není přesně známa, u potkanů byla zjištěna stimulace pankreatické sekrece amylázy [15].

1.1.3. Struktura peptidů CART

Prepropeptid CART je tvořen 129 nebo 116 aminokyselinami [1]. Signální sekvence má 27 aminokyselin, výsledný propeptid CART se pak skládá ze 102 aminokyselin v případě dlouhé formy (potkaní, myší) nebo 89 v případě krátké formy (potkaní, myší, lidský) [1]. Struktura peptidu CART je znázorněna na obr. 1. Propeptid obsahuje několik štěpných míst a dává vzniknout dvěma biologicky aktivním přirozeným fragmentům CART(55-102) a CART(62-102). Dalšími biologicky aktivními peptidy jsou CART(61-102) a delší fragment CART(54-102) [16]. Jak prokázala NMR spektroskopie, CART(55-102) obsahuje kompaktní jádro stabilizované disulfidickými můstky, s neuspořádaným N-terminálním koncem [17].



Obr. 1 Struktura peptidu CART [16]

Červeně zvýrazněné aminokyseliny označují počátek dvou přirozeně se vyskytujících biologicky aktivních fragmentů. Zeleně jsou znázorněny cysteiny tvořící disulfidické můstky. Místo jodace označuje tyrosin v pozici 62, který byl pro účely kompetitivních vazebných experimentů jodován.

1.1.4. Vliv peptidu CART na příjem potravy

Brzy po objevu peptidu CART bylo dokázáno, že peptid CART injikovaný do třetí mozkové komory myši způsobuje snížení příjmu potravy [18].

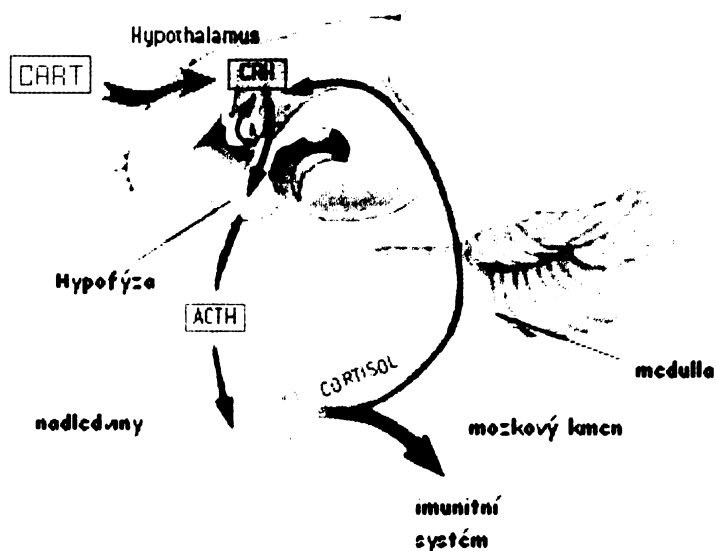
Ze všech biologicky aktivních fragmentů byl v inhibici příjmu potravy u hladových myši neúčinnější CART(55-102) [16]. CART(55-102) a CART(61-102) obsahují šest cysteinů, jež tvoří tři disulfidické můstky a to mezi cysteinem v pozici 68 a 86, 74 a 94, 88 a 101 [16]. Podle Couceyro a Fritze redukce disulfidických můstků nejenom snižuje anorexigenní účinek tohoto peptidu, ale navíc ještě stimuluje příjem potravy u potkanů [19].

Peptidy CART blokují orexigenní účinek neuropeptidu Y, který je nejznámějším stimulatorem příjmu potravy [18]. Dlouhodobé podání peptidu CART snižovalo příjem potravy a způsobovalo úbytek váhy jak u štíhlých, tak obézních potkanů s nefunkčním leptinem [20], tak i u potkanů obézních po vysokotučné dietě [21]. I přes výše zmíněné účinky peptidů CART, myši, kterým chyběl gen pro CART, vykazovaly normální tělesnou hmotnost a příjem potravy, ale byly více náchylné k obezitě po vysokotučné dietě v porovnání se skupinou myši, jejichž gen pro CART nebyl pozměněn [22].

1.1.5. Úloha peptidu CART v hypotalamo-hypofyzární ose a sympato-adrenálním systému

Zdá se, že CART je regulován glukokortikoidy na všech úrovních hypotalamo-hypofýzo-adrenální osy a účastní se také regulace hypotalamo-hypofýzo-tyroidální osy, hypotalamo-hypofýzo-gonadální osy, stejně jako sympato-adrenálního systému. Endokrinní regulace hypotalamo-hypofyzární osy je znázorněna na obrázku 2 na následující straně.

Co se týče hypotalamo-hypofyzární osy, má CART řadu důležitých účinků na hypofýzotropní neurony, jak dokazuje jeho výskyt v zakončení axonů obsahující kortikoliberin (CRH), tyroliberin (TRH) a gonadoliberin (GnRH), které jsou produkovány hypotalamem [23, 24, 25, 10, 26].



Obr. 2 Úloha CART v hypotalamo-hypofyzární ose [27]

CART se účastní všech úrovní hypotalamo-hypofyzární osy, má vliv na uvolňování kortikoliberinu (CRH), kortikotropinu (ACTH) a také na uvolňování kortizolu

Centrální podání peptidů CART aktivuje CRH neurony a stimuluje sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a tím i kortikosteronu; sekrece může být blokována antagonistou CRH, astressinem [28]. Adrenalektomie (odnětí nadledvin) snižuje koncentraci CART mRNA a peptidu CART jak v paraventriculárním jádru (PVN) a v nucleu arcuatu v hypotalamu, tak i v krvi. Podání kortikosteronu pak částečně vrací hladiny CART do stavu před adrenalektomií [28]. Exprese a uvolnění peptidu CART do hypofýzy je regulováno CRH a glukokortikoidy [29,23].

Peptid CART také přímo inhibuje sekreci prolaktinu in vitro a může zcela blokovat stimulační účinek TRH na sekreci prolaktinu. Peptid CART je sekretován spolu s TRH do portálního hypofyzárního oběhu a proto by mohl ovlivňovat účinek TRH na sekreci hormonů hypofýzy [30].

1.1.6. Fragmenty peptidů CART

V centrálním nervovém systému se vyskytuje jak peptid CART(55-102), tak i (62-102), jejichž anorexigenní aktivita se ve specifických testech lišila [17, 31]. CART(54-102), (55-102), (61-102) a (62-102) po intracerebroventrikulárním podání hladovým myším inhibovaly příjem potravy téměř stejně, CART(55-102) byl mírně účinnější než ostatní peptidy [17]. Dále se podařilo izolovat v periférii delší formy peptidů CART, konkrétně CART(1-89) a (10-89) a to z nadledvin [32].

N-koncové peptidy propeptidu CART jsou považovány za biologicky inaktivní. CART(1-27) nesnižuje příjem potravy u potkanů [33], neaktivuje buněčnou signalizaci [34] a nebyla zjištěna jeho specifická vazba k buňkám myši hypofyzární buněčné linie AtT20 [35].

Fragmenty N-koncové části peptidu CART (55-102), jako jsou CART (55-76) a CART(62-76) byly v *in vivo* testech (vliv na příjem potravy) u potkanů shledány biologicky aktivní [33, 36]. Byly také syntetizovány C-koncové peptidy CART(85-102), u nichž byla změřena schopnost snižovat lokomoci navozenou morfinem [37,38].

O syntetických kratších fragmentech peptidů CART je velmi málo známo, neboť dosud nebyla systematicky provedena studie zabývající se vztahem jejich struktury a biologické aktivity.

1.1.7. Receptory

Dosud se ještě nepodařilo identifikovat a izolovat receptor (receptory) pro peptidy CART. V současné době byla popsána specifická vazba ^{125}I -CART(61-102) k buňkám hypofyzární nádorové buněčné linie AtT20 [35,39]. Dále byla popsána vazba fúzního proteinu, skládajícího se z peptidu CART(55-102) a fluorescenčního proteinu, k disociovaným buňkám hypothalamu a hepatocytární buněčné linii HepG2 [40].

A nejnověji byla popsána specifická vazba ^{125}I -CART(61-102) k feochromocytomálním buňkám PC12, jak k nediferencovaným tak i k diferencovaným v neuronální fenotyp a buněčným membránám PC12 [41]. Počet vazebných míst B_{\max} u saturačních vazebných experimentů nediferencovaných buněk činila 2228 ± 529 vazebných míst/buňku a pro diferencované byla B_{\max} dokonce 5 krát vyšší a to 11194 ± 261 vazebných míst/buňku [41].

Rovnovážná disociační konstanta K_d , určená ze saturačních vazebných pokusů pro nediferencované PC12 buňky činila 0,48 nM. Pro diferencované buňky měla K_d hodnotu 1,90 nM [41].

