

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Nové analogy anorexigenních neuropeptidů ovlivňujících příjem
potravy**

New analogs of anorexigenic neuropeptides involved in food intake
regulation

Mgr. Veronika Pražienková

Praha, 2016

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

Školitel: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Konzultant: prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Oponenti: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: 21. 9. 2016 ve 14:30 hod

kde: zasedací místnost děkanátu 1. LF UK, Na Bojišti 3, Praha 2

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

OBSAH

OBSAH	3
ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
SEZNAM ZKRATEK	6
1. ÚVOD	7
1.1 Peptid CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript)	7
1.2 PrRP (prolactin-releasing peptide)	8
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	9
3. MATERIÁL A METODY	10
3.1 Syntéza peptidů a jodace	10
3.2 Metody týkající se peptidu CART a jeho analogů prováděné <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	11
3.3 Metody týkající se PrRP a jeho lipidovaných analogů	12
3.4 Statistické vyhodnocení	13
4. VÝSLEDKY	13
4.1 Peptid CART	13
4.2 Studium lipidovaných analogů PrRP	15
5. DISKUSE	19
5.1 Peptid CART a jeho analogy	19
5.2 PrRP a jeho nové lipidované analogy	20
ZÁVĚR	23
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	24
SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ	26

ABSTRAKT

Disertační práce je zaměřena na studium anorexigenních neuropeptidů, peptidu kokainem a amfetaminem regulovaného transkriptu (CART) a peptidu uvolňujícího prolaktin (PrRP), které snižují příjem potravy a tělesnou hmotnost.

Peptid CART je anorexigenní neuropeptid, u kterého přes všechny snahy nebyl nalezen jeho receptor. Peptid CART je schopen vázat se na buněčnou linii PC12. Buňky PC12 diferencované v neuronový fenotyp vykazují vyšší počet vazebných míst oproti nediferencovaným buňkám. Buňky PC12 diferencované dexametasonem na chromafinní buňky vykazují vysokou nescifickou vazbu a tím velmi nízký počet vazebných míst. Pro objasnění důležitosti disulfidových můstků ve struktuře peptidu CART byly syntetizovány analogy s jedním či dvěma disulfidovými můstky. Biologická aktivita byla zachována u analogu se dvěma disulfidovými můstky v pozici 74-94 a 88-101. Při zkoumání buněčné signalizace u buněk PC12 peptid CART významně zvýšil aktivaci c-Jun a fosforylaci JNK, která předchází dráze c-Jun.

PrRP patří do rodiny RF-amidových peptidů, u něhož byl potvrzen anorexigenní účinek. PrRP se váže na svůj receptor GPR10 a vykazuje vysokou afinitu i k receptoru pro neuropeptid FF (NPFF2). V naší laboratoři byly navrženy lipidované analogy PrRP, které po periferním podání snižují příjem potravy, a u kterých je předpokládán přestup přes hematoencefalickou bariéru.

Byla testována biologická aktivita nových lipidovaných analogů PrRP s myristovou nebo palmitovou kyselinou na N-konci a se změnami za Phe³¹ za jiné aromatické nekódové aminokyseliny na C-konci, a to *in vitro* a *in vivo*. Lipidované analogy se vážou s vysokou afinitou k hypofyzární buněčné linii RC-4B/C a ke GPR10 či NPFF2 receptoru. Navíc byla prokázána vazba lipidovaných analogů, nikoliv však přirozeného PrRP, na receptor neuropeptidu Y - Y5, který vykazuje homologii s GPR10.

Lipidované analogy PrRP31 výrazně a dlouhodobě snižovaly příjem potravy u hladových myší. Analogy palm-PrRP31, myr-PrRP20 a palmitoylovaný analog PheCl₂³¹ byly dlouhodobě testovány na myších s dietou indukovanou obezitou a snížily výrazně hmotnost, příjem potravy a zlepšovaly metabolické parametry spojené s obezitou. Studium biologické aktivity lipidovaných analog PrRP a pochopení mechanismu jejich transportu je důležité pro jejich využití jako potenciálních antiobezitik.

ABSTRACT

This work focuses on anorexigenic neuropeptides, cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and prolactin-releasing peptide (PrRP), which decrease food intake and body weight.

CART peptide is an anorexigenic neuropeptide and, despite many efforts, its receptor has not yet been identified. We found CART peptide specific binding sites in pheochromocytoma PC12 cells. Cells differentiated to neurons increased significantly the number of binding sites. On the other hand, after differentiation to chromaffin cells the number of binding sites was so low that it was impossible to determine their density. To clarify the importance of each of the three disulfide bridges in the CART molecule, analogs with one or two disulfide bridges were synthesized. The biological activity was maintained in analog with two disulfide bridges in positions 74-94 and 88-101. Moreover, we demonstrated the stimulation of JNK and subsequently c-Jun activation in PC12 cells.

Neuropeptide PrRP belongs to the RF-amide peptide family and has anorexigenic properties. PrRP has a high affinity to GPR10 and neuropeptide FF (NPFF2) receptor. In our laboratory lipidized analogs of PrRP were synthesized, which are able to decrease food intake after peripheral administration and may cross the blood-brain barrier.

We tested biological activity of novel lipidized analogs of PrRP with myristic or palmitic acid on the N-terminus of the chain and with C-terminal modification of Phe³¹ by non-coded amino acids *in vitro* and *in vivo*. Lipidized PrRP analogs have a high affinity to RC-4B/C cells and to both GPR10 and NPFF2 receptors. Moreover, lipidized PrRP analogs, with the exception of native PrRP, have a high affinity to neuropeptide Y receptor – Y5, which shows homology to GPR10.

Lipidized analogs showed a significant and long-term effect on decreasing food intake. Palm-PrRP31, myr-PrRP20 and analog with PheCl₂³¹ were tested for two weeks on diet-induced obese mice. They decreased food intake and body weight significantly and improved some metabolic parameters related to the obesity. Research on biological activity of lipidized PrRP analogs and the understanding of its transportation mechanism is important because of their potential use as treatment of obesity.

SEZNAM ZKRATEK

ACACA	acetyl-CoA karboxylasa 1
BAT	hnědá tuková tkáň
BPTI	hovězí pankreatický trypsinový inhibitor
CART	kokainem a amfetaminem regulovaný transkript
CREB	protein vázající responzivní element pro cyklický adenosin monofosfát
DEX	dexametason
DIO	dietou indukovaná obezita
Erk	extracelulárně regulovaná kinasa
FASN	syntasa mastných kyselin
GLP-1	peptid podobný glukagonu
GPR10	hGRP3, UHR-1, receptor spřahující G protein 10
HF	vysokotuková
ICV	intracerebroventrikulární
IPAT	vnitrobřišní tuk
JNK	c-Jun N-koncová kinasa
mAb	monoklonální protilátka
NGF	nervový růstový faktor
NPFF	neuropeptid FF
NPFF2	receptor 2 pro neuropeptid FF
NPY	neuropeptid Y
PACAP	hypofyzární peptid aktivující adenylátcyklázu
PCR	polymerázová řetězová reakce
PrRP	peptid uvolňující prolaktin
PYY	peptid YY
SCAT	podkožní tuk
SREBP	protein vázající sterolový regulační element

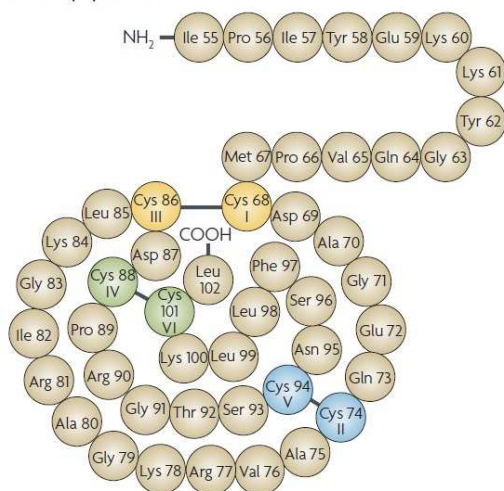
1. ÚVOD

Tato disertační práce je zaměřena na studium anorexigenních neuropeptidů, peptidu kokainem a amfetaminem regulovaného transkriptu (CART) a peptidu uvolňujícího prolaktin (PrRP), které snižují příjem potravy a tělesnou hmotnost.

1.1 Peptid CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript)

CART byl poprvé popsán v roce 1995 pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) (Douglass et al., 1995). V roce 1998 Thim a kol. purifikovali a charakterizovali rekombinantně vyrobené peptidy CART, které byly exprimovány kvasinkami po vložení cDNA kódující CART (Thim et al., 1998). Z propeptidu proCART vznikají dva biologicky aktivní peptidy CART 55-102 a CART 62-102 (obrázek 1) (Rogge et al., 2008).

