

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Charakterizace analogů peptidu CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) v testech *in vitro* a *in vivo***

Characterization of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide analogs *in vitro* and *in vivo*

**Vypracovala: Bc. Veronika Nagelová**

Rok : 2012

Školitelka: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Garant: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Lenky Maletínské, CSc., že jsem uvedla veškerou literaturu a ostatní informační zdroje, které jsem použila, a tyto použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, dne .....

.....

podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Především děkuji své školitelce RNDr. Lence Maletínské, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha) za vedení mé práce, odbornou pomoc, ochotu, trpělivost a především za příjemnou spolupráci.

Dále děkuji Ing. Blance Železné, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha) za podnětné rady a nápady a rovněž za odbornou korekci mé diplomové práce. Za zaštitění mé diplomové práce na katedře fyziologie živočichů RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. (PřF UK, Praha).

Za náročnou syntézu peptidů děkuji Ing. Miroslavě Blechové (ÚOCHB AV ČR, Praha) a za jodaci peptidů děkuji Doc. Tomáši Elbertovi, CSc (ÚOCHB AV ČR, Praha). Rovněž děkuji celé skupině Dr. Jiráčka za vytvoření přátelské a příjemné pracovní atmosféry.

V neposlední řadě patří mé díky mým rodičům Janě a Josefovi, sestře Kristýně, babičce Miluše a partnerovi Mirkovi za jejich psychickou podporu při mých studiích.

## ABSTRAKT

Peptid CART (cocaine- and amphetamine- regulated transcript) je neuropeptid nacházející se především v hypothalamu, který snižuje příjem potravy (anorexigenní peptid). Přes všechny snahy u něj ještě nebyl nalezen receptor a neví se jeho přesné působení. Vyskytuje se ve dvou přirozených formách CART(55-102) a CART(61-102). Peptid CART je schopen vázat se na feochromocytomální buněčnou linii PC12. Buňky PC12 diferencované v neurální fenotyp pomocí NGF (nerve growth factor) vykazovaly vyšší počet vazebných míst ( $11250 \pm 2520$  vazebných míst/buňka) oproti nediferencovaným buňkám ( $3600 \pm 570$  vazebných míst/buňka). Buňky PC12 diferencované dexametasonem na chromafinní buňky vykazovaly vysokou nespecifickou vazbu a tím nestanovitelný počet vazebných míst. Peptid CART ve své struktuře obsahuje tři disulfidové můstky. Pro objasnění důležitosti disulfidových můstků pro zachování biologické aktivity, byly syntetizovány analogy s jedním (analog 3, 4 a 5) či dvěma (2, 6, 7 a 8) disulfidovými můstky a analog 1 peptidu CART(61-102), který měl methionin v pozici 67 vyměněn za norleucin. Lze konstatovat nezměněnou biologickou aktivitu u analogu 1 a dále u analogu 7 s disulfidovými můstky v pozici 74-94 a 88-101. Při zkoumání buněčné signalizace u buněk PC12 jsme testovali, zda-li dochází k aktivaci c-Fos, c-Jun, fosforylovaného ERK1/2, CREB, JNK a p38 peptidem CART. Peptid CART významně zvýšil aktivaci c-Jun, ale nevýznamně zvýšil fosforylaci JNK, který předchází dráze c-Jun.

**Klíčová slova:** Peptid CART, buněčná linie PC12, analogy, signalizace

## ABSTRACT

Peptide CART (cocaine- and amphetamine- regulated transcript) is a neuropeptide acting in the hypothalamus to reduce food intake (anorexigenic peptide). Despite all efforts the receptor and the mechanism of action is still unknown. This peptide has two biologically active forms, CART(55-102) and CART(61-102). Peptide CART is able to bind to pheochromocytoma cells PC12. PC12 cells differentiated in neuronal phenotype with NGF (nerve growth factor) showed a higher number of binding sites ( $11250 \pm 2520$  binding sites/cell) compared to undifferentiated cells ( $3600 \pm 570$  binding sites/cell). PC12 cells differentiated by dexamethasone to chromaffin cells showed high non-specific binding. Peptide CART contains three disulfide bridges. To clarify the importance of each disulfide bridge to maintain biological activity, analogues with one (analogue 3, 4 and 5) or two (2, 6, 7 and 8) disulfide bridges and a peptide analogue of CART (61-102), which has methionin at position 67 replaced with norleucine were synthesized. We showed that biological activity was unchanged at analogue 1 and analogue 7 containing disulfide bridges in positions 74-94 and 88-101. When investigating cell signaling in PC12 cells, we tested if peptide CART activate of c-Fos, c-Jun, phosphorylated ERK1/2, CREB, JNK and p38. CART peptide significantly increased activation of c-Jun, and non-significantly increased phosphorylation of JNK, which precedes c-Jun.

**Key words:** Peptide CART, PC12 cells, analogues, signalling

# OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	3
ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	5
OBSAH.....	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>11</b>
2.1. Obezita.....	11
2.1.1. Zdravotní komplikace obezity.....	12
2.1.2. Léčba obezity.....	12
2.2. Regulace příjmu potravy.....	14
2.2.1. Centrální regulace příjmu potravy.....	14
2.2.2. Periferní regulace příjmu potravy.....	17
2.3. Peptidy CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript).....	18
2.3.1. Objev a výskyt.....	18
2.3.2. Struktura peptidu CART.....	18
2.3.3. Fyziologická úloha peptidu CART.....	20
2.3.4. Receptor peptidu CART a buněčná signalizace.....	20
2.4. Buněčná linie PC12.....	24
<b>3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....</b>	<b>25</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>26</b>
4.1. Materiál.....	26
4.2. Metody.....	27
4.2.1. Peptidy CART a jejich analogy.....	27
4.2.2. Jodace peptidu CART.....	29
4.2.3. Pěstování buněčné linie PC12.....	29
4.2.4. Vazebné experimenty <sup>125</sup> I – CART(61-102) s buňkami PC12.....	30
4.2.4.1. Teorie vazebných experimentů.....	30
4.2.4.2. Saturační vazebné experimenty.....	31
4.2.4.3. Kompetitivní vazebné experimenty.....	32
4.2.4.4. Analýza dat získaných z vazebných experimentů.....	32
4.2.5. Sběr vzorků pro stanovení buněčné signalizace na buňkách PC12 účinkem peptidu CART a jeho analogů.....	32
4.2.6. Stanovení bílkovin.....	33
4.2.7. Detekce proteinů buněčné signalizace metodou Western blot.....	33
4.2.7.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE).....	33
4.2.7.2. Přenos proteinů na PVDF membránu.....	33
4.2.7.3. Detekce proteinů na PVDF membráně.....	34
4.2.8. Stanovení aktivity acetylcholinesterasy.....	36
4.2.9. Stanovení příjmu potravy u myší.....	37
4.2.9.1. Experimentální zvířata.....	37
4.2.9.2. Zavedení ICV kanýl.....	37
4.2.9.3. ICV podání látek.....	38
4.2.9.4. Test příjmu potravy.....	38
4.2.10. Test pohybu v otevřeném prostoru „open field“ a analgetické účinky pomocí testu na horké plotně „hot plate“.....	38
4.2.11. Výpočty a statistika.....	39
<b>5. VÝSLEDKY.....</b>	<b>40</b>