Je pravděpodobné, že existuje více druhů receptorů pro CART, neboť dva biologicky aktivní fragmenty CART(55-102) a CART(62-102) vykazují odlišné biologické aktivity [39].

Byla provedena studie [35], ve které bylo zjištěno, že ^{125}I -CART(61-102) se neváže k řadě z dosud známých receptorů, například opioidním receptorům, receptorům pro somatostatin, progesteron, CCK, neuropeptid Y, oxytocin, TRH a dalším. Tato studie nepotvrdila afinitu peptidu CART k výše zmíněným receptorům a z toho se dá usoudit, že hledaný receptor pro peptidy CART je patrně unikátní [35].

Nalezení receptoru je naprosto klíčové pro další výzkum a využití biologických vlastností peptidů CART, zjištění jejich úlohy v regulaci příjmu potravy, popřípadě jejich použití v terapii obezity.

1.2. BUNĚČNÁ LINIE - PHEOCHROMOCYTOMÁLNÍ BUŇKY PC12

1.2.1. Původ

Jedná se o buněčnou linii, jež byla získána z potkaního feochromocytomu, nádoru potkaních nadledvin. Dřeň nadledvin postihují dva druhy nádorů. Jedná se o nádory z chromafinních buněk- feochromocytom a feochromoblastom.

1.2.2. Charakteristika buněčné linie PC12

PC12 buňky mají morfologické a cytochemické vlastnosti podobné vlastnostem normálních chromafinních buněk a lidskému feochromocytomu. Buňky jsou schopné syntetizovat a ukládat neurotransmitery typu katecholaminu, tedy dopamin a noradrenalin, ne však adrenalin [42].

Nediferencované buňky jsou kulovitěho tvaru, působením nervového růstového faktoru (nerve growth factor, NGF) se buňky PC12 přestávají dělit, zastavují svůj růst, vytvářejí nervové výběžky axony a tedy nervovou síť [42]. Tato diferenciace je reverzibilní, neboť po odebrání NGF buňky do 24 hodin ukončují proces diferenciace a do 72 hodin se začínají opět dělit a vracet se ke svým původním vlastnostem [42]. Diferencované buňky

vytvářejí shluky 30 až 120 nm dlouhých granulí a 30 až 70 nm dlouhých váčků (vezikul), které se podobají granulím a váčkům v neuronech, uvolňujících adrenalin a acetylcholin. Nervový růstový faktor je protein, který byl připraven z myších slinných žláz [43].

Buněčná linie PC12 je díky svým vlastnostem zvláště vhodná pro studium řady problematik v oblasti neurobiologie a neurochemie.

2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Vazba fragmentů peptidů CART k feochromocytomálním buňkám PC12, konkrétně tedy:

- Sledování vlastností buněčné linie PC12 a naměření růstové křivky.
- Kompetitivní vazba přirozených peptidů CART a jejich syntetických fragmentů k buňkám PC12 nediferencovaným, diferencovaným v neuronální fenotyp a membránám z nediferencovaných buněk.
- Kompetitivní vazba radioaktivně značených peptidů CART(61-102) k nediferencovaným PC12 buňkám.

3. MATERIÁL

Buněčná linie PC12	Manassas, VA, USA
BSA	Serva, Heidelberg, Německo
Běžné chemikálie	Sigma, St. Louis, MO, USA
Destičky (24-jamkové)	Nunc TM , NUNC, Roskilde, Dánsko
Filtry GF/C	Whatman, Maidstone, Velká Británie
Iodo-Gen	Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA
peptid CART (61-102)	Bachem, Bubendorf, Švýcarsko
NaI	Sigma, St. Louis, MO, USA
Na(¹²⁵ I)	MP Biomedicals, Illkirch, Francie
NGF	Sigma, St. Louis, MO, USA
PEI	Sigma, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640	Sigma, St. Louis, MO, USA

4. METODY

4.1. PEPTIDY CART A JEJICH FRAGMENTY

4.1.1. Peptidy

Peptidy CART (61-102) a (55-102) byly dodány firmou Bachem (Bubendorf, Švýcarsko). Přehled struktur jejich krátkých analogů je v tabulce 1 na následující straně. Peptidy 1, 3, 4 a 6 byly syntetizovány na polské Univerzitě v Gdaňsku, zatímco peptidy 2, 5 a 7 až 14 byly syntetizovány v Ústavu organické chemie a biochemie, v.v.i., AVČR, Praha, metodou syntézy na pevné fázi [44].

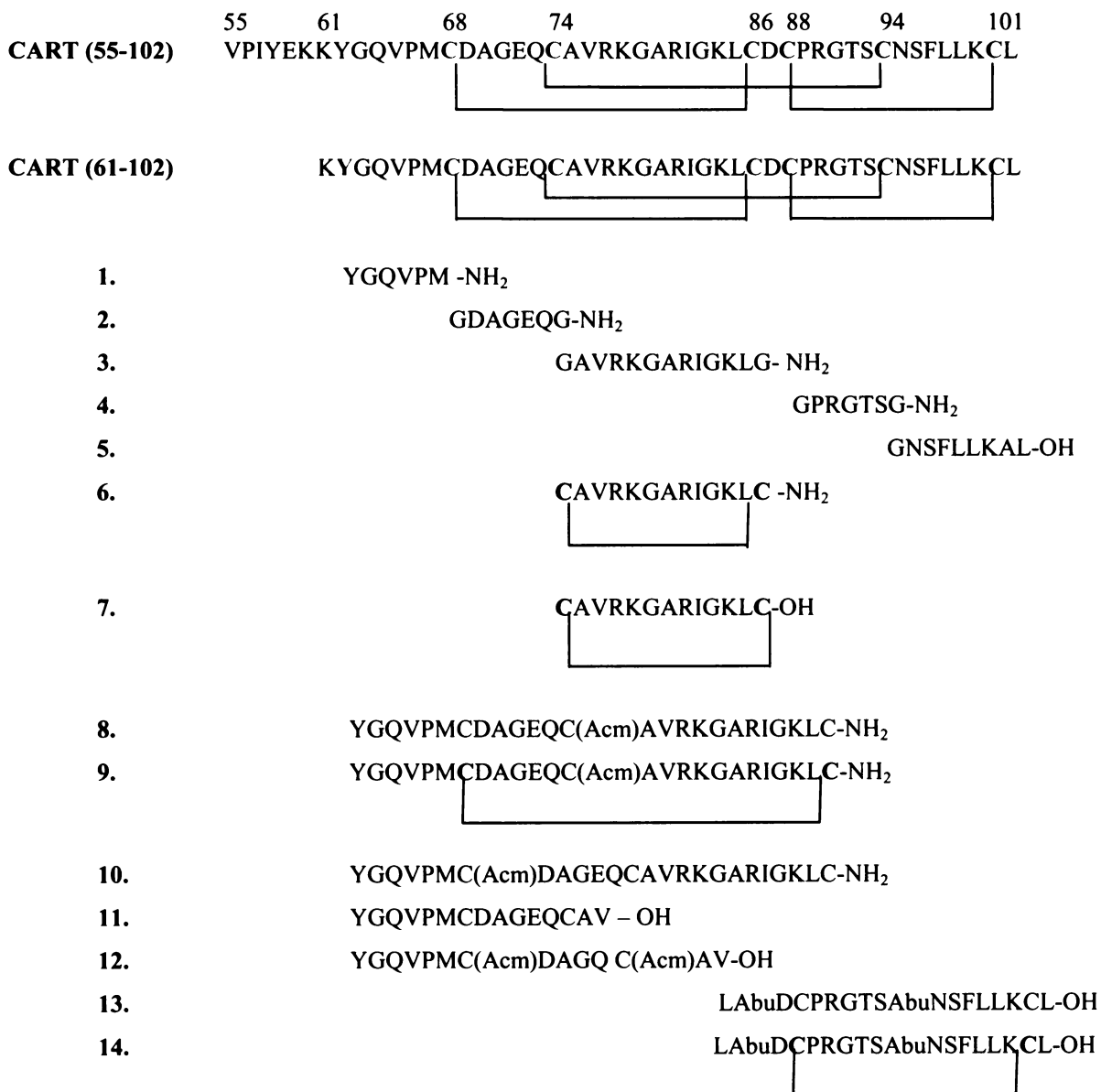
4.1.2. Jodace CART (61-102)

CART (61-102) byl jodován buď s Na^{125}I (MP Biomedicals, Illkirch, Francie) nebo s neradioaktivním NaI (Sigma, St. Luis, MO, USA) s použitím Iodo-Gen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) [45] v 0,1 M sodnofosfátovém pufru o pH 7,2, obsahující 0,15 M NaCl , po dobu 15 minut při laboratorní teplotě v laboratoři Radioizotopy, ÚOCHB, v.v.i., AVČR Praha, podle instrukcí výrobce. Nejodovaný, mono-jodovaný a di-jodovaný CART(61-102) byly separovány pomocí RP-HPLC za použití kolony Luna 3 μ fenyl-hexyl 150x4.6mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) a 20 až 25 % gradientu acetonitrilu ve vodě obsahující 0,1% trifluoroctovou kyselinu, 60 minut. [41]. Molekulové hmotnosti jodovaných peptidů byly měřeny na MALDI-TOF, Reflex IV hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

Specifická aktivita ^{125}I -CART(61-102) byla asi 2000 Ci/mmol. ^{125}I -CART(61-102) byl uchován v alikvotech při $-20\text{ }^\circ\text{C}$ a spotřebován pro vazebné experimenty do jednoho měsíce.