Struktura peptidu CART 55-102



Obrázek 1: Struktura peptidu CART 55-102

Přirozený biologicky aktivní peptid CART 55-102 obsahuje tři disulfidové můstky mezi cysteiny v pozicích 68-86 (I-III), 74-94 (II-V) a 88-101 (IV-VI) (Rogge et al., 2008; Thim et al., 1998).

Naše skupina prokázala specifickou vazbu peptidu CART 61-102 na potkaní feochromocytomovou buněčnou linii PC12 a buňky PC12 diferencované v neuronový fenotyp pomocí nervového růstového faktoru (NGF) (Maletínská et al., 2007).

Sarkar a kol. zjistili, že CART výrazně zvyšuje fosforylaci proteinu vázajícího responzivní element pro cyklický adenosinmonofosfát (CREB) v hypothalamu sytých i hladových potkanů (Sarkar et al., 2004). Z in vitro studií na myší hypofyzární buněčné linii AtT20 a potkaní hypofyzární buněčné linii GH3 bylo zjištěno, že peptid CART rovněž zvyšuje fosforylaci extracelulárně regulované kinasy (Erk1/2). V naší skupině jsme zopakovali tyto experimenty, avšak nebyla nalezena specifická vazba peptidu CART, ani signalizace popsaná účinkem peptidu CART (nepublikované výsledky).

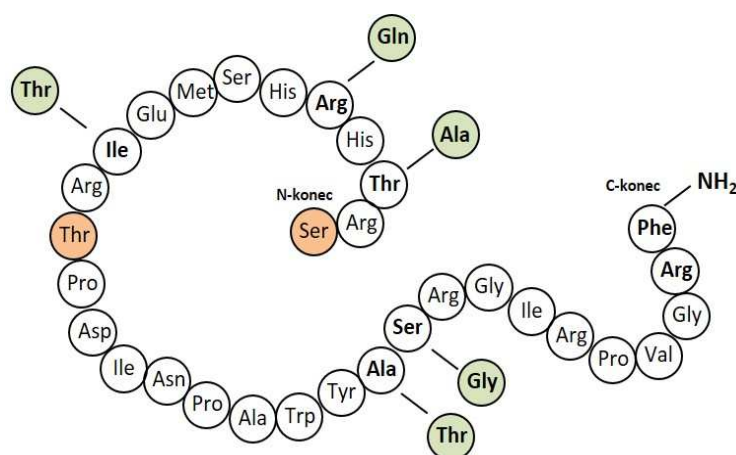
První studie účinků peptidu CART byla provedena Kristensenem a kol., kdy po intracerebroventrikulárním (ICV) podání peptidu CART došlo ke snížení příjmu potravy

u hladových i sytých potkanů (Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1998). V naší laboratoři byl rovněž prokázán anorexigenní účinek peptidu CART 61-102 (Maletínská et al., 2007).

1.2 PrRP (prolactin-releasing peptide)

Peptid uvolňující prolaktin (PrRP) byl objeven Hinumou a kol. v roce 1998 v hypothalamu jako ligand receptoru spřahujícího G protein 10 (GPR10) (Hinuma et al., 1998; Marchese et al., 1995). PrRP se nachází především v mozku a jen nízkou koncentrací můžeme nalézt v periférii (Fujiwara et al., 2005; Onaka et al., 2010; Yasui et al., 2001).

PrRP patří do rodiny RF-amidových peptidů, která obsahuje C-koncovou aminokyselinovou sekvenci Arg-Phe-NH₂ (Hinuma et al., 1998; Quillet et al., 2016; Takayanagi and Onaka, 2010). Prepropeptid obsahuje dvě štěpná místa, ze kterých vznikají dva peptidy PrRP31 a PrRP20 (obrázek 2), které mají identickou c-koncovou sekvenci.



Obrázek 2: Struktura PrRP31 a PrRP20

Zvýrazněným Ser začíná PrRP31 a zvýrazněný Thr označuje místo, kde začíná krátká forma PrRP20. Zeleně zvýrazněné aminokyseliny označují místa, kde jsou změny v sekvenci potkaního PrRP oproti lidskému PrRP.

Bylo zjištěno, že PrRP se váže nejen na svůj receptor GPR10, ale byla prokázána vysoká afinita k lidskému receptoru pro neuropeptid FF 2 (NPFF2), jen o řád nižší než má přirozený ligand neuropeptid FF (NPFF) (Engstrom et al., 2003; Maletinska et al., 2013).

V počátku byl PrRP považován za faktor, který spouští sekreci prolaktinu *in vitro* u buněčné linie RC-4B/C a v buňkách adenohypofýzy (Hinuma et al., 1998). Další studie však prokázaly účinek PrRP na snižování příjmu potravy a tělesnou hmotnost, zvýšení energetického výdeje po ICV podání (Ellacott et al., 2002; Lawrence et al., 2000).

Boyle a kol. provedli strukturně-aktivitní studii *in vitro* na analogích PrRP19-31 (Boyle et al., 2005). Bez ztráty biologické aktivity může být provedena modifikace v aromatickém kruhu Phe³¹ (Boyle et al., 2005; Maletinska et al., 2011b).

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

V první části má tato práce přispět k identifikaci dosud neznámého receptoru pro peptid CART s využitím nových analogů peptidu CART.

1. Zjistit, zda a v jaké míře jsou exprimována vazebná místa pro peptid CART v buňkách PC12 přirozených a diferencovaných na neuronový nebo chromafinní fenotyp.
2. Identifikovat signalizační dráhu, kterou peptid CART potenciálně aktivuje v buňkách PC12, k nimž se specificky váže.
3. Stanovit význam jednotlivých disulfidových můstků pro biologickou aktivitu peptidu CART.

Ve druhé části má tato práce specifikovat biologickou aktivitu lipidovaných analogů peptidu PrRP vzhledem k promiskuitní povaze přirozeného PrRP, který se s podobnou afinitou váže ke dvěma receptorům: GPR10 a NPFF2. Vzhledem k podobnosti receptoru GPR10 a Y5, receptoru pro neuropeptid Y (NPY), sledovat afinitu přirozeného PrRP i jeho lipidovaných analogů k tomuto receptoru.

4. Srovnat afinitu lipidovaných analogů PrRP a přirozeného peptidu PrRP k buňkám exprimujícím spontánně GPR10 i NPFF2 nebo k buňkám s transfekovaným GPR10 či NPFF2 a dále testovat aktivaci GPR10 receptoru.
5. Otestovat afinitu přirozeného PrRP a jeho vybraných lipidovaných analogů PrRP na buňkách s transfekovaným Y5 receptorem.
6. Lipidované analogy PrRP s modifikovanými C-koncovými aminokyselinami otestovat v krátkodobém účinku na příjem potravy.
7. Na základě stanovení anorexigenních vlastností lipidovaných analogů PrRP po akutním podání určit dlouhodobý účinek těchto analogů na obezitu a s ní spojené metabolické odchylky u myši krmených vysokotukovou dietou.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Syntéza peptidů a jodace

Potkaní peptid CART 61-102 byl obdržen jako dar od firmy Novo Nordisk. Lidský peptid YY (PYY) a prasečí NPY byly zakoupeny u firmy PolyPeptide group (Limhamn, Švédsko). Sekvence jsou uvedeny v tabulce 1. Většina peptidů (tabulka 1) byla syntetizována na ÚOCHB v laboratoři peptidové syntézy Ing. Blechovou (Blechová et al., 2013). Lipidizace analogů PrRP byla prováděna jako poslední krok (Maletinska et al., 2012). Peptidy byly značeny pomocí Na¹²⁵I a jodace peptidu byla prováděna pomocí činidla IODO-GENTM dle pokynů výrobce (Maletinska et al., 2012).