5.1.	Analogy peptidu CART .....	40
5.2.	Buněčná linie .....	40
5.3.	Vazebné experimenty .....	42
5.3.1.	Saturační vazebné experimenty .....	42
5.3.2.	Kompetitivní vazebné experimenty .....	44
5.4.	Buněčná signalizace .....	47
5.5.	Vliv peptidu CART na aktivitu acetylcholinesterasy .....	51
5.6.	Stanovení příjmu potravy u myší .....	53
5.7.	Test pohybu v otevřeném prostoru „open field“ a analgetické účinky pomocí testu „hot plate“ .....	55
<b>6.</b>	<b>DISKUZE</b> .....	57
6.1.	Vazba peptidu CART a jeho analogů k buněčné linii PC12 .....	57
6.2.	Anorektický, sedativní a analgetický účinek peptidu CART a jeho analogů u myší .....	58
6.3.	Aktivita acetylcholinesterasy .....	59
6.4.	Signalizace peptidu CART v buňkách PC12 .....	60
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	61
<b>8.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	62

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-HT	– 5-hydroxytryptamin
AChE	– Acetylcholinesterasa
Acm	– Acetamidomethyl
ACTH	– Adrenokortikotropní hormon (Adrenocorticotropic hormone)
AgRP	– Agouti Related Peptide
AMP	– Adenosinmonofosfát
ANOVA	– Analýza rozptylu (Analysis of variance)
ARC	– Nucleus arcuatus
ATP	– Adenosintrifosfát
B <sub>max</sub>	– Celkový počet receptorů
BMI	– Index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
CART	– Kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (Cocaine- and amphetamine-regulated transcript)
CB 1	– Kanabinoidní receptor typu 1
CCK	– Cholecystokinin
CREB	– Cyclic AMP-response-element-binding protein
CRH	– Kortikoliberin (Corticotropin releasing hormone)
CNS	– Centrální nervová soustava
Dex	– Dexametason
DMN	– Nucleus dorsomedialis
DMX	– Dorsal motor nucleus nervu vagu
DTNB	– 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoová kyselina)
ERK	– Extracellular signal-regulated kinase
GABA	– $\gamma$ -amino máselná kyselina
GIT	– Gastrointestinální trakt
GLP-1	– Glukagonu podobný peptid 1 (Glucagon-like peptide 1)
GPCR	– Receptor spojený s G proteinem (G-protein coupled receptor)
GTP	– Guanosintrifosfát
HPA	– Hypothalamo-hypofýzo-adrenální
IC <sub>50</sub>	– Inhibiční koncentrace
ICV	– Intracerebroventrikulární podání (Intracerebroventricular)



JNK	– c-Jun N-terminal kinase
$K_d$	– Rovnovážná disociační konstanta
LHA	– Laterální hypothalamus
MCH	– Hormon koncentrující melanin (Melanin concentrating hormone)
MC4R	– Receptor MCH
ME	– Median eminence
$\alpha$ -MSH	– Hormon stimuluující $\alpha$ -melanocyty ( $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone)
NA	– Noradrenalin
NGF	– Nervový růstový faktor (Nerve growth factor)
NPY	– Neuropeptid Y
NTS	– Nucleus tractus solitarius
PACAP	– Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PAGE	– Polyakrylamidový gel
PEI	– Polyethylenimin
POMC	– Pro-opiomelanokortin (Pro-opiomelanocortin)
PP	– Pankreatický polypeptid
PTX	– Pertussis toxin
PVDF	– Polyvinyliden difluorid
PVN	– Paraventriculární jádro
PYY	– Peptid YY
SAPK	– Stress-activated protein kinase
SDS	– Dodecylsulfát sodný (Sodium dodecyl sulfate)
S.E.M.	– Střední chyba průměru (Standard Error of the Mean)
TRH	– Tyroliberin (Thyrotropin releasing hormone)
VMN	– Ventromediální jádro
WHO	– Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

# 1. ÚVOD

Obezita se v dnešní době vyskytuje téměř po celém světě a závažnost zdravotních komplikací v důsledku obezity začíná vytlačovat podvýživu či infekční nemoci (Kopelman, 2000). Od roku 1980 se rozšíření obezity více než zdvojnásobilo. Podle informací WHO z roku 2008 mělo 1,5 miliardy obyvatel nadváhu, z ní pak 200 milionů mužů a téměř 300 milionů žen bylo obézních. Nadváha však prudce narůstá i u dětské populace. V roce 2010 trpělo nadváhou až 50 milionů dětí (Heal et al., 2012; Internetový odkaz 1).

Dříve se předpokládalo, že obezita je problémem hlavně vyspělých zemí, především vlivem sedavého způsobu života a vysokoenergetické stravy, avšak obezita se vyskytuje i v zemích s nižší ekonomickou úrovní a rozvojových zemích, neboť i zde je kvalitní zdravá strava nahrazována velmi tučným, kalorickým, avšak levným jídlem (Tsigos et al., 2008). Do budoucna je trendem růst počtu osob s nadváhou a obézních, proto je nutné intenzivně se zabývat regulací příjmu potravy a možností snížení obezity v populaci.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Obezita

Obezita je charakterizována jako nadměrné uložení tělesného tuku (tukové tkáně) v organismu. Vznik obezity je zapříčiněn především vlivem prostředí a také genetickými faktory. Nerovnováha mezi energetickým příjmem a výdejem, tedy příjmem kaloricky bohaté stravy a nedostatkem pohybové aktivity vede při dlouhodobém působení ke hromadění tuku v organismu. Po dobu dlouhého lidského vývoje, během kterého naši předci zažívali období nedostatku potravy, byly vyvinuty mechanismy k uchování energie. V minulosti však nebylo potřebné vytvářet mechanismy k obraně před nadbytečným příjmem energie, které by byly v dnešní době tak potřebné (Kopelman, 2000; Haluzík, 2002; Internetový odkaz 2).