Tabulka 1 Struktura fragmentů peptidů CART

Aminokyseliny tvořící strukturu fragmentů CART jsou znázorněny jednopísmennou zkratkou, červeně jsou označeny cysteiny tvořící disulfidickou vazbu. Pozice jednotlivých aminokyselin jsou označeny číslem nad strukturami. Číslo 1 až 14 označují fragmenty 1 až 14. Acm je zkratka pro acetamid (amid kyseliny octové), Abu pro kyselinu aminomáselnou.



4.2. BUNĚČNÁ LINIE PC12

4.2.1. Pěstování buněčné linie PC12

Potkaní feochromocytomální buňky PC12 byly zakoupeny u firmy ATCC (Manassas, VA, USA). Buňky byly vyživovány růstovým médiem RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), obsahující 10% koňského séra, 5% fetálního hovězího séra, 4,5 g/l glukózy, 1 mM pyruvátu sodného, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutaminu, 1,5 g/l uhličitanu sodného, o pH 7,4. Abychom dosáhli exponenciálního růstu, byla buněčná linie pasážována jednou týdně. Pro vazebné pokusy jsme použili 24-jamkové destičky (NuncloTM, NUNC, Roskilde, Dánsko), potažené polyethyleniminem (PEI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) s průměrem jamky 15 mm.

Nediferencované buňky jsme nechali růst dva dny, abychom dosáhli hustoty 5×10^5 buněk na jamku (optimální hustota pro vazebné experimenty).

Diferenciace buněk byla dosažena užitím nervového růstového faktoru NGF (nerve growth factor, 50 ng/ml média) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Médium bylo měněno vždy každý první, třetí a pátý den. Diferencované buňky jsme použili sedmý den, kdy byla dosažena hustota přibližně 5×10^5 buněk na jamku destičky. Před každým pokusem byly buňky kontrolovány mikroskopicky, abychom se ujistili, že došlo k diferenciaci buněk. Buňky byly počítány před pokusem i po pokusu.

4.2.2. Měření růstové křivky

Byl sledován nárůst buněk v růstovém médiu a v médiu s NGF (50 ng/ml) po dobu 7 dní. Na začátku experimentu bylo nasazeno 30 000 buněk na jamku destičky. Měření bylo prováděno v duplikátech. Destičky byly nejprve mikroskopicky zkontrolovány. Ze dvou vybraných jamek byly seškrabány přisedlé buňky, rozdisociovány v růstovém médiu a s médiem byly napipetovány do mikrozkuvek. Počítání buněk bylo prováděno v Bürkerově komůrce [46]. Počítaly se pouze celé buňky. Objemu na jeden čtverec Bürkerovy komůrky (0,1 μ l) násobený 10000 odpovídal počet buněk na 1 ml média s buňkami.

4.3. KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ EXPERIMENTY

Vazebné pokusy jsou charakterizovány specifickou (B_{sp}) a nespecifickou (B_{nsp}) vazbou, jež dohromady tvoří vazebnou radioaktivitu, tedy celkové množství vázaného radioligandu B_t [47].

$$B_t = B_{sp} + B_{nsp}$$

$$\text{odtud: } B_{sp} = B_t - B_{nsp}$$

Specifická vazba značí vazbu na receptor, nespecifická vazba označuje všechna vazebná místa mimo receptor.

Kompetitivní vazba je založena na měření vazby při zachování jediné konstantní koncentrace radioligandu v přítomnosti různých koncentrací neznačeného ligandu, neboli kompetitoru a to při splnění rovnovážných podmínek. Kompetitivní vazbu charakterizuje celá řada konstant. IC_{50} značí koncentraci kompetitoru, při které je vytěsněna polovina radioligandu z vazebných míst. Mají-li radioligand a kompetitor stejnou afinitu, můžeme určit počet vazebných míst (B_{max}) a afinitu ligandu pro receptor, neboli rovnovážnou disociační konstantu (K_d) [47]. Bylo prokázáno, že jodace CART (61-102) nemění jeho biologickou aktivitu (41), tudíž můžeme říci, že podmínka zachování afinity je splněna.

K_i označuje rovnovážnou disociační konstantu kompetujícího ligandu a vypočte se podle rovnice *Chenga a Prusoffa* [48]:

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

kde IC_{50} je konstanta vycházející z podmínek daného pokusu, udávaná v jednotkách mol/l. V našich pokusech byla koncentrace radioligandu 0,1 nM a K_d (rovnovážná disociační konstanta radioligandu) byla použita z předchozích saturačních vazebných experimentů [41], kdy K_d pro nediferencované buňky činila $0,48 \pm 0,16$ nM a $1,90 \pm 0,27$ nM pro buňky diferencované.

4.3.1. Kompetitivní vazba na celé buňky na destičkách

Kompetitivní vazebné experimenty byly provedeny s použitím principů Motulského a Neubiga [47]. Metoda byla optimalizována dříve [41].

Byly použity následující pufrы:

1. Promývací

- 10 mM HEPES pufr o pH 7,4
- 118 mM NaCl
- 4,7 mM KCl
- 5 mM MgCl₂
- 5,5 mM glukózy

2. Vazebný

- 20 mM HEPES pufr o pH 7,4
- 118 mM NaCl
- 4,7 mM KCl
- 5mM MgCl₂
- 5,5 mM glukózy
- 1 mg/ml BSA
- 0,1 mg/ml BPTI

Nejprve jsme odsáli médium ze všech jamek, dále jsme promyli každou jamku 1 ml promývacího pufru o teplotě 37°C. Destičky jsme pak nechali inkubovat s 10⁻¹⁰ M ¹²⁵I-CART(61-102) a s neznačenými peptidy o koncentraci v rozmezí 10⁻¹¹ – 10⁻³ M ve vazebném pufru o celkovém objemu 0,25 ml na jamku po 30 minut při 37°C. Nеспецифickou vazbu jsme určili za přítomnosti CART (61-102) o koncentraci 10⁻⁶ M. Po inkubaci byly buňky promyty promývacím pufrem a solubilizovány v 0,1 M NaOH po dobu 15 minut. Radioaktivita vázaná na buňky byla určena pomocí γ-čítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). Celková vazba (B_t) činila 2 až 5% z přidané radioaktivity. Nеспецифická vazba (B_{nsp}) v kompetitivních vazebných experimentech činila méně než 15% celkové vazby. Pokusy byly provedeny v duplikátech alespoň třikrát pro danou látku. Všechny zkoumané peptidy

a jejich fragmenty byly rozpuštěny v deionizované vodě a uchovány v alikvotech zamražené, předtím, než byly použity v samotném pokusu.

Linearita fragmentů 8, 12 a 13 (fragmenty s volnými cysteinovými zbytky) byla ověřena před i po vazebných pokusech pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

4.3.2. Kompetitivní vazba radioaktivně značených peptidů CART(61-102) k nediferencovaným buňkám PC12

Postup metody při těchto vazbách byl stejný jako v předchozí kapitole o vazbách na celé buňky na destičkách, s tím rozdílem, že destičky byly inkubovány s 10^{-10} M mono- ^{125}I -CART(61-102), mono- ^{125}I -[Met 67 sulfoxid]CART(61-102), di- ^{125}I -CART(61-102) nebo di- ^{125}I -[Met 67 sulfoxid]CART(61-102) a s neznačeným CART(61-102) o koncentraci v rozmezí 10^{-10} – 10^{-6} M o celkovém objemu 0,25 ml na jamku po 30 minut při 37°C.