Tabulka 1: Sekvence peptidů

Název	Sekvence
CART 61-102	<p>61 68 74 86 88 94 101</p> <p>KYGQVPMCDAGEQCAVRKGGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL</p>
Nle⁶⁷ CART 61-102	<p>61 67 68 74 86 88 94 101</p> <p>KYGQVP Nle CDAGEQCAVRKGGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL</p>
[Ala^{68,86}] CART 61-102	<p>61 68 74 86 88 94 101</p> <p>KYGQVPMADAGEQCAVRKGGARIGKLADCPGTSCNSFLLKCL</p>
potkaní rPrRP31	S RAHQHS M ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
Nle-PrRP31	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
myr-PrRP31	(N-myr) S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
palm-PrRP31	(N-palm) S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
K¹¹palm-hPrRP31	SR THRHS MEIK (N-palm) TPDINPAWYASRGIRPVGRF- NH ₂
analog 1	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR 1-Nal -NH ₂
analog 2	(N-myr) S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR 1-Nal -NH ₂
analog 3	(N-palm) S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR 1-Nal -NH ₂
analog 4	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheCl₂ -NH ₂
analog 5	(N-myr) S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheCl₂ -NH ₂
analog 6	(N-palm) S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheCl₂ -NH ₂
analog 7	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheNO₂ -NH ₂
analog 8	(N-myr) S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheNO₂ -NH ₂
analog 9	(N-palm) S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheNO₂ -NH ₂
analog 10	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheF₅ -NH ₂

analog 11	(N-palm)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheF ₅ -NH ₂
analog 12	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR Tyr-NH ₂
analog 13	(N-palm)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR Tyr-NH ₂

Zkratky: norleucin (nle), naftylalanin (1-Nal), dichlorofenylalanin (PheCl₂), nitrofenylalanin (PheNO₂); pentafluorofenylalanin (PheF₅), palmitoyl (palm), myristoyl (myr)

3.2 Metody týkající se peptidu CART a jeho analogů prováděné *in vitro* a *in vivo*

3.2.1 Kompetitivní a saturační vazebné experimenty

Saturační a kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny dle dříve optimalizovaných podmínek (Maletínská et al., 2007). Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny s peptidem CART 61-102 a s analogy Nle⁶⁷ CART 61-102 a [Ala^{68,86}] CART 61-102 ve stejných podmínkách jako pro saturační experimenty. Po inkubaci byly buňky promyty a solubilizovány v 0,1 M NaOH. Radioaktivita byla určena pomocí gamma-čítače Wizard 1470 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

3.2.2 Stanovení signalizačních drah pomocí imunoblotu

V každé jamce byly buňky PC12 inkubovány se samotnými látkami CART 61-102, Nle⁶⁷ CART 61-102 o finální koncentraci 10⁻⁶ M, nebo NGF 50 ng/ml, v kombinaci s inhibitory SP600125 (inhibitor c-Jun N-koncové kinasy, JNK) o koncentraci 10⁻⁵ M či se samotnými inhibitory po dobu 10 nebo 60 min při 37°C. Buňky byly na ledu třikrát promyty ledovým fosfátovým pufrem a solubilizovány lyzačním pufrem. Dále byla provedena elektroforéza a přenos na polyvinyliden difluoridovou membránu dle (Nagelova et al., 2014). Membrány byly blokovány a poté inkubovány 1 hod s příslušnou primární protilátkou: fosfo-SAPK/JNK králičí mAb, SAPK/JNK králičí mAb, c-Jun králičí mAb v ředění 1:1000 nebo aktin králičí mAb v ředění 1:2000 (Cell signalling Technology, MA, USA). Po promytí byly membrány inkubovány 1 hod při pokojové teplotě s myší nebo králičí sekundární protilátkou značenou peroxidázou, naředěnou 1:2000. Chemiluminiscence byl detekována pomocí Chemi Doc™ Systém (Bio-Rad, CA, USA). Intenzita proužků byla kvantifikována programem Image Lab™ Software (Bio-Rad, CA, USA) a normalizována pomocí aktinu.

3.2.3 Příjem potravy po ICV podání peptidu CART a jeho analogů

Pokus probíhal na myších samcích kmene C57BL/6. V 8:00 ráno v den pokusu byl přes noc hladovým myším, ICV podán fyziologický roztok, peptid CART 61-102, resp. Nle⁶⁷ CART 61-102 v dávce 1 µg/myš nebo analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 v dávce 1 a 5 µg/myš (n = 5).

3.3 Metody týkající se PrRP a jeho lipidovaných analogů

3.3.1 Kompetitivní vazebné experimenty

Pro kompetitivní vazebné experimenty byly buňky RC-4B/C nasazeny na 24-jamkové destičky potažené polylysinem dle metody optimalizované dříve (Maletinska et al., 2013). Vazebné experimenty na membránách s lidským NPFF2 receptorem byly prováděny dle pokynů výrobce (Maletinska et al., 2013). Buňky CHO-K1 s transfekovaným lidským GPR10 byly nasazeny na 24-jamkové destičky v hustotě 3000 buněk/jamku. Buňky byly inkubovány ve vazebném pufru s 0,03 nM ^{125}I -hPrRP31 a s peptidy o koncentraci 10^{-11} – 10^{-5} M 60 min při 25°C (Maletinska et al., 2015).

Buňky U2OS s transfekovaným lidským Y5 byly na vazebné experimenty nasazeny na 24-jamkové destičky potažené PEI v hustotě 40000 buněk/jamku a byly inkubovány ve vazebném pufru (25 mM HEPES pH 7,4, 120 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 4,7 mM KCl, 1 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0,5% BSA, 2 g/l glukosa). Buňky inkubovány ve vazebném pufru s 0,1 nM ^{125}I -PYY a s peptidy o koncentraci 10^{-11} – 10^{-5} M 2 hod při 25°C. Nespecifická vazba byla určena pomocí 10^{-5} M PYY.

3.3.2 Krátkodobý příjem potravy po podání lipidovaných analogů PrRP se změnami na C-konci na štíhlých myších

Myší samci C57BL/6 byli v den pokusu 17 hod hladoví a měli volný přístup k vodě. Myším byl SC podán fyziologický roztok nebo analogy PrRP31 v dávce 5 mg/kg rozpuštěné ve fyziologickém roztoku. Patnáct minut po injekci byla myším podána zvážená peleta a byl odečítán příjem potravy po 30 min po dobu 6 hod. Počet zvířat na skupinu byl 5-6 jedinců.

3.3.3 Účinky dlouhodobého podávání lipidovaných analogů PrRP u myšího modelu dietou indukované obezity (DIO)

Myším samcům C57BL/6 byla od 8. týdne věku podávána HF dieta (Maletinska et al., 2015). Ve věku 19 týdnů byly myši rozřazeny do skupin po 10 jedincích a umístěny do individuálních klecí s volným přístupem k vodě a HF dietě. Myším byl dvakrát denně (v 8:00 a 17:00) po dobu 14 dnů injikován SC fyziologický roztok, nebo myr-PrRP20, palm-PrRP31 či analog 6 s PheCl₂³¹ rozpuštěné ve fyziologickém roztoku v dávce 5 mg/kg. V průběhu pokusu byl každý den monitorován příjem potravy a myším byla měřena tělesná hmotnost. Po 14 dnech ráno na konci experimentu byla myším odebrána krev pro přípravu plasmy a tkáně – tuková (tuk podkožní – SCAT, vnitrobřišní – IPAT a hnědá tuková tkáň – BAT) a jaterní pro určení dalších metabolických parametrů. Tkáně byly zváženy a zmrazeny v tekutém dusíku a do zpracování uchovávány při -70°C. Plasmy byly v alikvotech uchovávány při -20°C. Myším DIO samcům byly glukometrem měřeny hladiny glukosy. Dále byla měřena hladina insulinu, leptinu a triglyceridů v plasmě. Všechna stanovení byla prováděna dle doporučeného protokolu

výrobců (Maletinska et al., 2015). Tuková a jaterní tkáň byla zpracována dle (Maletinska et al., 2011a).

3.4 Statistické vyhodnocení

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. Pro statistické vyhodnocení a pro výpočet hodnot EC_{50} , K_i , K_d byl použit program Graph-Pad Prism (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Použitá statistická metoda je uvedena u výsledků. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud $p < 0.05$.

4. VÝSLEDKY

4.1 Peptid CART

4.1.1 Specifická vazba peptidu CART na buněčné linii PC12

Saturační vazebné experimenty byly použity ke stanovení afinity ^{125}I -CART 61-102 a počtu vazebných míst v nediferencovaných buňkách PC12 a v buňkách PC12 diferencovaných pomocí NGF na neuronový fenotyp či dexametasonem (DEX) na chromafinní buňky (tabulka 2). Počet vazebných míst se pro peptid CART po diferenciaci NGF či PACAP výrazně zvýšil. Buňky PC12 diferencované dexametasonem se změnily na chromafinní fenotyp a kvůli vysoké nespecifické vazbě, nebylo možné stanovit hodnotu K_d .