Pro určení stupně nadváhy a obezity bylo vypracováno mnoho metodik. Nejčastěji užívaným je Queteletův index, též Body Mass Index (BMI) (tabulka 1) vytvořený Adolphem Queteletem v polovině 19. století (Haluzík, 2002).

$$\text{Queteletův index (BMI)} = \frac{\text{tělesná hmotnost v kg}}{\text{tělesná výška v m}^2}$$

**Tabulka 1.** Klasifikace obezity podle WHO

BMI (kg · m <sup>-2</sup> )	Klasifikace	Riziko komplikací obezity
< 18,5	podváha	nízké (riziko jiných chorob)
18,5 - 24,9	normální váha	průměrné
25,0 - 29,9	nadváha	mírně zvýšené
30,0 - 34,9	obezita I. stupně	středně zvýšené
35,0 - 39,9	obezita II. stupně	velmi zvýšené
≥ 40,0	obezita III. stupně	vysoké

### **2.1.1. Zdravotní komplikace obezity**

Obezita není jen kosmetický problém, ale je příčinou mnoha zdravotních komplikací. Osoby s nadváhou a obezitou se často dožívají nižší délky života, neboť jim hrozí kardiovaskulární onemocnění (vysoký krevní tlak, arytmie, infarkt myokardu) a mozkové příhody. Neméně často se u nich rovněž vyskytují metabolické poruchy, především diabetes mellitus 2. typu či hyperlipidémie. Mezi další možná zdravotní rizika obezity patří onemocnění trávicího systému (žaludeční a střevní problémy, žlučové kameny a nemoci jater), ortopedické problémy (osteoartróza), kožní onemocnění (strie, celulitida, ekzémy). Vlivem vysoké hmotnosti také hrozí spánková apnoe, trombóza žil či snížení plodnosti a případné komplikace při těhotenství. Kromě fyzických zdravotních problémů je však potřeba zmínit i problémy psychické a sociální. Jedinci s nadváhou a obezitou často trpí sníženým sebevědomím a depresemi (Kopelman, 2000; Heal et al., 2012).

### **2.1.2. Léčba obezity**

Obezitu můžeme léčit snížením energetického příjmu, tedy úpravou jídelníčku, ve kterém jsou omezeny především tuky a je zařazena zelenina a ovoce. Během léčby je rovněž potřeba zvýšit energetický výdej a zapojit pohybovou aktivitu do každodenního života. V neposlední řadě je také vhodné zařazení psychoterapie či je možné přistoupit i k farmakologické léčbě (Bray and Tartaglia, 2000; Haluzík, 2005; Atkinson, 2008).

U mnoha obézních pacientů dodržování diety a pohybové aktivity často nepomáhá snížit jejich hmotnost, proto se přistupuje k farmakologické léčbě či k bariatrické operaci. Tato léčba je však vždy pouze doplňková k správnému stravovacímu režimu a zvýšenému pohybu (Heal et al., 2012). Léky na obezitu můžeme rozdělit na centrálně a periferně působící. V Evropě není v současné době na trhu žádný lék působící přímo v CNS (centrální nervová soustava). V USA jsou povolena sympatomimetika jako phentermin a další, která tlumí nadměrnou chuť k jídlu. Užívání těchto léků může být pouze krátkodobé. Z důvodu častého výskytu nežádoucích účinků byl tento přípravek stažen z trhu ve všech státech EU (Internetový odkaz 3). Mezi další léky ovlivňující centrum sytosti v mozku patří sibutramin, který ovlivňuje zpětnou absorpci serotoninu a noradrenalinu. Sibutramin byl přes své účinky při snižování hmotnosti stažen z celého trhu Evropské Unie, neboť bylo prokázáno, že lék zvyšuje riziko kardiovaskulárních příhod (infarkt myokardu a cévní mozková příhoda) (Heal et al., 2012; Internetový odkaz 4). Jinou možností léčby

byl rimonabant (Acomplia – Sanofi-Aventis), kde je účinnou látkou antagonistou kanabinoidního receptoru, který blokuje kanabinoidní receptory typu 1 (CB1), nacházející se v nervové soustavě. V listopadu 2008 byl však ukončen prodej tohoto přípravku ve všech státech EU kvůli výraznému zvýšení depresí, poruch spánku, úzkosti a agrese (Bray and Tartaglia, 2000; Haluzík, 2002; Atkinson, 2008; Internetový odkaz 5). V současnosti je na trhu téměř po celém světě uveden pouze jeden přípravek na léčbu obezity – orlistat (Xenical – Hoffman-La Roche, Alli – GlaxoSmithKline), který inhibuje žaludeční a pankreatickou lipázu a zabraňuje tak vstřebávání tuků ze střeva. Novým lékem je Cetilistat, který funguje podobně jako orlistat, ale nezpůsobuje tolik nežádoucích vedlejších efektů, jako je průjem, plynatost, křeče apod. (Heal et al., 2012). V letech 2009-2010 byly ukončeny klinické zkoušky tří nových centrálně působících léků – lorcaserin (Lorqess<sup>®</sup> – Arena/Eisai) agonista serotonergního 5-HT<sub>2C</sub> (5-hydroxytryptamin) receptoru, dále kombinace phentermin + topiramát (Qnexa<sup>®</sup> – Vivus) a bupropion + naltrexon (Contrave<sup>®</sup> – Orexigen/Takeda). Účinné látky v Qnexe jsou phentermin, který je, jak již bylo výše zmíněno, povoleným lékem v USA na léčbu obezity a topiramát – antiepileptikum. V Contravu jsou účinnými látkami bupropion – selektivní inhibitor zpětného vychytávání dopaminu, používaným na léčbu depresí a naltrexon – neselektivní antagonistou opioidního receptoru na léčbu závislosti na alkoholu (Heal et al., 2012).

V případě neúspěšné farmakoterapie lze u jedinců s BMI nad 35 provést chirurgickou operaci – bariatrický zákrok. Nejčastěji prováděný zákrok je laparoskopická bandáž žaludku, kdy se zavede speciální páska kolem žaludku. Tím se redukuje jeho objem a sníží se i pocit hladu. Mezi další nejčastěji prováděný chirurgický zákrok patří žaludeční bypass, kdy je objem žaludku zmenšen a tenké střevo je připojeno těsně za vrátníkem (Strader and Woods, 2005; Matyšková et al., 2008).