4.3.3. Kompetitivní vazba na buněčné membrány z nediferencovaných buněk PC12

Pufry:

1. Izolační

- 20 mM HEPES o pH 7,4
- 2 mM EDTA

2. Homogenizační

- 20 mM HEPES pufr o pH 7,4
- 118 mM NaCl
- 4,7 mM KCl
- 5 mM MgCl $_2$

Buněčné membrány nediferencovaných buněk PC12 byly izolovány z buněk zamražených při -70 °C. Při izolaci bylo nutno buňky suspendovat v 30 ml izolačního pufru, homogenizovat pomocí skleněného homogenizátoru s teflonovým dříkem 30 sekund 10 krát, poté byla suspenze zředěna na 60 ml izolačním pufrům a opět homogenizována 30 sekund 6 krát. Centrifugace proběhla nejprve na centrifuze Jouan (Jouan centrifuge C3i/CR 3 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) při 1000 x g

po dobu 10 minut při 4°C. Supernatant byl pak dále zpracován na ultracentrifuze Beckmann (Optima™ L-00XP-Ultracentrifuga, typ rotoru 90-TI), po dobu 45 minut při 4 °C a 100000 x g. Sediment byl resuspendován v homogenizačním pufru a alikvoty byly uchovány při -70 °C.

Bílkoviny byly stanoveny podle Bradfordové [49]. Odpovídající koncentrace byla odečtena z kalibrační křivky s použitím hovězího sérového albuminu. Výsledná hodnota pak byla průměrem tří koncentrací proteinu.

Kompetitivní vazebné pokusy byly provedeny s 50 µg membránových proteinů podle podmínek optimalizovaných v předchozích experimentech [41] do celkového objemu 0,25 ml/zkumavku stejně, jak bylo popsáno v odstavci pro vazbu na celé buňky na destičkách, pouze do vazebného pufru nebyla přidána glukóza. Inkubace proběhla při teplotě 37 °C 30 minut . Filtry GF/C (Whatman, Maidstone, Velká Británie) byly předem namočený v promývacím pufru, do kterého byl ještě přidán PEI (1g PEI/200 ml promývacího pufru). Vazebný pokus byl ukončen rychlou filtrací na Brandlově přístroji (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). Celková vazba činila 3 až 10% z celkové přidané radioaktivity. Nespecifická vazba v kompetitivních vazebných experimentech činila méně jak 15% z celkové vazby. Bylo použito duplikátů a pokusy byly provedeny alespoň třikrát pro každý peptid.

4.4. ANALÝZA DAT ZÍSKANÁ Z VAZEBNÝCH POKUSŮ A STATISTIKA

Kompetitivní vazebné křivky byly vypočteny programem Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA), byl použit model pro vazbu k jednomu vazebnému místu (hodnoty IC₅₀ byly získány metodou nelineární regrese). Inhibiční konstanty (K_i) byly spočítány dosazením IC₅₀ do rovnice Chenga a Prusoffa [48]. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny jako průměrná hodnota ± střední chyba průměru (SEM).

5. VÝSLEDKY

5.1. PEPTIDY CART A JEJICH FRAGMENTY

5.1.1. Peptidy

Přehled struktur krátkých peptidů je znázorněn v tabulce 1 na straně 16. Peptidy byly syntetizovány metodou na pevné fázi, jak bylo popsáno v práci Maixnerové a kol. [44]. Nalezené molekulové hmotnosti peptidů byly shodné s teoretickým a jejich čistota byla větší než 90%.

5.1.2. Jodace CART(61-102)

CART(61-102) byl jodován radioaktivním a stabilním izotopem. Pomocí HPLC byly po reakci nalezeny čtyři hlavní píky s retenčními časy 40,7; 41,7; 44,4 a 45,8 minut jak pro radioaktivně, tak neradioaktivně jodovaný CART(61-102). Píky byly identifikovány jako mono-jodovaný peptid s oxidovaným methioninem (v pozici 67), mono-jodovaný peptid, di-jodovaný peptid s oxidovaným methioninem (v pozici 67) a di-jodovaný peptid a to pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), kde mono-jodovaný CART(61-102) tvořil 47% z celkového množství peptidu. Počáteční peptid CART(61-102) se ve směsi po proběhnutí reakce nevyskytoval.

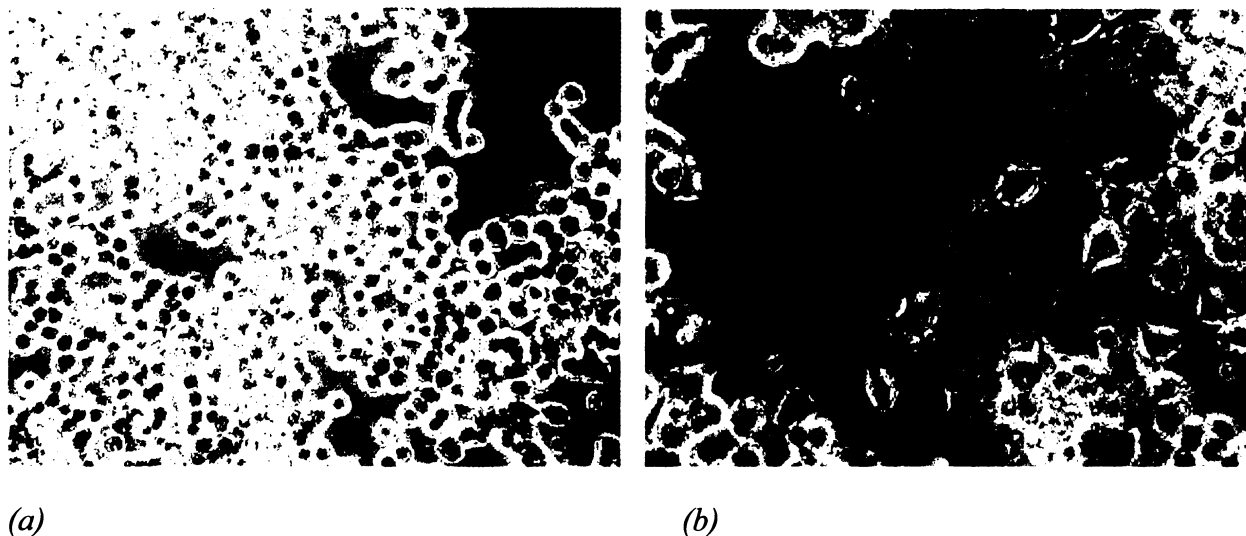
LC-MS/MS analýza jodovaného CART(61-102) a nejodovaného CART(61-102) po štěpení trypsinem odhalila oxidaci methioninu v 67. pozici jodovaného peptidu. Methionin se oxidoval na methionin sulfoxid v průběhu jodace CART(61-102) Iodogenem [44].

5.2. BUNĚČNÁ LINIE PC12

5.2.1. Pěstování buněčné linie PC12

Buňky PC12 byly kulatého tvaru a měly tendenci tvořit shluky. Po přidání NGF tvořily axony a měnily se tedy v neuronální fenotyp. Buňky dobře přisedaly na destičky potažené PEI a bylo dosaženo sterilních podmínek důležitých pro zachování buněčné linie.

Obrázek 3 ukazuje buňky PC12 nediferencované a diferencované v neuronální fenotyp po přidání NGF do růstového média.