Tabulka 2:

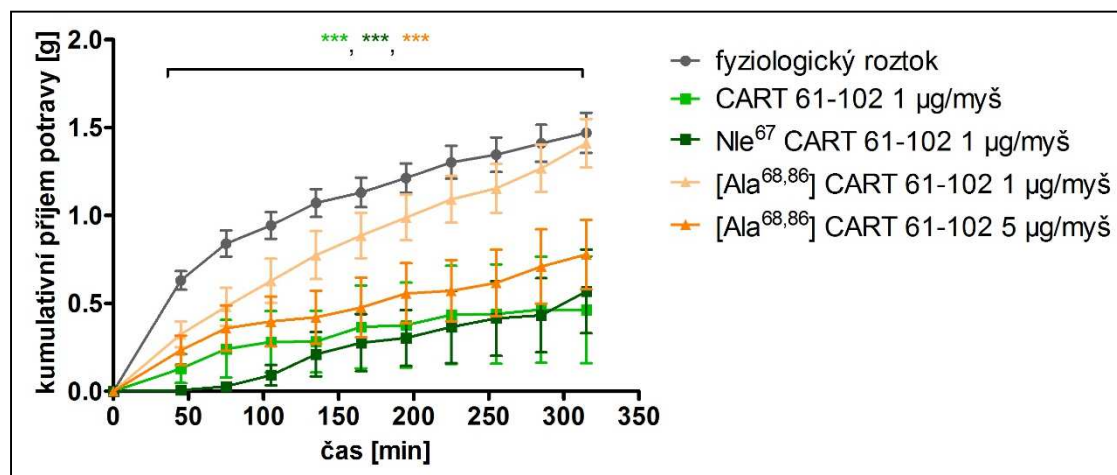
buňky PC12	K_d [nM]	B_{max} [počet vazebných míst/buňku]
nediferencované buňky	$2,36 \pm 1,28$	3601 ± 592
NGF diferencované buňky	$2,09 \pm 0,66$	11248 ± 930
DEX diferencované buňky	nebylo možné stanovit	velmi nízký

4.1.2 Význam jednotlivých disulfidových můstků peptidu CART pro jeho biologickou aktivitu *in vitro*

V naší studii byla zkoumána důležitost jednotlivých disulfidových můstků. Analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 se dvěma disulfidovými můstky v pozici 74-94 a 88-101 vykazoval vysokou afinitu k buňkám PC12 ($K_i = 3,95 \pm 1,77 \times 10^{-8}$ M). Rovněž byl syntetizován stabilní analog Nle⁶⁷ CART 61-102, který měl v pozici 67 methionin vyměněn za norleucin. Analog Nle⁶⁷ CART 61-102 se vázal s vysokou afinitou ($K_i = 3,98 \pm 2,10 \times 10^{-9}$ M), stejně jako peptid CART 61-102 ($K_i = 7,78 \pm 3,38 \times 10^{-9}$ M). Hodnota K_d a B_{max} byla určena z předchozí studie (Maletínská et al., 2007).

4.1.3 Význam jednotlivých disulfidových můstků peptidu CART pro jeho biologickou aktivitu *in vivo*

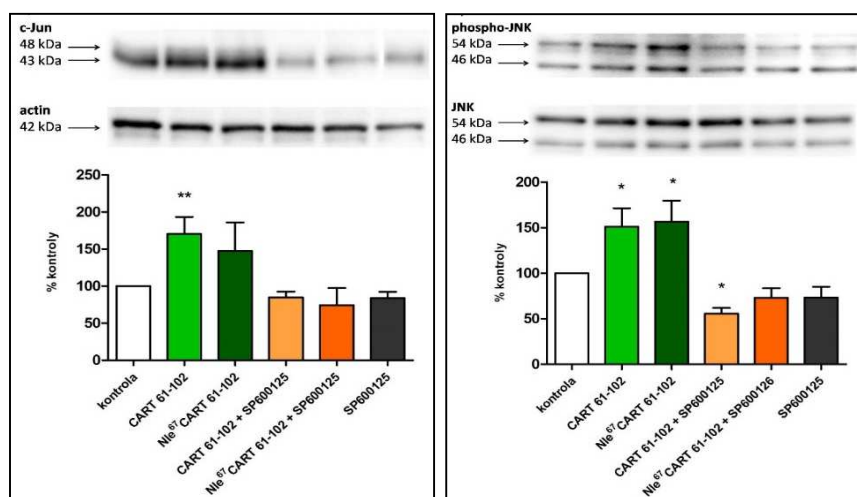
Příjem potravy byl měřen na hladových samcích myši a po ICV podání peptidu CART 61-102 resp. Nle⁶⁷ CART 61-102 v dávce 1 µg/myš došlo k významnému snížení příjmu potravy (obrázek 3). Analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 v dávce 5 µg/myš významně snížil příjem potravy a jeho účinek byl srovnatelný s peptidem CART 61-102 resp. Nle⁶⁷ CART 61-102 (obrázek 3).



Obrázek 3: Příjem potravy po ICV podání peptidu CART a jeho analogů u hladových myši
Látky byly v dávce 1 resp. 5 µg/myš a podány ICV do třetí mozkové komory, $n = 6$. Signifikance je *** $p < 0,001$ oproti kontrole. Data byla analyzována jednocestnou analýzou rozptylu, po které následoval Dunnettův test.

4.1.4 Signalizační dráha aktivovaná peptidem CART v buňkách PC12

U zkoumané signalizační dráhy SAPK/JNK došlo k výraznému zvýšení aktivace c-Jun po 60 minutové inkubaci s peptidem CART 61-102 (obrázek 4). Fosforylace JNK, která předchází aktivaci c-Jun, byla signifikantně zvýšená po 10 minutové inkubaci s CART 61-102 i s analogem Nle⁶⁷ CART 61-102 (obrázek 4). Obě dráhy byly blokovány inhibitorem SP600125.



Obrázek 4: Přehled aktivace signalizačních drah c-Jun a JNK
 Buňky byly inkubovány s peptidem CART 61-102, analogem Nle⁶⁷ CART 61-102 a s inhibitory po dobu 10 a 60 min při 37°C. Data jsou uvedena jako

průměry ± SEM. Signifikance je * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oproti kontrole. Data byla analyzována jednocestnou analýzou rozptylu, po které následoval Dunnnettův test.

4.2 Studium lipidovaných analogů PrRP

4.2.1 Syntéza lipidovaných analogů PrRP31 a PrRP20

Sekvence přirozeného PrRP31 a jeho analogů jsou uvedeny v tabulce 1. Myristová a palmitová kyselina byla u lipidovaných analogů připojena na N-konec řetězce syntézou na pevné fázi. Nestabilní methionin byl nahrazen stabilnějším norleucinem bez ovlivnění biologické aktivity (Maixnerova et al., 2011).

4.2.2 Afinity lipidovaných analogů PrRP *in vitro* k různým receptorům

Vazebné experimenty byly prováděny na buněčné linii RC-4B/C, CHO-K1 s transfekovaným lidským GPR10 a buněčných membránách z CHO-K1 buněk s transfekovaným lidským NPFF2. Potkaní rPrRP31, analog s norleucinem Nle-PrRP31 i lipidované analogy PrRP31 se vázaly s K_i v nanomolární oblasti (tabulka 3). K_i stabilního analogu NPFF – 1DMe na membránách s lidským NPFF2 činila $1,8 \pm 0,54$ nM. Lipidované analogy PrRP31 s mastnou kyselinou vykazovaly vyšší afinitu než u analogů bez mastné kyseliny. Analogy 5 a 6 (s PheCl₂³¹) s myristovou nebo palmitovou kyselinou či palmitoylovaný analog 9 (s PheNO₂³¹) vykazoval velmi vysokou afinitu ke GPR10 a NPFF2.

Tabulka 3: Charakterizace lipidovaných analogů PrRP31 pomocí vazebných experimentů

Název	RC-4B/C ¹²⁵ I-rPrRP31 K_i [nM]	lidský GPR10 ¹²⁵ I-hPrRP31 K_i [nM]	lidský NPFF ₂ ¹²⁵ I-1DMe K_i [nM]	příjem potravy na hladových myších (5mg/kg SC) [%] (45 min)
fyziologický roztok				100 ± 9,3
potkaní rPrRP31	2,39 ± 0,11	3,91 ± 0,21	57,1 ± 15,5	113 ± 10