Všechna tato léčebná opatření ne vždy vedou k patřičnému výsledku, proto je třeba stále hledat nové možnosti léčby obezity. Jednou z možností jsou nově objevené látky a jejich analogy, které regulují příjem potravy. Velmi atraktivním terapeutickým cílem jsou hormony gastrointestinálního traktu, hormony tukové tkáně a také hormony a neurotransmitery působící v centrálním nervovém systému (Chaudhri et al., 2006).

## **2.2. Regulace příjmu potravy**

Regulace příjmu potravy je velmi komplexní děj, který se odehrává na úrovni CNS v součinnosti s mnoha periferními signály. Chuť k jídlu a sytost je zprostředkována hormony, neurotransmitery a jejich receptory (Bronský and Průša, 2008).

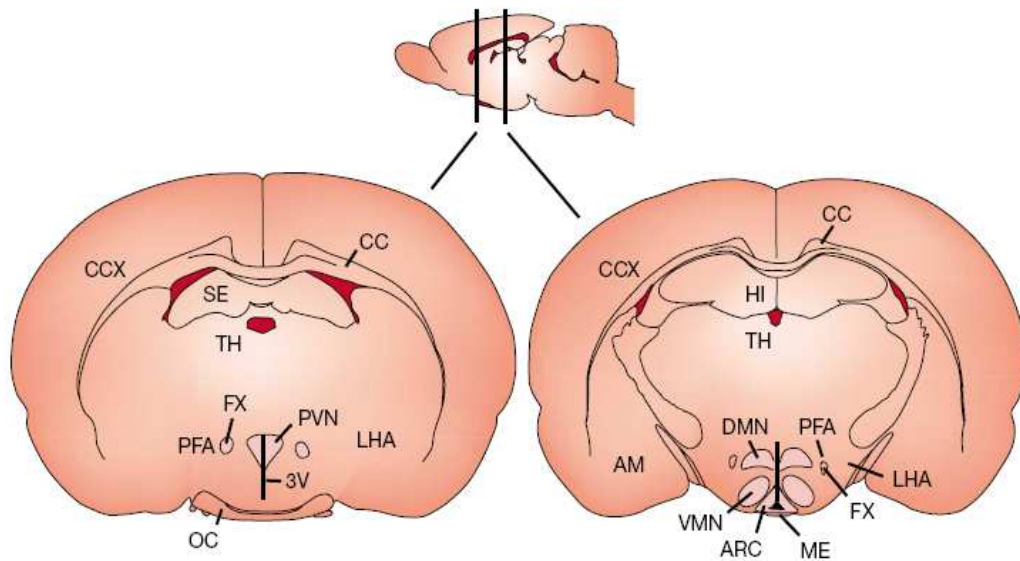
Centrální regulaci příjmu potravy zajišťuje hypothalamus, který obsahuje neurony produkující neuropeptidy zvyšující (orexigenní) či snižující (anorexigenní) příjem potravy. Na signalizaci hladu se podílí skupina orexigenních látek, která způsobuje zvýšení příjmu potravy (hyperfagie). Naopak anorexigenní látky vyvolávají pocit sytosti a příjem potravy snižují (hypofagie) (Schwartz et al., 2000; Atkinson, 2008; Bronský and Průša, 2008).

Mezi periferní regulaci řadíme peptidy ovlivňující příjem potravy pocházející z gastrointestinálního traktu (GIT), pankreatu či z tukové tkáně (Bronský and Průša, 2008).

### **2.2.1. Centrální regulace příjmu potravy**

Hypothalamus je hlavním řídicím centrem regulace příjmu potravy a tělesné hmotnosti, který integruje nervové a hormonální signály z periferie a monitoruje hladiny glukózy a lipidů v krevním séru. Je jednou z částí mezimozku tvořící přední stěnu a dno III. mozkové komory (Schwartz et al., 2000).

V hypothalamu se nacházejí seskupení těl neuronů (jádra), z nichž nejdůležitější pro ovlivňování příjmu potravy a energetické rovnováhy v organismu se nacházejí především ve střední oblasti hypothalamu (obrázek 1). Podle toho, které z jader je aktivováno, může jedinec pociťovat buď nasycení či hlad (Schwartz et al., 2000; Bronský and Průša, 2008).