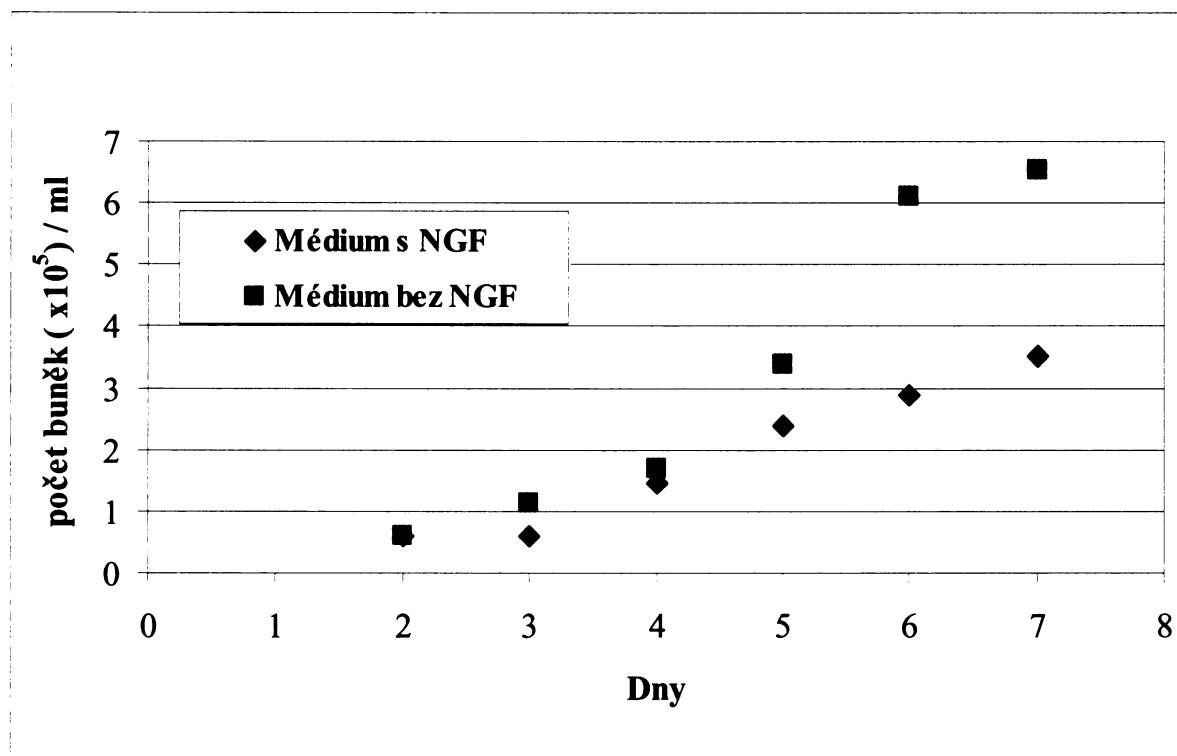
Obr. 3 Buněčná linie PC12

(a) Nediferencované PC12, fotografováno v 6. dnu růstové křivky, hustota buněk byla 6×10^5 buněk/ml média (b) Diferencované PC12, fotografováno v 6. dnu růstové křivky, hustota buněk byla 3×10^5 buněk/ml média

Užitím PEI se zvyšuje schopnost buněk přisedat k buněčným destičkám, zajistí se homogenní rozmístění buněk na destičce a silnější buněčnou adhezí se zvýší odolnost při vazebných pokusech [50].

5.2.2. Měření růstové křivky

Po porovnání růstové křivky buněk PC12 s přidáním NGF (50 ng/ml média) a nediferencovaných buněk byla pozorována stagnace růstu. Růst diferencovaných buněk se přibližně pátý den zastavuje a limituje k určitému počtu buněk [42], což je velmi dobře vidět v grafu č. 1 na následující straně.



Graf č. 1 Růstová křivka nediferencovaných (bez NGF) a diferencovaných (s NGF) PC12 buněk

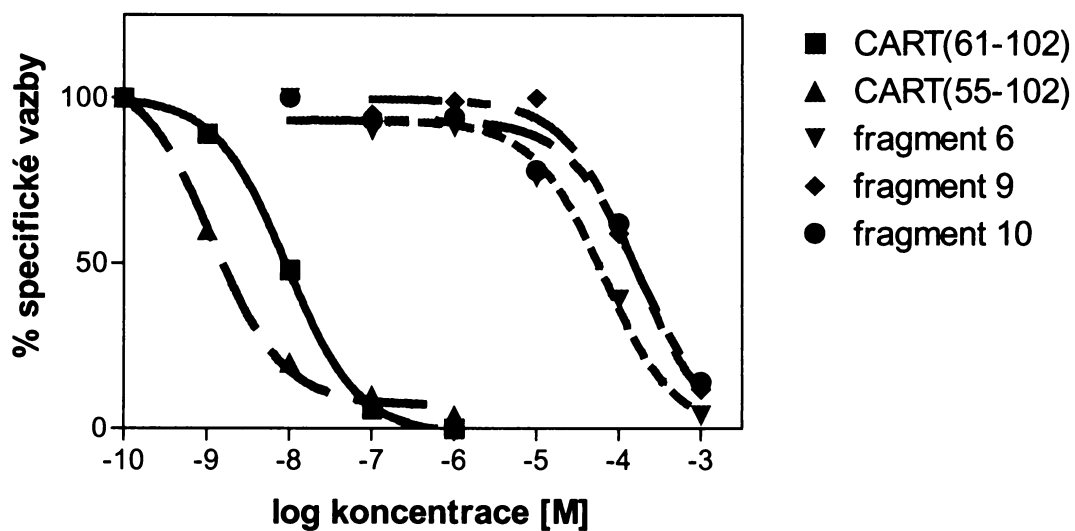
Graf znázorňuje závislost počtu buněk/ml média na čase. 1. den růstové křivky bylo nasazeno 30 tisíc buněk PC12 na jamku, růstová křivka nediferencovaných buněk PC12 a diferencovaných buněk PC12 byla měřena od 2. do 7. dne.

5.3. KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ EXPERIMENTY

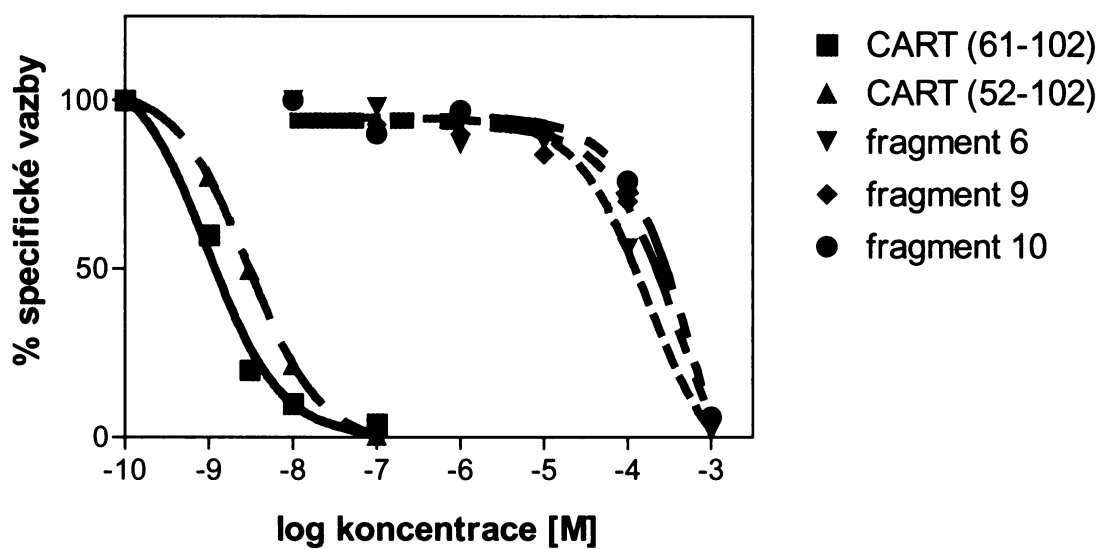
5.3.1. Kompetitivní vazba k nediferencovaným buňkám PC12 a buněčným membránám

Optimalizace pro kompetitivní vazebné pokusy byla provedena již dříve [41].

Při kompetitivních vazebných pokusech byly zachovány stále stejné podmínky, tedy inkubace po dobu 30 minut při 37 °C s 50 µg proteinu/zkumavku v případě buněčných membrán nebo 5x10⁵ buněk/jamku v případě destiček. Vazebné křivky ¹²⁵I-CART(61-102) vytěšňovaného fragmenty peptidů CART k nediferencovaným a diferencovaným buňkám a membránám z nediferencovaných buněk lze vidět v grafech č. 3 a 4 na následující straně.