Nle-PrRP31	1,28 ± 0,20	1,87 ± 0,42	49,6 ± 3,4	NT
myr-PrRP31	0,69 ± 0,09	0,69 ± 0,09	1,59 ± 0,32	9,5 ± 6,5
palm-PrRP31	0,51 ± 0,15	2,94 ± 0,33	0,91 ± 0,31	13,2 ± 6,2
K¹¹palm-hPrRP31	4,76 ± 1,96	6,20 ± 0,76	5,59 ± 1,33	NT
analog 1	83,3 ± 2,60	33,6 ± 15,6	24,3 ± 3,82	NT
analog 2	3,95 ± 1,22	1,30 ± 0,21	NT	4,9 ± 2,7
analog 3	0,85 ± 0,15	3,82 ± 0,37	0,41 ± 0,06	0,5 ± 0,3
analog 4	3,83 ± 0,94	1,73 ± 0,35	14,0 ± 3,18	NT
analog 5	0,60 ± 0,22	0,92 ± 0,32	3,08 ± 0,01	1,2 ± 0,6
analog 6	1,32 ± 0,29	1,02 ± 0,40	1,93 ± 0,53	0,7 ± 0,4
analog 7	19,9 ± 5,96	4,66 ± 0,85	352 ± 0,03	NT
analog 8	0,71 ± 0,12	0,53 ± 0,17	NT	4,9 ± 4,3
analog 9	0,58 ± 0,10	0,74 ± 0,27	11,8 ± 2,94	0,4 ± 0,3
analog 10	12,8 ± 2,22	8,36 ± 1,17	13,8 ± 0,02	NT
analog 11	0,51 ± 0,08	1,86 ± 0,52	0,24 ± 0,05	31,3 ± 13,6
analog 12	3,23 ± 0,15	1,97 ± 0,08	NT	NT
analog 13	0,22 ± 0,01	1,53 ± 0,38	317 ± 140	20,1 ± 5,7

NT – netestováno; Hodnota K_i byla vypočítána ze změřených hodnot IC_{50} z Cheng-Prusoffovy rovnice. Data byla měřena v duplikátech v nejméně třech nezávislých experimentech a jsou uvedena jako průměr ± SEM.

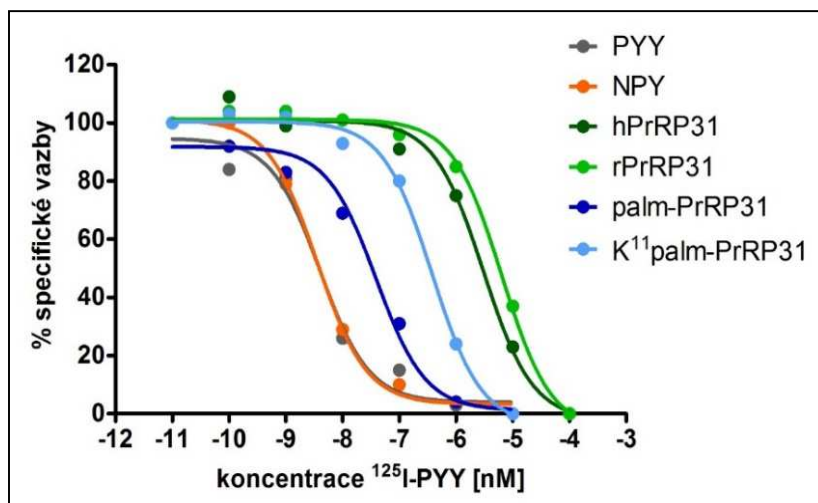
4.2.3 Saturační a kompetitivní vazebné experimenty na buněčné linii U2OS s transfekovaným receptorem Y5

Jako optimální byla stanovena doba inkubace 120 min, kdy se tato doba rovněž shodovala s informacemi z literatury. Ze saturačních vazebných experimentů na buněčné linii s transfekovaným Y5 receptorem byla určena hodnota K_d $1,01 \pm 0,27$ nM a počet vazebných míst B_{max} 36770 ± 2590 vazebných míst/buňku. Byla použita zvyšující se koncentrace radioligandu ^{125}I -PYY ve finálních koncentracích 0,05 – 2 nM a pro zjištění nespecifické vazby byl použit neradioaktivní PYY ve finální koncentraci 10^{-6} M. Pro kompetitivní vazebné experimenty byly buňky inkubovány s peptidy o zvyšující se finální koncentraci v rozmezí 10^{-11} – 10^{-4} M a s 0,1 nM ^{125}I -PYY. Přírozené ligandy PYY a NPY se vážaly na receptor Y5 s vysokou afinitou, kdy K_i se pohybovaly v nanomolární oblasti (tabulka 4, obrázek 5). Hodnota K_i přírodního PrRP31 a PrRP20 byla v řádu 10^{-6} M (tabulka 4, obrázek 5). U vybraných lipidovaných analogů palm-PrRP31 a K¹¹palm-hPrRP31 byla afinita k Y5 receptoru vyšší a hodnoty K_i se pohybovaly v řádu 10^{-7} – 10^{-8} (tabulka 4, obrázek 5).

Tabulka 4: Charakterizace analogů PrRP31 pomocí vazebných experimentů na buněčné linii U2OS s transfekovaným Y5 receptorem

Analog	lidský Y5 ¹²⁵ I-hPYY
	K _i [nM]
PYY	3,79 ± 0,66
NPY	3,1 ± 0,1
hPrRP31	2863 ± 42,6
potkaní rPrRP31	5910 ± 624
palm-PrRP31	38,2 ± 6,16
K ¹¹ palm-hPrRP31	272 ± 86,7

Hodnota K_i byla vypočítána ze změřených hodnot IC₅₀ z Cheng-Prusoffovy rovnice. Data byla měřena v duplikátech v nejméně třech nezávislých experimentech a jsou uvedena jako průměr ± SEM.



Obrázek 5: Reprezentativní kompetitivní vazebné křivky na U2OS s transfekovaným Y5 receptorem

Buňky byly inkubovány 120 min při RT. Koncentrace radioligandu ¹²⁵I-PYY byla 0,1 nM a nespecifická vazba byla určena pomocí neznačeného PYY 10⁻⁵ M.

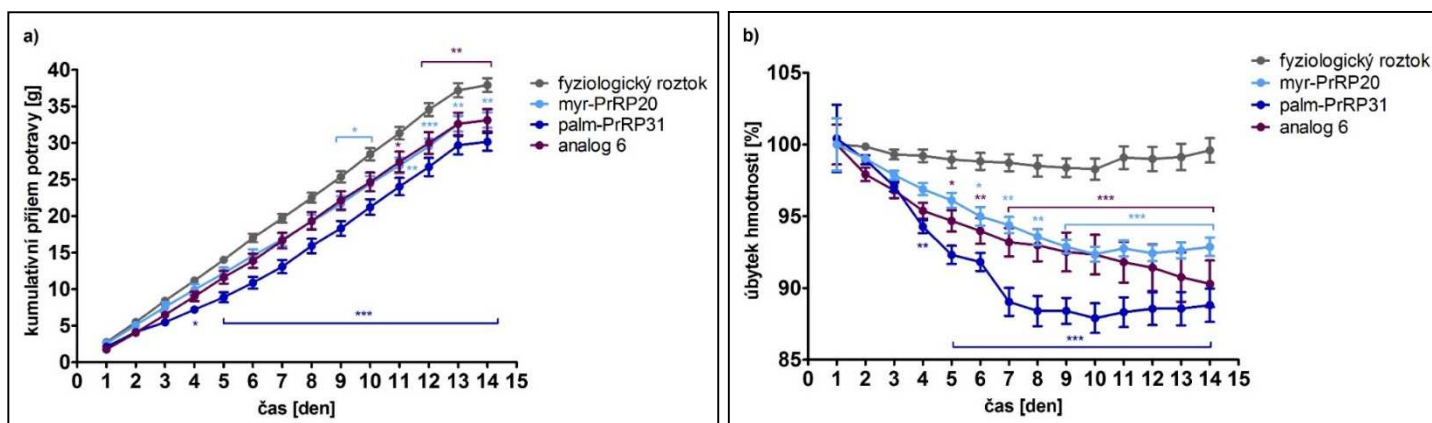
4.2.1 Účinek lipidovaných analogů PrRP v krátkodobém podávání u hladových myší

Data z krátkodobého příjmu potravy na hladových myších jsou vyjádřena v tabulce 4. Po SC podání přirozeného PrRP31 nedošlo k ovlivnění příjmu potravy. Myristoylovaný a palmitoylovaný PrRP31 výrazně snížil příjem potravy. Palm-PrRP31 vykazoval silnější a dlouhodobější anorexigenní účinek než myr-PrRP31. Anorexigenní účinek a stejný trend vykazovaly rovněž analogy 2 a 3 s 1-Nal³¹ či analogy 8 a 9 s PheNO₂³¹.

4.2.2 Účinky lipidovaných analogů PrRP v dlouhodobém podávání DIO myším

Po čtrnáctidenním podávání myristoylovaného PrRP20, palmitoylovaného PrRP31 a analogu 6 s PheCl₂³¹ v dávce 5mg/kg došlo k signifikantnímu snížení příjmu potravy (obrázek 6 a) a výraznému snížení hmotnosti u myší (obrázek 6 b) oproti kontrolní skupině Po SC

podávání analogu palm-PrRP31 došlo k velmi výraznému snížení celkové hmotnosti tukové tkáně, způsobeného především výrazným snížením podkožního a perirenálního tuku.