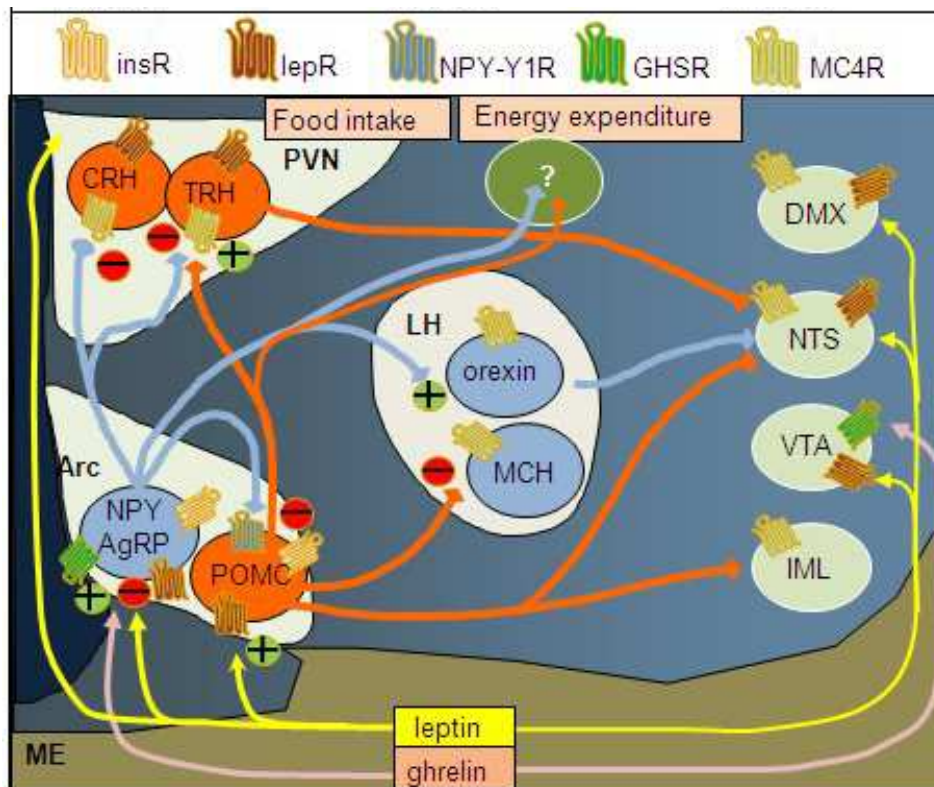


**Obrázek 1. Hlavní hypothalamické oblasti zapojené do regulace příjmu potravy – řez mozkem potkana**

*Nejdůležitější hypothalamická jádra ovlivňující příjem potravy jsou nucleus arcuatus (ARC), laterální hypothalamus (LHA), nucleus ventromedialis (VMN), nucleus paraventricularis (PVN), perifornikální hypothalamus (PFA) a nucleus dorsomedialis (DMN). Zkratky dalších mozkových struktur: amygdala (AM), corpus callosum (CC), mozková kůra (CCX), hipokampus (HI), median eminence (ME), optic chiasm (OC), septum (SE), thalamus (TH), třetí komora (3V), klenba (FX) (Schwartz et al., 2000).*

Hlavním jádrem hypothalamu v regulaci příjmu potravy je **nucleus arcuatus**, který se nachází na spodině hypothalamu po obou stranách třetí mozkové komory (Haluzík, 2002). ARC obsahuje dvě vzájemně propojené skupiny primárních neuronů. Tyto dvě populace neuronů komunikují s ostatními oblastmi hypothalamu jako PVN, DMN a LHA a podílejí se na regulaci chuti k jídlu. První skupina vylučuje neuropeptid Y (NPY) a agouti-related peptid (AgRP), které zvyšují příjem potravy. Druhá skupina neuronů produkuje pro-opiomelanokortin (POMC) a cocaine- and amphetamine- regulated transcript (CART), které snižují příjem potravy (Bouret et al., 2004). POMC je polypeptidový prekursor, ze kterého je v hypothalamu vyštěpen hormon stimulační  $\alpha$ -melanocyty ( $\alpha$ -MSH), který aktivuje MC3 a MC4 melanokortinové receptory a tak inhibuje příjem potravy; blokováním MC4 receptoru se příjem potravy zvyšuje (Adan et al., 2006).

V nucleu arcuatu, který sousedí s oblastí median eminence (ME) s propustnou hematoencefalickou bariérou, se nacházejí receptory pro inzulín, leptin a ghrelin, tedy peptidy, které zprostředkovávají dlouhodobou regulaci příjmu potravy (obrázek 2). Vysoká hladina leptinu a inzulínu stimuluje expresi a sekreci POMC/CART neuronů a inhibuje sekreci NPY/AgRP. NPY/AgRP neurony jsou přímo regulovány ghrelinem, který stimuluje jejich expresi a sekreci (Schwartz et al., 2000; Haluzík, 2002; Morton et al., 2006; Coll et al., 2007; Adan et al., 2008)



**Obrázek 2. Centrální regulace příjmu potravy**

Neurony NPY/AgRP (modře) a POMC/CART (červeně) v ARC patří mezi tzv. primární neurony, obsahují receptory pro leptin (lepR) a inzulín (insR). Leptin a inzulín tyto skupiny neuronů zároveň regulují. NPY/AgRP obsahují navíc ghrelinový receptor (GHSR) a jsou ghrelinem přímo stimulovány. Obě skupiny neuronů vybíhají do nucleu paraventricularis (PVN) a laterálního hypothalamu (LHA), kde jsou lokalizovány tzv. sekundární hypothalamické neurony, které regulují příjem potravy a energetickou homeostázu. Neurony NPY/AgRP a POMC/CART komunikují v PVN s neurony produkujícími tyroliberin (TRH) a kortikoliberin (CRH) (centrální podání těchto látek snižuje příjem potravy) a v LHA, s neurony produkujícími orexin a hormon koncentrující melanin (MCH) (oba způsobují zvýšení příjmu potravy). Leptin a ghrelin dále působí i v NTS (nucleus tractus solitarii), DMX (dorsal motor nucleus nervu vagu) a ve VTA (ventral



*tegmenta area*). *POMC/CART* dále také vybíhají do neuronů v *IML* (*intermediolateral cell column*)  
Význam dalších zkratk: *ME* (*median eminence*), *NPY-Y1R* (*receptor NPY*), *MC4R* (*receptor MSH*)  
(*Luquet and Magnan, 2009*).

Neurony *POMC/CART* a *NPY/AgRP* směřují do **paraventriculárního jádra** a **laterálního hypothalamu**. Laterální hypothalamus („centrum hladu“) je jednou z mála struktur, při jejímž poškození dochází k hypofagii a k poklesu tělesné hmotnosti. Laterální hypothalamus syntetizuje neuropeptidy stimulující příjem potravy jako je *MCH* či *orexin* (obrázek 2) (*Schwartz et al., 2000; Haluzík, 2002*). V *PVN* jsou účinkem *POMC/CART* uvolňovány anorexigenní *CRH* a *TRH*.

### **2.2.2. Periferní regulace příjmu potravy**

Jak bylo řečeno v předchozí kapitole, centrální regulace příjmu potravy navazuje na hormony přicházející z periferie do *ARC*. *Inzulín* pochází z pankreatu, *leptin* z tukové tkáně a *ghrelin* ze žaludku. *Ghrelin* je jediným orexigenním hormonem. Tyto peptidy působí centrálně na dlouhodobou regulaci příjmu potravy (*Schwartz and Morton, 2002*).

Z *GIT* pocházejí i anorexigenní hormony, jako je *cholecystokinin (CCK)*, *oxyntomodulin (OXM)*, *glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1)* a *peptid YY (PYY)* jsou uvolňovány během jídla či v jeho očekávání a omezují příjem potravy (*Adan et al., 2008; Bronský and Průša, 2008*). Některé z nich procházejí hematoencefalickou bariérou a působí přímo v hypothalamu, ale většina z nich působí přes *nervus vagus* a aferentní vlákna do oblasti *nucleus tractus solitarius (NTS)*, která je propojena s nervovými drahami hypothalamických jader. Tak na krátkodobou regulaci příjmu potravy působí i *leptin* a *ghrelin* (obrázek 2).