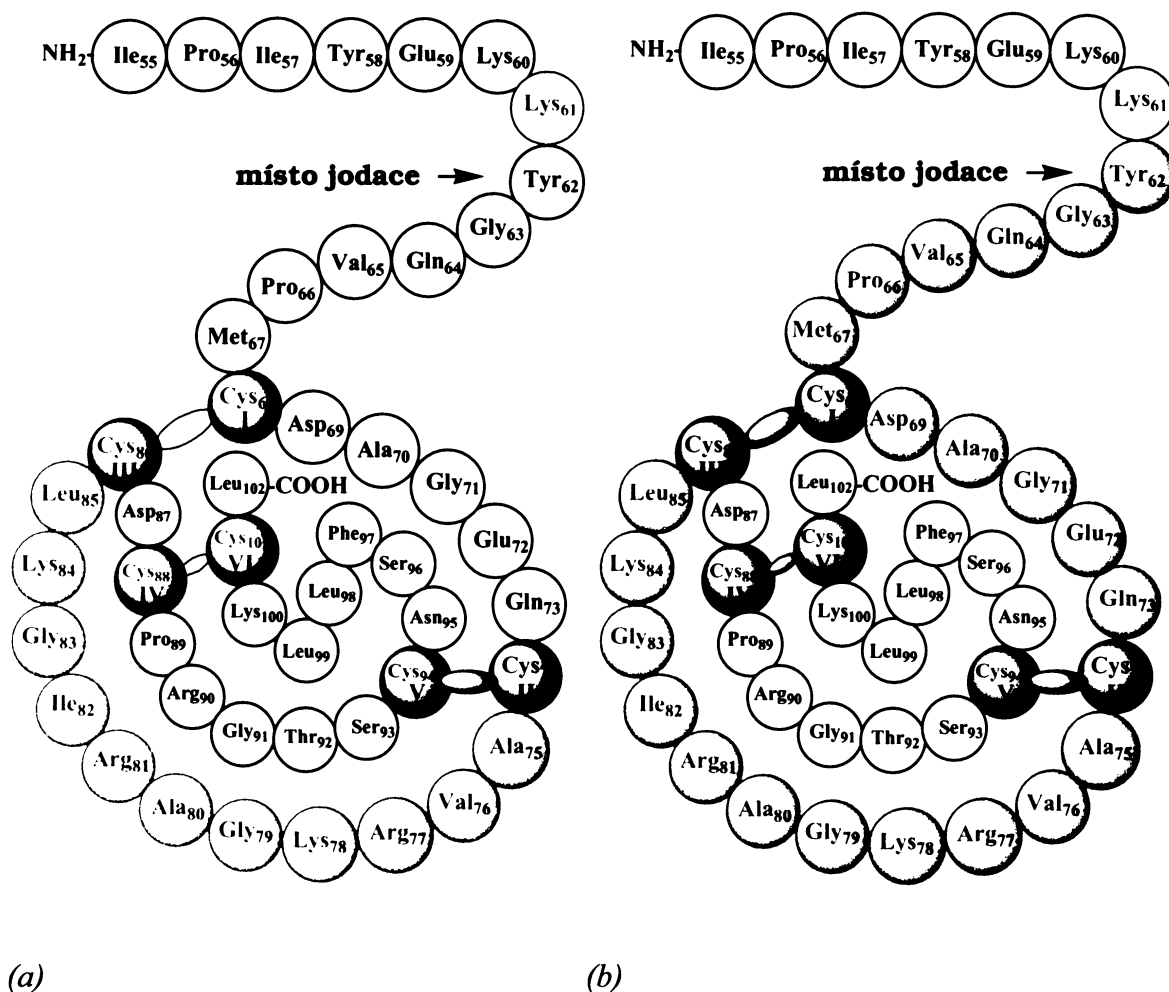


Graf č. 3 Kompetitivní vazebná křivka peptidů CART a jejich fragmentů k nediferencovaným buňkám PC12



Graf č. 4 Kompetitivní vazebná křivka peptidů CART a jejich fragmentů k membránám z nediferencovaných buněk PC12

Vytěsnění radioaktivního ^{125}I -CART(61-102) pomocí CART(61-102), CART(55-102) a fragmentů peptidů CART je popsáno v tabulce č. 2 na straně 27. V kompetitivních vazebných pokusech u nediferencovaných buněk PC12 a buněčných membrán se CART(61-102) a CART(55-102) vázaly s inhibiční konstantou K_i v nízkých hodnotách v rozmezí 10^{-8} M, fragment 6 v rozmezí 10^{-5} M a fragmenty 9 a 10 v rozmezí 10^{-4} M. Zbývající testované analogy nevytěsnily ^{125}I -CART(61-102) ani v koncentraci 10^{-4} M. Na obrázku 4 jsou znázorněny struktury fragmentu 6 a 9.



Obr. 4 Struktura fragmentů CART [16]

(a) Struktura fragmentu 6. Oranžovou barvou je znázorněna vnější strukturální smyčka mezi cysteiny 74 a 86, které jsou spojeny disulfidickou vazbou. (b) Struktura fragmentu 9. Oranžovou barvou je znázorněna vnější strukturální smyčka mezi cysteiny, cysteiny v pozici 68 a 86 tvoří disulfidický můstek (fragment 10 má stejnou strukturu jako fragment 9, neobsahuje však disulfidický můstek).

Tabulka č. 2 Vytěsnění radioaktivního ^{125}I -CART(61-102) pomocí CART(61-102), CART(55-102) a fragmentů peptidů CART

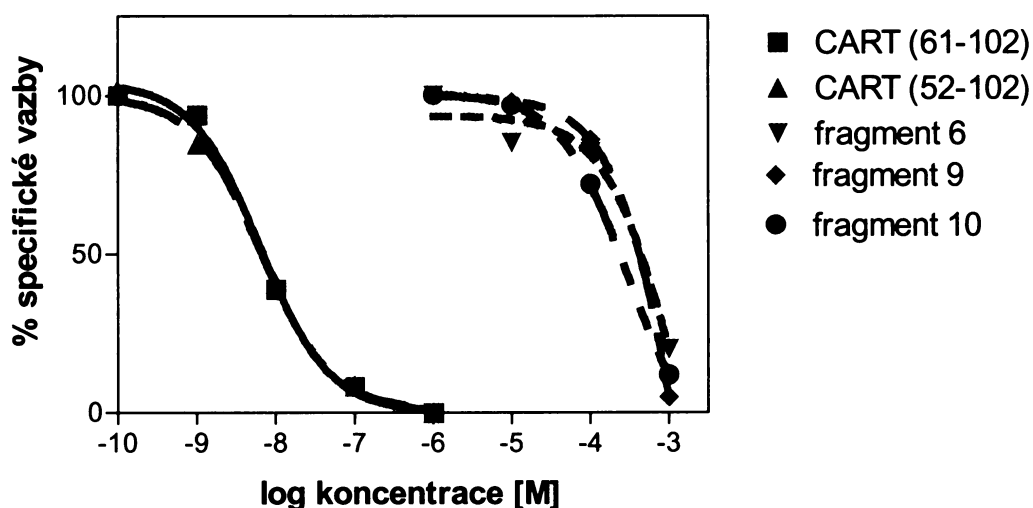
K_i je rovnovážná disociační konstanta inhibujícího kompetitoru v jednotkách mol/l.

Peptid	K _i (mol/l)		
	Membrány z nediferencovaných buněk PC12	Nediferencované buňky PC12 na destičkách	Diferencované buňky PC12 na destičkách
CART(61-102)	$(2,99 \pm 0,65) \times 10^{-9}$	$(1,36 \pm 2,62) \times 10^{-8}$	$(8,01 \pm 2,14) \times 10^{-9}$
CART(55-102)	$(2,98 \pm 0,33) \times 10^{-9}$	$(1,29 \pm 1,65) \times 10^{-8}$	$(5,40 \pm 0,44) \times 10^{-9}$
1	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
2	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
3	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
4	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
5	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
6	$(1,08 \pm 0,38) \times 10^{-5}$	$(7,29 \pm 2,64) \times 10^{-5}$	$(5,00 \pm 0,26) \times 10^{-4}$
7	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
8	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
9	$(3,98 \pm 0,49) \times 10^{-4}$	$(3,96 \pm 0,02) \times 10^{-4}$	$(4,09 \pm 0,06) \times 10^{-4}$
10	$(4,14 \pm 0,56) \times 10^{-4}$	$(1,62 \pm 0,49) \times 10^{-4}$	$(1,26 \pm 0,35) \times 10^{-4}$
11	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
12	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
13	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
14	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$

Tvorba disulfidických můstků u peptidů CART a jejich fragmentů, způsobená spontánní oxidací, byla kontrolována hmotnostní spektrometrií před i po inkubaci podle podmínek důležitých pro vazebné pokusy. Po inkubaci bylo pomocí hmotnostní spektrometrie naměřeno 10% oxidované formy v látkách 8 a 12 a 20% v případě látky 13.

5.3.2. Kompetitivní vazba k diferencovaným buňkám PC12

Buněčná linie PC12 se po přidání NGF úspěšně diferencovala v neuronální fenotyp, jak již bylo dříve popsáno [42]. CART (61-102), CART(55-102) a fragmenty 9 a 10 se k diferencovaným buňkám vázaly s inhibiční konstantou K_i srovnatelnou s nediferencovanými buňkami, jak znázorňuje tabulka č. 2 na straně 27 a graf č. 5. Fragment 6 vytěsňoval ^{125}I -CART(61-102) řádově s vyšší hodnotou K_i u diferencovaných buněk než u nediferencovaných, zaznamenáno v tabulce 2 na straně 27.