Obrázek 6: Příklad příjem potravy a tělesná hmotnost po podávání lipidovaných analogů PrRP u DIO myši

Účinek myr-PrRP20, palm-PrRP31 a analogu 6 s $PheCl_2^{31}$ na **a)** příjem potravy a **b)** tělesnou hmotnost po SC podání. Látky byly podávány v dávce 5mg/kg dvakrát denně ($n = 8 - 10$). Data byla analyzována dvoucestnou analýzou rozptylu, po které následoval Bonferroniho test. Signifikance je * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontrolní skupina.

Dlouhodobé podávání myristoylovaného PrRP20 a palmitoylovaného PrRP31 výrazně snížilo hladiny leptinu v plasmě a toto snížení bylo úměrné ke snížené hmotnosti tukové tkáně. Hladina insulínu v plasmě byla signifikantně snížena po podávání palm-PrRP31 (tabulka 5).

Tabulka 5: Metabolické parametry po 14-denním SC podávání lipidovaných analogů PrRP u hladových DIO myši

skupina	leptin [ng/ml]	glukosa [mmol/l]	insulin [ng/ml]	triglyceridy [mg/dl]
fyziologický roztok	53,3 ± 3,49	6,94 ± 0,28	4,09 ± 0,55	72,2 ± 3,2
myr-PrRP20	39,6 ± 3,47 *	7,52 ± 0,16	3,54 ± 0,47	68,7 ± 4,16
palm-PrRP31	24,7 ± 3,39 ***	7,26 ± 0,29	2,37 ± 0,47 *	66,8 ± 8,74
analog 6	46,12 ± 7,07	6,66 ± 0,29	NT	77,7 ± 9,25

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, $n = 10$. Data byla analyzována pomocí jednocestné analýzy rozptylu, po které následoval Dunnettův test. Signifikance je * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. kontrolní skupina.

Čtrnáctidenní podávání palm-PrRP31 vedlo v játrech ke snížené expresi mRNA enzymů lipogeneze ACACA, FASN a transkripčního faktoru SREBP. Ve SCAT došlo ke snížení exprese mRNA FASN a leptinu. Snížená exprese FASN a leptinu byla rovněž i v IPAT.

5. DISKUSE

5.1 Peptid CART a jeho analogy

Peptid CART byl objeven v roce 1998 a přes všechny snahy o identifikaci není stále znám jeho receptor. V naší laboratoři byla nalezena specifická vazba peptidu CART k přirozeným feochromocytomovým buňkám PC12 a buňkám diferencovaným v neuronový fenotyp (Maletínská et al., 2007). Naše další studie *in vitro* na této buněčné linii a rovněž na ovlivnění příjmu potravy *in vivo*, testovaly nové analogy peptidu CART a byl zkoumán nejen vztah mezi strukturou a aktivitou analogů, ale rovněž i signalizace peptidu CART do buňky, která by mohla přispět k charakterizaci vazebného místa.

5.1.1 Specifická vazba peptidu CART na buněčné linii PC12

V naší předchozí studii (Maletínská et al., 2007) byla prokázána specifická vazba na buněčnou linii PC12. Po diferenciaci na buňky nervové tkáně pomocí NGF a PACAP došlo k výraznému zvýšení počtu vazebných míst/buňku. Naopak po diferenciaci na chromafinní buňky byl počet vazebných míst tak nízký, že nebylo možné jeho určení. To znamená, že vazebná místa pro peptid CART se exprimují spíše v nervové tkáni a tumoru dřeně nadledvin, než v normálních chromafinních buňkách.

5.1.2 Význam jednotlivých disulfidových můstků peptidu CART pro jeho biologickou aktivitu

V naší další studii byla testována důležitost disulfidových můstků, vytvořených mezi dvojicemi cysteinů (Blechová et al., 2013). Pomocí kompetitivních vazebných experimentů na buněčné linii PC12 byla studována afinita peptidu CART 61-102 a jeho analogů Nle⁶⁷ CART 61-102 a [Ala^{68,86}] CART 61-102. Afinita byla srovnatelná s přirozeným peptidem CART 61-102 a hodnoty K_i obou peptidů se pohybovaly v nanomolární oblasti. Z výše zmíněných dalších analogů pouze analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 obsahující dva disulfidové můstky v pozici 74-94 a 88-101 a alaniny v pozici 68, 86 místo třetího disulfidového můstku vykazoval vysokou afinitu k buňkám PC12, s hodnotou K_i pouze o řád nižší než u přirozeného peptidu CART a anorexigenní vlastnosti.

V *in vivo* testech sledujících příjem potravy po centrálním podání byly použity analogy peptidu CART, Nle⁶⁷ CART 61-102 a [Ala^{68,86}] CART 61-102 s vysokou afinitou k buněčné linii PC12 a přirozený peptid CART 61-102. Po ICV podání peptidu CART 61-102 či analogu Nle⁶⁷ CART 61-102 hladovým myším v dávce 1 $\mu\text{g}/\text{myš}$ došlo k výraznému anorexigenímu účinku. Tato dávka je srovnatelná s předchozími studiemi (Kristensen et al., 1998; Maletínská et al., 2007; Thim et al., 1998). U analogu [Ala^{68,86}] CART 61-102 byly použity dávky 1 a 5

$\mu\text{g}/\text{myš}$ a v čase největšího účinku při 45 min po podání látky významně snižoval příjem potravy v obou dávkách a anorexigenní účinek byl dávkově závislý. Peptidy vykazovaly výrazný dlouhodobý účinek, který byl patrný i na konci experimentu po 5 hodinách, což naznačuje vysokou stabilitu peptidů. Pro zachování afinity k buněčné linii PC12 jsou nezbytné dva disulfidové můstky v pozici 74-94 a 88-101. Analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 může být použit jako základ pro strukturně-aktivitní studie, neboť jeho syntéza je jednodušší oproti syntéze celého přirozeného peptidu.

5.1.3 Signalizace peptidu CART v buňkách PC12

Vzhledem k tomu, že stále nebyl nalezen receptor pro peptid CART, mnohé laboratoře se pokoušely o identifikaci jeho molekuly a signalizačních drah. V naší laboratoři jsme nepozorovali aktivaci dráhy Erk1/2 a CREB peptidem CART, ani jeho analogem Nle⁶⁷ CART 61-102 v buňkách PC12 oproti práci (Lin et al., 2011). Buňky byly ve studii Lin a kol. diferencovány NGF a PACAP, které mohly v buňkách PC12 samy stimulovat Erk1/2.

Kromě zmíněného Erk1/2 a CREB byly v buňkách PC12 sledovány různé signalizační dráhy, které by mohl peptid CART stimulovat. Byla studována aktivace c-Fos, c-Jun na úrovni proteinu a fosforylace JNK a p38. U buněk PC12 došlo k významné fosforylaci JNK a k následné aktivaci c-Jun po inkubaci s peptidem CART či jeho analogem Nle⁶⁷ CART 61-102. Tyto výsledky byly podpořeny použitím specifického inhibitoru JNK kinasy SP600125, který aktivaci c-Jun a fosforylaci JNK po podání peptidu CART blokoval. Popsané výsledky vedou k závěru, že peptid CART i jeho analog Nle⁶⁷ CART 61-102 v buňkách PC12 aktivují dráhu JNK, která je primárně indukovaná protizánětlivými cytokiny a stresovými podmínkami (Chang and Karin, 2001).

Peptid CART i jeho analogy nabízejí stále nové možnosti v testování *in vitro*, které by mohly vést k nalezení jeho receptoru/ů. Možným krokem je studium jiných feochromocytomálních buněčných linií podobných buňkám PC12, na kterých byla vazba již prokázána (Maletínská et al., 2007). Provedení vazebných experimentů a testování signalizačních drah na nových feochromocytomálních liniích by mohlo být zajímavým krokem v možném objevu receptoru pro peptid CART.

5.2 PrRP a jeho nové lipidované analogy

V naší laboratoři byly syntetizovány nové analogy PrRP s mastnou kyselinou připojenou přes amidovou vazbu. Jediným dosud známým přirozeným příkladem lipidovaného peptidového hormonu je ghrelin, který vzniká v žaludku a působí v hypothalamu. Tento peptid obsahuje kyselinu oktanovou připojenou přes esterovou vazbu na serin v pozici 3, která pravděpodobně umožňuje pasivní transport ghreluinu přes BBB (Pirnik et al., 2011). Novým syntetickým lipidovaným peptidem je analog GLP-1, liraglutid, který byl nejdříve využíván

v léčbě diabetu mellitu 2. typu a nyní i k léčbě obezity a jeho stabilita v plasmě je zvýšena vazbou a sérový albumin (Gault et al., 2011). Obecně se dá říci, že lipidizace peptidů zvyšuje jejich stabilitu v krvi vazbou na albumin a umožňuje centrální účinek analogů po periferním podání a rovněž dochází ke zvýšení stability v plasmě těchto peptidů.