## **2.3. Peptidy CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript)**

### **2.3.1. Objev a výskyt**

V roce 1981 Spiess a kolektiv objevil peptid s neznámou funkcí, izolovaný z ovčího hypothalamu (Spiess et al., 1981). Později, v roce 1995, objevil Douglass a kolektiv transkript dosud neznámého peptidu, jehož exprese byla stimulována po akutním podání kokainu či amfetaminu (Douglass et al., 1995). Zjistilo se, že neznámý peptid z roku 1981 je kódován právě transkriptem objeveným Douglassem. Tento transkript dostal název kokainem a amfetaminem regulovaný transkript CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) a jeho produkty jsou nazývány peptidy CART (Zhang et al., 2011).

Bylo zjištěno, že CART se nachází u mnoha savců (u primátů, hlodavců, dobytka), ale i u obojživelníků a ryb. Peptidy CART jsou přítomny v mnoha oblastech mozku, CART je nejvíce exprimován v částech spojených s regulací příjmu potravy, jako je ARC, PVN, DMN, LHA hypothalamu či v NTS a také v hypofýze. V periférii se nachází v endokrinních buňkách dřeně nadledvin, pankreatu a žaludku (Kristensen et al., 1998; Zhang et al., 2011).

### **2.3.2. Struktura peptidu CART**

Lidský gen pro CART byl lokalizován na 5. chromozomu v oblasti q13-q14 a je složen ze dvou intronů a tří exonů. Transkripce genu vede ve dvě různě sestřižené mRNA, které mají odlišnou délku. Z těchto dvou mRNA poté vznikají 2 propeptidy buď o 89 nebo 102 aminokyselinách (obrázek 3). Oba tyto peptidy se vyskytují u potkanů a myší, ale u lidí se vyskytuje pouze kratší propeptid. ProCART peptidy jsou postranlačně upraveny prohormon-konvertázou na dvě biologicky aktivní formy peptidů CART(55-102) a CART(62-102) (obrázek 4) (Thim et al., 1998; Maixnerová et al., 2007).

### Potkaní dlouhý propeptid CART

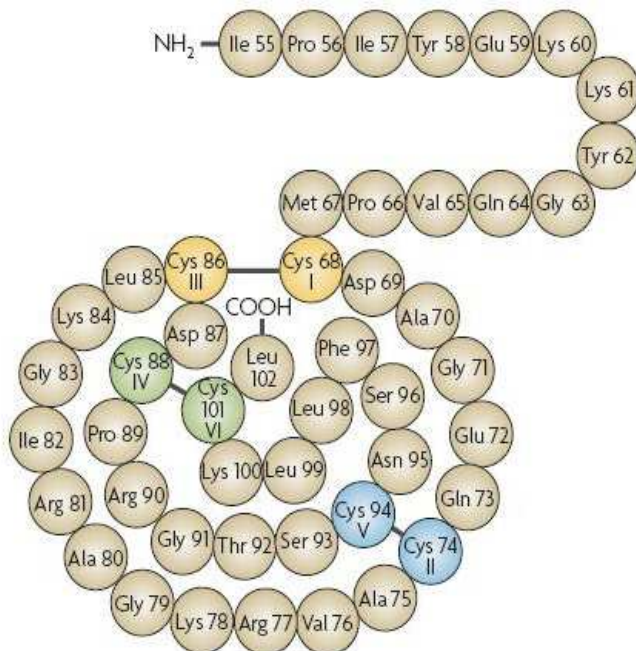
QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKELPRRQLRAPGAVLQIEALQEVLLKLLKSKRIPPIYEKKYGOVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL

### Potkaní krátký propeptid CART

QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKELIIEALQEVLLKLLKSKRIPPIYEKKYGOVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL

**Obrázek 3. Sekvence aminokyselin potkaního dlouhého a krátkého propeptidu CART:**

*Biologicky aktivní peptidy CART(55-102) a (62-102), vyštěpené z dlouhého propeptidu CART, jsou totožné s peptidy (42-89) a (49-89), vyštěpenými z krátkého propeptidu. Místa štěpení pro prohormon-konvertázu jsou znázorněna tučně (Rogge et al., 2008).*



**Obrázek 4. Struktura peptidu CART(55-102):**

*Peptid CART (55-102) s vyznačenými třemi disulfidovými vazbami mezi cysteiny I-III, II-V a IV-VI (Thim et al., 1998).*

### 2.3.3. Fyziologická úloha peptidu CART

CART je velmi rozšířen v CNS i v periférii. V mozku je peptid CART přítomen pouze v neuronech společně s neurotransmitery jako je např. GABA (kyselina gama-aminomáselná) (Thim et al., 1998). Jak již bylo výše zmíněno, peptid CART se v mozku exprimuje a sekretuje především v ARC v hypothalamu. Bylo prokázáno, že jednorázové intracerebroventrikulární podání (ICV) peptidu CART(55-102) hladovým i sytým potkanům vedlo k nižšímu příjmu potravy i potlačení účinku orexigenního NPY. Dlouhodobé opakované podávání peptidu CART(55-102) potkanům snížilo jejich příjem potravy a tělesnou hmotnost, ovšem po třech až pěti dnech tento účinek zmizel (Murphy, 2005).

Peptid CART je přítomen na všech úrovních HPA (hypothalamo-hypofýzo-adrenální) osy: aktivuje neurony uvolňující CRH v PVN. Centrálně podaný peptid CART zvyšuje koncentraci ACTH (adrenokortikotropní hormon) i kortikosteronu v krvi.

Peptid CART má důležitou roli v návykovém chování a při odměňování. Jeho exprese je zvýšena po podávání kokainu či amfetaminu, které způsobuje rovněž uvolnění dopaminu vedoucí k větší lokomoční aktivitě. Peptid CART tuto aktivitu tlumí dosud neobjasněným mechanismem.

Periferní podání peptidu stimuluje pankreatickou exokrinní sekreci inzulínu z pankreatu podobně jako GLP-1, s nímž působí v tomto směru synergisticky (Murphy, 2005).

U myši s vyřazeným genem pro CART nedochází ke změně ve stravovacím chování ani v hmotnosti, nicméně při vysokokalorické stravě dochází k nárůstu jejich hmotnosti a tělesného tuku (Murphy, 2005).

### 2.3.4. Receptor peptidu CART a buněčná signalizace

Po objevu CART mRNA a peptidů bylo realizováno mnoho pokusů s cílem nalézt receptor pro CART. Navzdory tomu nebyl receptor peptidu CART stále ještě nalezen, ačkoliv bylo publikováno několik studií o specifické vazbě peptidu CART k různým buňkám a tkáním a o jeho intracelulárním působení.