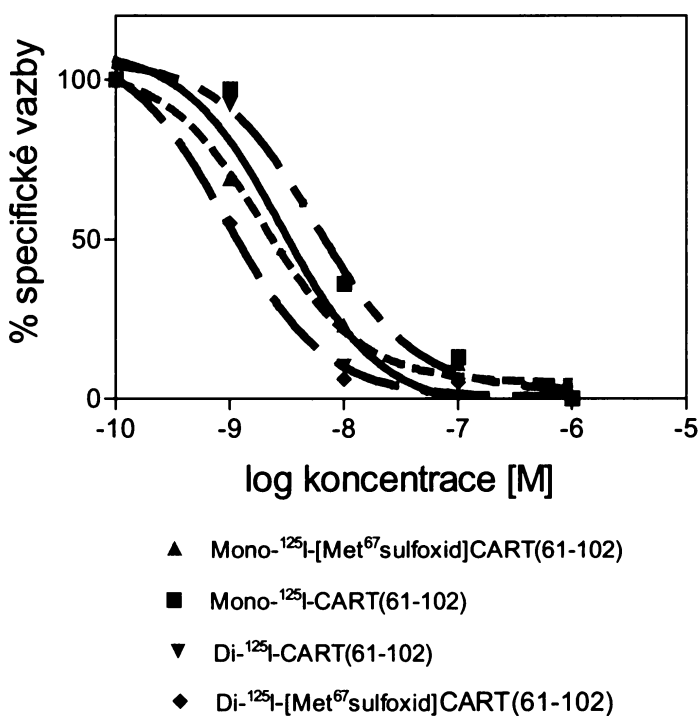


Graf č. 5 Kompetitivní vazebná křivka peptidů CART a jejich fragmentů k diferencovaným buňkám PC12

5.3.3. Kompetitivní vazba radioaktivně značených peptidů CART(61-102) k nediferencovaným buňkám PC12

U vazebných pokusů s různě radioaktivně značeným peptidem CART(61-102) byly použity stejné podmínky jako pro výše zmíněné kompetitivní vazebné pokusy s fragmenty peptidů.

Graf č. 6 znázorňuje výsledné vazebné křivky radioaktivně značených peptidů CART(61-102) k nediferencovaným buňkám PC12. Inhibiční konstanta K_i pro mono-jodovaný ^{125}I -CART(61-102) byla $3,85 \times 10^{-9}$ M, pro mono-jodovaný ^{125}I -CART(61-102) s oxidovaným methioninem (v pozici 67) byla $1,82 \times 10^{-9}$ M, dále pro di-jodovaný ^{125}I -CART(61-102) byla $2,37 \times 10^{-9}$ M a pro di-jodovaný ^{125}I -CART(61-102) s oxidovaným methioninem (v pozici 67) byla $0,86 \times 10^{-9}$ M.



Graf č. 6 Kompetitivní vazebná křivka radioaktivně značených peptidů CART(61-102) k buňkám PC12

K_i byla vypočítána podle rovnice Chenga a Prusoffa [48], kdy koncentrace radioligandu byla 0,1 nM a hodnota K_d byla použita ze saturačních vazebných experimentů [41], kdy pro nediferencované PC12 buňky byla 0,48 nM.

6. DISKUZE

Buněčná linie PC12 je vhodná pro studium kompetitivních vazeb s peptidy CART, neboť bylo zjištěno [41], že peptid CART se k buňkám PC12 specificky váže. Z měření růstové křivky buněk PC12, kdy byl do růstového média přidán NGF o koncentraci 50 ng/ml média se potvrdilo, že se buňky PC12 diferencují v nervovou tkáň. U diferencovaných buněk PC12 se pátý den růst zastavuje, což je způsobeno tvorbou nervových výběžků, axonů.

Kompetitivní vazebné experimenty s CART(55-102) a CART(61-102) vázající se k nediferencovaným buňkám PC12 a buněčným membránám a k diferencovaným buňkám PC12 proběhly za stejných podmínek, jež byly popsány dříve [41]. CART(61-102) a CART(55-102) se vázaly k diferencovaným buňkám PC12 a buněčným membránám s vyšší afinitou než k nediferencovaným buňkám PC12 a to v nízkém nM rozmezí.

Dosud ještě nebyla provedena komplexní studie zabývající se strukturou a aktivitou fragmentů peptidu CART mapující jednotlivé části molekuly.

Jak je patrné z výsledků, v kompetitivních vazebných experimentech byl téměř shodně vytěsňen mono-jodovaný ^{125}I -CART(61-102), mono-jodovaný ^{125}I -CART(61-102) s oxidovaným methioninem (v pozici 67), di-jodovaný ^{125}I -CART(61-102) a di-jodovaný ^{125}I -CART(61-102) s oxidovaným methioninem (v pozici 67) stoupající koncentrací CART(61-102). Tento výsledek koresponduje se studií, která byla provedena již dříve, kdy se ukázalo, že di-jodace CART(61-102) nijak nemění afinitu peptidu k buňkám PC12 [41]. Di-jodovaný CART(61-102) byl vázán k buňkám PC12 a buněčným membránám s podobnou afinitou jako CART(61-102), tedy v nízkém nM rozmezí. Pro všechny vazebné pokusy byl pak použit mono-jodovaný ^{125}I -CART(61-102), který tvořil největší frakci ze všech čtyř jodovaných peptidů.

Fragmenty peptidu CART byly syntetizovány tak, aby odpovídaly strukturálním smyčkám mezi jednotlivými cysteiny. Fragmenty 1 až 5 kopírují aminokyselinovou sekvenci CART(61-102) mezi disulfidickými můstky, kde cysteiny byly nahrazeny glycinem. Tyto látky nevytěsňovaly ^{125}I -CART(61-102) na buňkách PC12 a membránách v rozmezí testovaných koncentrací. Fragmenty 6 a 7 (cyklické analogy fragmentu 3), lišící se dokonce jen v C-koncové skupině, vykazují odlišnou vazbu. Zatímco se fragment 7 s karboxylovou skupinou na C-konci neváže k buňkám PC12, peptid s amidovou skupinou na C-konci, tedy fragment 6 se vázal k nediferencovaným buňkám s K_i v rozmezí 10^{-5} M a k diferencovaným s K_i v rozmezí 10^{-4} M. Molekuly 9 a 10 jsou prodlouženou verzí

fragmentu 6, liší se navzájem jen v pozici disulfidických vazeb. Byla u nich sledována srovnatelná afinita jak k nediferencovaným, tak k diferencovaným buňkám, která byla o něco málo nižší než u fragmentu 6. Fragment 8 (lineární analog molekuly 9 a 10) se nevázal specificky k buňkám PC12.

Lineární fragment 11 a jeho derivát 12 byly odvozeny od fragmentu CART(62-76), jehož biologická aktivita byla publikována již dříve [33, 36]. Podle této studie peptidy CART(55-76) a (62-76) po intracerebroventrikulárním podání snižovaly příjem potravy u potkanů. Nicméně však nebylo popsáno, zda se SH skupiny peptidů během pokusu oxidují nebo nikoliv. Fragment 11 měl volné cysteiny, fragment 12 měl pak cysteiny v pozici 68 a 74 chráněny skupinou AcM. Linearita tohoto fragmentu byla potvrzena hmotnostní spektrometrií [44]. Žádný z nich se k nediferencovaným ani diferencovaným buňkám PC12 a membránám nevázal.

Poslední dva testované fragmenty 13 a 14 byly syntetizovány za účelem ověřit studii, jež byla provedena v roce 1996 [37, 38]. Dylag a kol. syntetizoval C-koncové deriváty CART(55-102) s redukovanými thiolovými skupinami, jeden byl lineární (odpovídá našemu fragmentu 13 podle tabulky 1) a druhý cyklický (odpovídá fragmentu 14 podle tabulky 1). Lineární fragment byl schopen inhibovat lokomoční aktivitu (zvýšenou schopnost pohybu) vyvolanou po podání kokainu a amfetaminu po intracerebroventrikulárním podání myším [38]. Je známo, že přirozeně se vyskytující CART(55-102) snižuje lokomoci po podání kokainu a amfetaminu do nucleu accumbens potkanů [51, 52]. Ovšem srovnání těchto dvou studií je velmi komplikované, neboť se porovnává účinnost peptidů, které byly zkoumány na jiných zvířecích druzích, navíc po podání do odlišných mozkových oblastí. V naší práci byla linearita fragmentů 13 kontrolována během vazebného experimentu pomocí hmotnostní spektrometrie [44]. Jak ukazují výsledky, žádný z těchto dvou fragmentů nevytěsňoval ^{125}I -CART(61-102) ani v koncentraci 10^{-4} M.

Naše výsledky vedou k závěru, že kompaktní struktura s disulfidickými můstky je nesmírně důležitá pro zachování specifické vazby molekuly CART(61-102) k vazebnému místu na buňkách PC12. Ze všech testovaných fragmentů, pouze analogy CART(74-86) a CART(62-86), obsahující disulfidické můstky mezi cysteiny v pozici 74-86 nebo 68-86, vykazovaly slabou afinitu k buňkám PC12. Struktura těchto fragmentů je znázorněna na obrázku č. 4 na straně 26.

Z výsledků měření týkajících se fragmentů s N-koncem, které tvořily vnější smyčku, se dá usuzovat, že biologická aktivita peptidů CART je do jisté míry spojena s N-koncovou smyčkou molekuly spíše než s C-koncové.