5.2.1 Afinita lipidovaných analogů PrRP *in vitro* k různým receptorům

V předchozí naší studii (Maletinska et al., 2011b) jsme ověřili důležitost C-konce peptidového řetězce, který je pro PrRP20 i PrRP31 stejný a je zcela zásadní pro zachování biologické aktivity. Mastná kyselina o různé délce byla proto připojena na N-konec PrRP. Na PrRP31 byly připojeny mastné kyseliny o délce 8-18 uhlíků. U PrRP31 s navázanou stearovou kyselinou byla limitním faktorem lipofilicita a rozpustnost peptidu, proto poté byly syntetizovány analogy s myristovou či palmitovou kyselinou. Dále byly syntetizovány a ve studii použity lipidované analogy PrRP s myristovou nebo palmitovou kyselinou a s modifikací na C-konci podle naší předchozí studie (Maletinska et al., 2011b). V pozici 31 byl fenylalanin vyměněn za nekódové aminokyseliny 1-Nal, PheCl₂, PheF₅, PheNO₂ nebo za tyrosin. Tato výměna může zvyšovat biologickou aktivitu a stabilitu v důsledku větší odolnosti proti štěpení peptidasami. Lipidované analogy PrRP s různou délkou řetězce mastné kyseliny mají zachovanou vysokou afinitu ke GPR10 receptoru s hodnotou K_i v nanomolární oblasti a k buněčné linii RC-4B/C, která endogenně exprimuje GPR10 a NPFF2 receptory. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky z předchozích studií, kdy byly ve vazebných experimentech testovány lidský a potkaní PrRP20 a PrRP31 (Langmead et al., 2000). Při vazebných experimentech na buněčné membrány s receptorem NPFF2 vykazovaly lipidované analogy vyšší afinitu ve srovnání s přirozeným PrRP20 či PrRP31 a to s K_i 10⁻⁹ M, což je hodnota srovnatelná se stabilním ligandem NPFF2 receptoru, 1DMe (Engstrom et al., 2003; Maletinska et al., 2013). Tento fakt naznačuje, že NPFF2 hraje důležitou roli v centrálním působení lipidovaných analogů PrRP.

Dalším testovaným receptorem ve vazebných studiích byl lidský receptor Y5 transfekovaný v buňkách U2OS. Vazba přirozeného PrRP31 byla nízká, s hodnotou K_i 10⁻⁶ M. Ovšem u vybraných testovaných analogů, palm-PrRP31 a K¹¹palm-hPrRP31, došlo k řádovému zvýšení vazebné afinity k receptoru Y5. Tento fakt může naznačovat, že Y5 receptor může hrát roli v účinku lipidovaných analogů PrRP a je potřeba další testování *in vivo* k prokázání účinku. Y5 receptor je zapojený do regulace příjmu potravy a přes tento receptor působí NPY, PYY či PP (Cabrele et al., 2000; Gerald et al., 1996). Antagonisté Y5 receptoru naopak příjem potravy snižují (Criscione et al., 1998). Je potřeba provést další experimenty s lipidovanými analogy PrRP, a prověřit zda mohou mít potenciálně antagonistický účinek na Y5 receptor.

5.2.2 Účinek lipidovaných analogů PrRP v krátkodobém podávání hladovým myším

Již dříve bylo prokázáno, že PrRP je anorexigenní faktor a jeho mRNA je exprimována v oblastech důležitých pro regulaci energetické rovnováhy, jako je DMN, NTS či VLM (Lawrence et al., 2000). Mnoho studií dále potvrdilo, že PrRP po ICV podání do třetí mozkové komory snižuje příjem potravy a zvyšuje energetický výdej a tělesnou teplotu (Ellacott et al., 2002; Lawrence et al., 2000; Maixnerova et al., 2011). Lipidované analogy PrRP byly testovány v krátkodobém příjmu potravy u hladových myší s cílem určit jejich působení po podání do periferie. Z výsledků vyplývá, že především analogy s myristovou či palmitovou kyselinou mají velký potenciál v centrálním účinku na snížení příjmu potravy. V krátkodobém příjmu potravy prokázaly silný anorexigenní účinek také analogy s modifikací na C-koncovém fenylalaninu, a to především palmitoylovaný analog s 1-Nal³¹, myristoylovaný a palmitoylovaný analog s PheCl₂³¹ a palmitoylovaný PheNO₂³¹.

5.2.3 Účinek lipidovaných analogů PrRP v dlouhodobém podávání DIO myším

U krátkodobě nejúčinnějších analogů palm-PrRP31, myr-PrRP20 a analogu 6 s palm-PheCl₂³¹ byl dále testován dlouhodobý opakovaný účinek na příjem potravy a tělesnou hmotnost po periferním podání u myší s DIO. Chronické dvoutýdenní podávání lipidovaných analogů nevedlo k toleranci a anorexigenní účinek byl zachován po celou dobu experimentu. Tělesná hmotnost u myší s DIO byla signifikantně snížena u všech skupin. K nejvýraznějšímu snížení celkové hmotnosti tuku došlo ve skupině, které byl podáván palm-PrRP31, a to podkožního a perirenálního tuku. Úbytek tukové tkáně byl provázen výrazným snížením hladiny leptinu v plasmě, i jeho exprese v podkožní a viscerální tukové tkáni. Snížené byly i hladiny mRNA pro FASN v podkožní a viscerální tukové tkáni.

Pro další studium lze využít nově syntetizovaných lipidovaných analogů PrRP s mastnou kyselinou ve vybraných pozicích uvnitř aminokyselinového řetězce. Tato modifikace může spolu s přidáním různé spojovací molekuly (glutamová kyselina, polyethylenglykol) přispět k účinnější dostupnosti z periferie (z podkoží) a ke zvýšení stability v organismu. Některé nové lipidované analogy PrRP výrazně zlepšují nejen metabolické parametry, jako je snížení hmotnosti tukové tkáně a snížení hladiny leptinu. Rovněž je naším předmětem zájmu zkoumání mechanismu účinku v periférii i v CNS po periferním podání. Pro pochopení mechanismu působení a pro ověření afinity lipidovaných analogů PrRP k NPFF2 a Y5 receptoru *in vivo* by mohla přispět studie na myších s vyřazeným genem pro receptor GPR10. Naše nové lipidované analogy PrRP skýtají velký potenciál v léčbě obezity.

ZÁVĚR

Studie týkající se peptidu CART a jeho analogů přispívá k objasnění vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou. Pomocí experimentů prováděných na buněčné linii PC12, obsahující vazebná místa pro peptid CART, jsme testovali vazebnou afinitu a možnou signalizační dráhu.

Ve vazebných experimentech vykazoval vysokou afinitu k buňkám PC12 peptid CART 61-102, ale i stabilní analog Nle⁶⁷ CART 61-102. Pro zachování biologické aktivity není nezbytný disulfidový můstek v pozici 68-86. Tyto analogy byly rovněž velmi účinné na snížení příjmu potravy u myší. Z *in vitro* testování potenciálních signalizačních drah, aktivoval peptid CART dráhu SAPK/JNK s následnou aktivací c-Jun.

V experimentech prováděných na hladových myších peptid CART i jeho analogy významně snižovaly příjem potravy a po provedení imunohistochemické studie bylo zjištěno, že dochází k aktivaci c-Jun v oblastech mozku souvisejících s příjmem potravy. Naše studie přispívají k hledání mechanismů účinku peptidu CART a mohou tak naznačit cestu k dalšímu hledání jeho receptoru.

Experimenty prováděné *in vitro* i *in vivo* s lipidovanými analogy PrRP přispěly k objasnění biologické aktivity těchto analogů a jejich fyziologických účinků. Z vazebných experimentů bylo zjištěno, že analogy PrRP s mastnými kyselinami se vážou s vysokou afinitou ke GPR10 receptoru a dokonce s vyšší afinitou k NPFF2 receptoru. Překvapivá byla vazba lipidovaných analogů k buněčné linii s transfekovaným Y5 receptorem. Přírozený PrRP se však na tento receptor vázal velmi slabě.