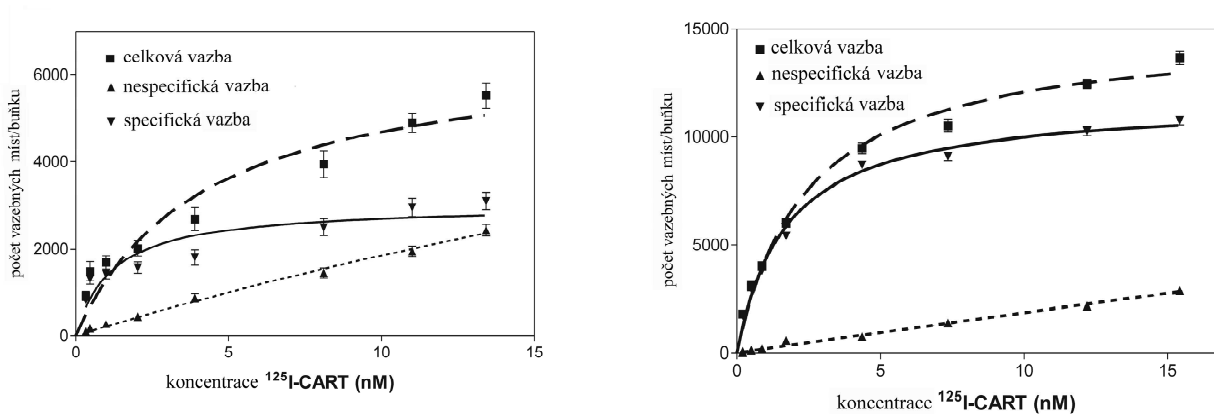
Bylo ukázáno, že  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) se váže na hypofyzární buněčnou linii AtT20 a z vazby je vytěsňován peptidem CART(55-102) (Vicentic et al., 2005).

Dále byla popsána vazba fuzního proteinu vytvořeného z CART(55-102) a GFP (green fluorescent protein) k hepatocytárním buňkám HepG2 a disociovaným hypothalamickým buňkám. Tento fúzní protein po ICV podání myším signifikantně potlačoval příjem potravy, jeho biologická aktivita tedy zůstala částečně zachována (Keller et al., 2006).

Následující studie publikována v naší skupině prokázala specifickou vazbu  $^{125}\text{I}$  CART k feochromocytomálním buňkám PC12, k buňkám PC12 diferencovaným v neurální fenotyp i k buněčným membránám z těchto buněk (Maletínská et al., 2007). Saturační vazebné experimenty jsou dokumentovány na obrázku 6. Z kompetitivních vazebných experimentů vyplynulo, že peptidy CART(61-102), CART(55-102) a diiodovaný peptid  $\text{I}_2$ -CART(61-102) měly podobnou afinitu k buňkám PC12 s  $K_i$  řádu  $10^{-8}$  M, a že diiodovaný  $\text{I}_2$ -CART(61-102) měl zachován anorexigenní účinek (Maletínská et al., 2007). Obrázek 5 zachycuje výsledné saturační křivky pro buňky PC12 nediferencované a diferencované na neurony.

V naší vazebné studii (Maletínská et al., 2007) s buněčnou linií PC12 nebyl  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) vytěsněn žádným z následujících peptidů: CCK,  $\alpha$ -MSH, TRH, angiotensin II, neurotensin, leptin. Identifikace receptorů peptidů CART, která by umožnila studium mechanismů a funkce peptidu CART, nebyla zatím úspěšná.

U vazebných studií provedených v jiných laboratořích, bylo zjištěno, že radioaktivně značený  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) nevykazuje žádnou afinitu k opioidním receptorům ani k receptorům pro vasopresin, oxytocin, NPY a steroidním receptorům (Vicentic et al., 2006).



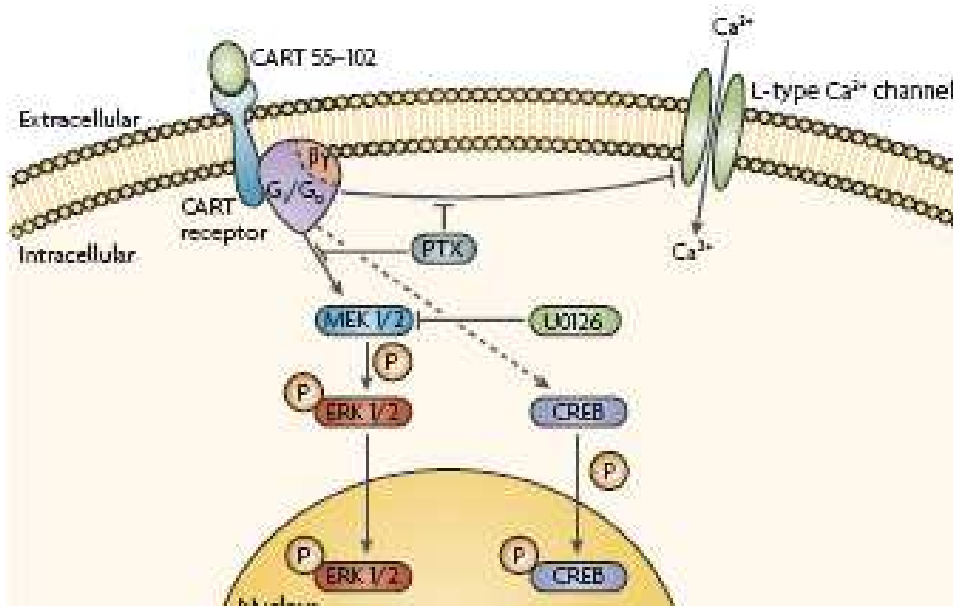
**Obrázek 5. Saturační vazba  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) k buňkám PC12 nediferencovaným a diferencovaným v neurony**

*Buňky byly inkubovány 30 min při 37°C se zvyšující se koncentrací  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba)  $2 \times 10^{-6}$  M CART(61-102) (Maletínská et al., 2007).*

To, že peptid CART působí na receptor, potvrzuje fakt, že po centrálním podání peptidu CART se zvyšuje exprese raného genu c-Fos, která je ukazatelem neuronové aktivity (Vrang et al., 1999).