Hojnost výskytu peptidů CART v CNS a v periférii naznačuje, že tyto peptidy mají mnohočetné role v organismu, což také může znamenat, že v savčím organismu existuje několik receptorů pro peptidy CART a tak i vazebná místa s různou afinitou pro fragmenty peptidu CART.

7. SOUHRN

U fragmentů peptidů CART odpovídající strukturálním smyčkám mezi jednotlivým cysteiny molekuly CART(61-102) byla zkoumána kompetitivní vazba k diferencovaným a nediferencovaným buňkám PC12 a buněčným membránám z nediferencovaných buněk. Kompaktní struktura peptidu s třemi disulfidickými můstky je nezbytná pro zachování vysoké vazebné afinity k buňkám PC12 a buněčným membránám.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Douglass, J., McKinzie, A.A., Couceyro, P.: *J. Neurosci.* 15, 2471-2481 (1995)
2. Spiess, J., Villarreal, J., Vale, W.: *Biochemistry* 20, 1982-1988 (1981)
3. Hunter, R.G., Philpot, K., Vicentic, A., Dominguez G., Hubert, G.W., Kuhar, M.J.: *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 454-459 (2004)
4. Broberger, C.: *Drug Dev. Res.* 51, 124-142 (2000)
5. Philpot, K.B., Kuhar, M.J.: CART peptide and ingestive behavior, v knize *Handbook of Biologically Active Peptides* (Kastin, A.J. ed.) Elsevier, Holandsko, str. 697-703 (2006)
6. Wierup, N., Sundler, F.: *Peptides* 27, 2031-2036 (2005)
7. Kuhar, M.J.: *Peptides* 27, 1911-1912 (2006)
8. Couceyro, P.R., Koylu, E.O., Kuhar, M.J.: *J. Chem. Neuroanat.* 12, 229-231 (1997)
9. Koylu E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., Ling, N.C., DeSouza, E.B., Kuhar, M.J.: *J. Neuroendocrinol.* 9, 823-833 (1997)
10. Dun, S.L., Brailoiu, C.G., Yang, J., Chang, J.K., Dun, N.J.: *Peptides* 27, 1949-1955 (2006)
11. Jensen, P.B., Kristensen, P., Clausen, J.T., Judge, M.E., Hastrup, S., Thim, L., Wulff, B.S., Foged, C., Jensen, J., Holst, J.J., Madsen, O.D.: *FEBS Lett.* 447, 139-143 (1999)
12. Wierup, N., Bjorkqvist, M., Kuhar, M.J., Mulder, H., Sundler, F.: *Diabetes* 55, 305-311 (2006)
13. Ekblad, E.: *Peptides* 27, 2024-2030 (2006)
14. Douglass, J., McKinzie, A.A., Couceyro, P.: *J. Neurosci.* 15, 2471-2481 (1995)
15. Cowles, R.A., Segura, B.J., Mulholland, M.W.: *Regul. Pept.* 99, 61-68 (2001)
16. Thim, L., Nielsen, P.F., Judge, M.E., Andersen, A.S., Diers, I., Egel-Mitani, M., Hastrup, S.: *FEBS Lett.* 428, 263-268 (1998)
17. Ludvigsen, S., Thim, L., Blom, A.M., Wulff, B.S.: *Biochemistry* 40, 9082-9088 (2001)
18. Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J., Hastrup, S.: *Nature* 393, 72-76 (1998)
19. Couceyro, P.R., Fritz, T.: *Protein Expr. Purif.* 32, 195-193 (2003)

20. Larsen, P.J., Vrang, N., Petersen, P.C., Kristensen, P.: *Obes. Res.* 8, 590-596 (2000)
21. Rohner-Jeanrenaud, F., Craft, L.S., Bridwell, J., Suter, T.M., Tinsley, F.C., Smiley, D.L., Burkhart, D.R., Statnick, M.A., Heiman, M.L., Ravussin, E., Caro, J.F.: *Int J Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 143-149 (2002)
22. Asnicar, M.A., Smith, D.P., Yang, D.D., Heiman, M.L., Fox, N., Chen, Y.F., Hsiung, H.M., Koster, A.: *Endocrinology* 142, 4394-4400 (2001)
23. Vicentic, A., Dominguez, G., Hunter, R.G., Philpot, K., Wilson, M., Kuhar, M.J.: *Endocrinology* 145, 4119-24 (2004)
24. Koylu, E.O., Balkan, B., Kuhar, M.J., Pogun, S.: *Peptides* 27, 1956-1969 (2006)
25. Stanek, L.M.: *Peptides* 27, 2005-2011 (2006)
26. Fekete, C., Lechan, R.M.: *Peptides* 27, 2012-2018 (2006)
27. <http://speakingoffaith.publicradio.org/programs/stress/images/stressresponse.jpg>
28. Stanley, S.A., Small, C.J., Murphy, K.G., Rayes, E., Abbott, C.R., Seal, L.J., Morgan, D.G.A., Sunter, D., Dakin, C.L., Kim, M.S., Hunter, R., Kuhar, M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R.O.V.: *Brain Res.* 893, 186-194 (2001)
29. Smith, S.M., Vaughan, J.M., Donaldson, C.J., Rivier, J., Li, C., Chen, A., Vale, W.W.: *Endocrinology* 145, 5202-5209 (2004)
30. Fekete, C., Mihaly, E., Luo, L.G., Kelly, J., Clausen, J.T., Mao, O., Rand W.M., Moss, L.G., Kuhar, M., Emerson, C.H., Jackson, I.M., Lechan, R.M.: *J. Neurosci.* 20, 9224-9234 (2000)
31. Bannon, A.W., Seda, J., Carmouche, M., Francis, J.M., Jarosinski, M.A., Douglass, J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229, 1021-1026 (2001)
32. Thim, L., Kristensen, P., Nielsen, P.F., Wulff, B.S., Clausen, J.T.: *Biochemistry* 96, 2722-2727 (1999)
33. Lambert, P.D., Couceyro, P.R., McGirr, K.M., Dall Vechia, S.E., Smith, Y., Kuhar, M.J.: *Synapse* 29, 293-298 (1998)
34. Lakatos, A., Prinster, S., Vicentic, A., Hall, R.A., Kuhar, M.J.: *Neurosci. Lett.* 384, 198-202 (2005)
35. Vicentic, A., Lakatos, A., Jones, D.: *Peptides* 27, 1934-1937 (2006)
36. Kask, A., Schioth, H.B., Mutulis, F., Wikberg, J.E.S., Rago, L.: *Brain Res.* 857, 283-285 (2000)
37. Dylag, T., Kotlinska, J., Rafalski, P., Pachuta, A., Silberring, J.: *Peptides* 27, 1926-1933 (2006)

38. Dylag, T., Rafalski, P., Kotlinska, J., Silberring, J.: *Peptides* 27, 3183-3192 (2006)
39. Vicentic, A., Lakatos, A., Kuhar, M.J.: *Eur. J. Pharmacol.* 528, 188-189 (2005)
40. Keller, P.A., Compan, V., Bockaert, J., Giacobino, J.P., Charnay, Y., Bouras, C., Assimacopoulos-Jeannet, F.: *Peptides* 27, 1328-1334 (2006)
41. Maletínská, L., Maixnerová, J., Matyšková, R., Haugvicová, R., Šloncová, E., Elbert, T., Slaninová, J., Železná, B.: *Eur. J. Pharmacol.* 559, 109-114 (2007)
42. Greene, L.A., Tischler, A.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2424-2428 (1976)
43. Bocchini, V., Angeletti, P.U.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 787-794 (1969)
44. Maixnerová, J., Hlaváček, J., Blokešová, D., Kowalczyk, W., Elbert, T., Šanda, M., Blechová, M., Železná, B., Slaninová, J., Maletínská, L.: odesláno do *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2007)
45. Fraker, P.J., Speck, J.C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849-857 (1978)
46. Tvrdoň, M.: v knize *Mikrobiologie pro 2. ročník SŠP*, SNTL, Praha, str. 139-140 (1982)
47. Motulsky H., Neubig R.: *Current. Protoc. Neurosci.* 19, 7.5.1-7.5.56 (1997)
48. Chang, C.H., Cheng, Y.C.: *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3188 (1978)
49. Bradford, M.M.: *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
50. Vancha, A.R., Govindaraju, S., Parsa, K.V.L., Jasti, M., González-García, M., Ballester, R.P.: *BMC biotechnology* 4, 1472-6750 (2004)
51. Jaworski, J.N., Kozel, M.A., Philpot, K.B., Kuhar, M.J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 1038-1044 (2003)
52. Kim, J.H., Creekmore, E., Vezina, P.: *Neuropeptides* 37, 369-373 (2003)
53. *Abbreviations and Symbols*, *Eur. J. Biochem.* 74, 1-6 (1977)