V *in vivo* pokusech na hladových myších byly testovány analogy s myristovou a palmitovou kyselinou a záměnami za deriváty Phe na C-konci. Analog 6 s PheCl₂³¹ vykazoval dlouhodobý anorexigenní účinek. Analogy palm-PrRP31, myrPrRP20 a analog 6 byly testovány v dlouhodobém experimentu na DIO myších, u kterých významně snížily příjem potravy a tělesnou hmotnost. Také došlo ke zlepšení některých metabolických parametrů jako je snížení hladiny leptinu v plasmě i jeho mRNA v tukové tkáni.

Lipidované analogy PrRP nabízejí velký potenciál pro další studium mechanismu účinků a tyto látky mohou být vhodnými a účinnými kandidáty pro léčbu obezity.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Blechová, M., et al., 2013. New analogs of the CART peptide with anorexigenic potency: the importance of individual disulfide bridges. *Peptides*. 39, 138-44.
- Boyle, R.G., et al., 2005. Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide. *J Pept Sci*. 11, 161-5.
- Cabrele, C., et al., 2000. The first selective agonist for the neuropeptide Y5 receptor increases food intake in rats. *J Biol Chem*. 275, 36043-8.
- Criscione, L., et al., 1998. Food intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. *J Clin Invest*. 102, 2136-45.
- Douglass, J., McKinzie, A.A., Couceyro, P., 1995. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci*. 15, 2471-81.
- Ellacott, K.L., et al., 2002. PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight. *Endocrinology*. 143, 368-74.
- Engstrom, M., et al., 2003. Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 305, 825-32.
- Fujiwara, K., et al., 2005. Identification of the prolactin-releasing peptide-producing cell in the rat adrenal gland. *Regul Pept*. 126, 97-102.
- Gault, V.A., et al., 2011. Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with Type 2 diabetes and obesity. *Clin Sci (Lond)*. 121, 107-17.
- Gerald, C., et al., 1996. A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature*. 382, 168-71.
- Hinuma, S., et al., 1998. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature*. 393, 272-6.
- Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410, 37-40.
- Kristensen, P., et al., 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*. 393, 72-6.
- Lambert, P.D., et al., 1998. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse*. 29, 293-8.
- Langmead, C.J., et al., 2000. Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor. *Br J Pharmacol*. 131, 683-8.
- Lawrence, C.B., et al., 2000. Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat Neurosci*. 3, 645-6.
- Lin, Y., Hall, R.A., Kuhar, M.J., 2011. CART peptide stimulation of G protein-mediated signaling in differentiated PC12 cells: identification of PACAP 6-38 as a CART receptor antagonist. *Neuropeptides*. 45, 351-8.
- Maixnerova, J., et al., 2011. Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor. *Peptides*. 32, 811-7.
- Maletinska, L., et al., 2011a. The Peptidic GHS-R antagonist [D-Lys(3)]GHRP-6 markedly improves adiposity and related metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 343, 55-62.
- Maletinska, L., et al., 2011b. Biological properties of prolactin-releasing peptide analogs with a modified aromatic ring of a C-terminal phenylalanine amide. *Peptides*. 32, 1887-92.
- Maletinska, L., et al., 2012. Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J Pharmacol Exp Ther*. 340, 781-6.
- Maletinska, L., et al., 2013. Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPFF receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration. *Brain Res*. 1498, 33-40.
- Maletinska, L., et al., 2015. Novel lipidized analogs of prolactin-releasing peptide have prolonged half-lives and exert anti-obesity effects after peripheral administration. *Int J Obes (Lond)*. 39, 986-93.

- Maletínská, L., et al., 2007. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol.* 559, 109-14.
- Marchese, A., et al., 1995. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics.* 29, 335-44.
- Nagelova, V., et al., 2014. CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide specific binding sites in PC12 cells have characteristics of CART peptide receptors. *Brain Res.* 1547, 16-24.
- Onaka, T., Takayanagi, Y., Leng, G., 2010. Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide. *Trends Endocrinol Metab.* 21, 287-93.
- Pirnik, Z., et al., 2011. Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice. *Neurochem Int.* 59, 889-95.
- Quillet, R., et al., 2016. RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacol Ther.* 160, 84-132.
- Rogge, G., et al., 2008. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci.* 9, 747-58.
- Sarkar, S., et al., 2004. Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 999, 181-92.
- Takayanagi, Y., Onaka, T., 2010. Roles of prolactin-releasing peptide and RFamide related peptides in the control of stress and food intake. *FEBS J.* 277, 4998-5005.
- Thim, L., et al., 1998. Purification and characterisation of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast. *FEBS Lett.* 428, 263-8.
- Yasui, Y., et al., 2001. Expression of prolactin-releasing peptide in human placenta and decidua. *Endocr J.* 48, 397-401.

SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Publikace týkající se tématu disertační práce:

1. Nagelová V., Pirník Z., Železná B. a Maletínská L., CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides specific binding sites in PC12 cells have characteristics of CART peptide receptors, *Brain Research*, 2014, 1547: 16-24. doi: 10.1016/j.brainres.2013.12.024. **IF = 2,843**
2. Blechová M., Nagelová V., Žáková L., Demianová Z., Železná B., Maletínská L., New analogs of the CART peptide with anorexigenic potency: the importance of individual disulfide bridges, *Peptides*, 2013, 39: 138-44. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.033. **IF = 2,618**
3. Nagelová V., Železná B., Maletínská L., Anorexigenní neuropeptid CART v regulaci příjmu potravy, *Chemické listy*, 2013. **IF = 0,272**
4. Pražienková V., Tichá A., Blechová M., Špolcová A., Železná B., Maletínská L., Pharmacological characterization of lipidized analogs of prolactin-releasing peptide with a modified c-terminal aromatic ring, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2016, 121-128. **IF = 2,386**
5. Maletínská L., Nagelová V., Tichá A., Zemenová J., Pirník Z., Holubová M., Špolcová A., Mikulášková B., Blechová M., Sýkora D., Lacinová Z., Haluzík M., Železná B. a Kuneš J., Novel lipidized analogs of prolactin-releasing peptide have prolonged half-lives and exert anti-obesity effects after peripheral administration, *International Journal of Obesity*, 2015, 986-93. doi: 10.1038/ijo.2015.28. **IF = 5,004**

Další publikace týkající se jiných témat:

1. Mikulášková B., Zemenová J., Pirník Z., Pražienková V., Bednárová L., Železná B., Maletínská L., Kuneš J., Effect of palmitoylated prolactin-releasing peptide on food intake and neural activation after different routes of peripheral administration in rats, *Peptides*, 2016, 75: 109-17. doi: 10.1016/j.peptides.2015.11.005. **IF = 2,618**
2. Špolcová A., Mikulášková B., Holubová M., Nagelová V., Pirník Z., Zemenová J., Haluzík M., Železná B., Galas MC., Maletínská L., Anorexigenic lipopeptides ameliorate central insulin signaling and attenuate tau phosphorylation in hippocampi of mice with monosodium glutamate-induced obesity, *J Alzheimers Dis*, 2015, 45(3): 823-35. doi: 10.3233/JAD-143150. **IF = 4,151**

3. Vaněčková I., Maletínská L., Behuliak M., Nagelová V., Zicha J., Kuneš J., Obesity-related hypertension: possible pathophysiological mechanisms, *J Endocrinol*, 2014, 223(3): R63-78. doi: 10.1530/JOE-14-0368. Review. **IF = 3,718**
4. Holubová M., Nagelová V., Lacinová Z., Haluzík M., Sýkora D., Moulin A., Blayo AL., Fehrentz JA., Martinez J., Stofkova A., Jurčovičová J., Zelezná B., Maletínská L., Triazole GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002 attenuate food intake, body weight, and adipose tissue mass in mice, *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 393(1-2): 120-8. doi: 10.1016/j.mce.2014.06.003. **IF = 4,405**
5. Spolcová A., Holubová M., Mikulášková B., Nagelová V., Stofková A., Lacinová Z., Jurčovičová J., Haluzík M., Maletínská L., Zelezná B., Changes in FGF21 serum concentrations and liver mRNA expression in an experimental model of complete lipodystrophy and insulin-resistant diabetes, *Physiol Res*, 2014, 63(4): 483-90. **IF = 1,293**
6. Maletínská L., Tichá A., Nagelová V., Spolcová A., Blechová M., Elbert T., Zelezná B., Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPPF receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration, *Brain Res*, 2013, 1498:33-40. doi: 10.1016/j.brainres.2012.12.037. **IF = 2,843**

Patenty:

Maletínská L., Železná B., Kuneš J., Nagelová V., Treating subject diagnosed as having or being susceptible to disorders characterized by increased level of glucose in blood, comprises administering lipidated analog of prolactin releasing peptide (PrRP) to subject
Číslo patentu: US2015196651-A1 WO2015107428-A2 WO2015107428-A3.