Pro buněčnou signalizaci peptidu CART bylo navrženo schéma (obrázek 6), které shrnuje tři experimenty. První, že přidáním peptidu CART(55-102) k primární hipokampální buněčné kultuře došlo ke snížení transportu vápníku vápníkovými kanály. Předpokládalo se, že toto probíhá aktivací inhibičního G-proteinu  $G_i/o$  (Yermolaieva et al., 2001). Druhý, že v neuronech CRH v PVN docházelo při centrálním podání peptidu CART ke zvýšené fosforylaci CREB (cyclic AMP-response-element-binding protein) (Sarkar et al., 2004). A třetí, že peptid CART v hypofyzárních buňkách GH3 a AtT20 zvýšil fosforylaci ERK (extracellular signal-regulated kinase). Tyto a další pokusy vedly k názoru, že peptidy CART signalizují přes G-protein a tedy GPCR (G-protein-coupled receptor) (Lakatos et al., 2005).

Rovněž je potřeba zmínit, že u vazby peptidu  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) k primární buněčné linii připravené z potkaního nucleu accumbens (Jones and Kuhar, 2008) došlo ke snížení vazby v přítomnosti analogů GTP (guanosintrifosfát), na rozdíl od analogů ATP (adenosintrifosfát), které neměly na afinitu vliv. Tento fakt může dokládat, že receptor pro CART je receptor spážený s G proteinem (Jones and Kuhar, 2008).

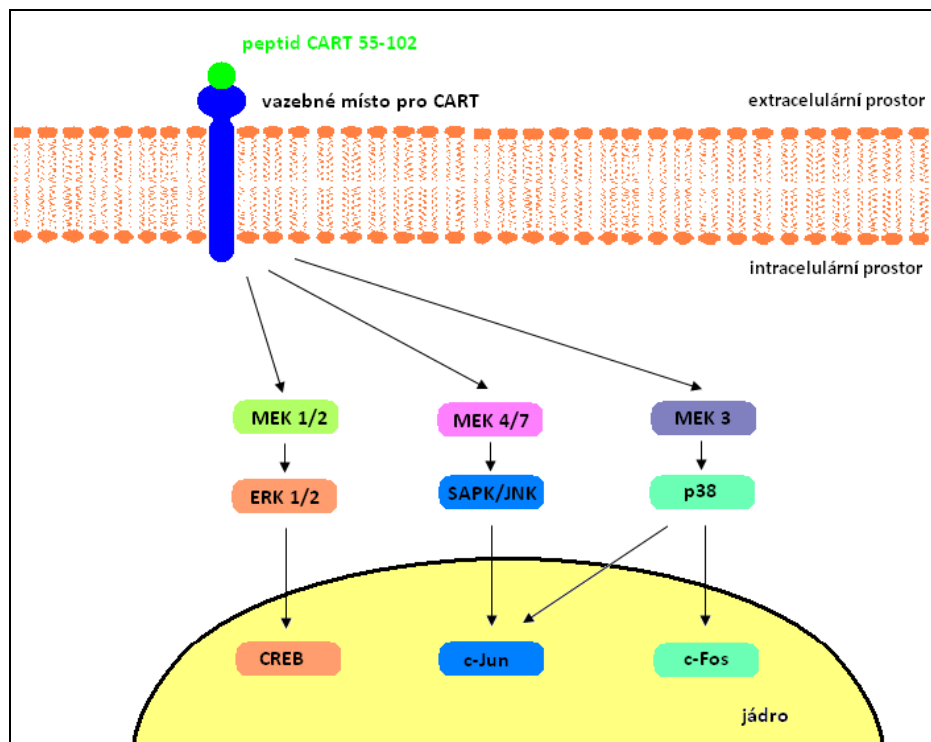


**Obrázek 6. Navržená signalizace pro peptid CART**

*Peptid CART aktivoval přinejmenším tři signalační mechanismy. 1. CART(55-102) inhibuje vápníkové kanály v hipokampálních neuronech; toxin bakterií černého kašle (pertussis toxin – PTX)*

tento účinek rušil. 2. CART(55-102) zvýšil u hladových i sytých myši fosforylaci CREB v jádře neuronů, produkujících CRH v PVN. Přerušovaná čára ukazuje, že zatím není známo, zda je tento účinek peptidu CART zprostředkován inhibičními G-proteiny. 3- Peptid CART zvýšil fosforylaci ERK u hypofyzární buněčné linie AtT20 a GH3, tento efekt byl blokován PTX i U0126, inhibitorem MEK kinasy, která ERK fosforyluje.(Rogge et al., 2008)

Protože všechny zmíněné signalizační dráhy připisované peptidu CART se vyskytují v buňkách PC12, u nichž jsme jasně prokázali specifickou vazbu peptidu CART, zaměřili jsme se v této práci na sledování aktivace těchto signalizačních drah peptidem CART v buňkách PC12. Možné signalizační dráhy jsou znázorněny na obrázku 7.



**Obrázek 7. Schéma možných signalizací peptidu CART**

Peptid CART může signalizovat třemi signalizačními dráhami – dráhou MEK1/2 (MAPK/ERK kinasa), MEK 4/7 a MEK 3. Vysvětlení zkratk: SAPK – stress-activated protein kinase, JNK – c-Jun N-terminal kinase, c-Jun, c-Fos – rané geny.

## 2.4. Buněčná linie PC12

Buněčná linie PC12 je sekundární buněčnou linií pocházející z potkaního feochromocytomu, nádoru dřeně nadledvin. Za běžných podmínek se buněčná kultura chová jako nezralé chromafinní buňky nadledvin a buňky jsou kulovitěho tvaru (Adler et al., 2006).

Působením nervového růstového faktoru (NGF) se buňky diferencují. Přestávají se dělit, zastavují svůj růst (Greene and Tischler, 1976), vytvářejí nervové výběžky a mění se v neuronální síť. Rovněž se stávají elektricky dráždivé a citlivé na acetylcholin. Zvyšují počet vápenatých kanálů a aktivněji syntetizují některé neurotransmitery (Adler et al., 2006); (Greene and Rukenstein, 1981).

Další látka, která rovněž vyvolává u buněk PC12 diferenciaci na neurony je peptid PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) (Vaudry et al., 2002).

V přítomnosti glukokortikoidu dexametasonu se buňky PC12 mění na zralé chromafinní buňky dřeně nadledvin se zvýšenou aktivitou tyrosin hydroxylázy, která katalyzuje tvorbu dopaminu z tyrosinu (Adler et al., 2006).

Jak již bylo výše zmíněno, buňky PC12 se po diferenciaci NGF mění na neuronální síť, která je elektricky dráždivá a citlivá na podání acetylcholinu (Adler et al., 2006). Buňky PC12 reagují na neurotransmitter acetylcholin tím, že produkují enzym acetylcholinesterasu (AChE), která acetylcholin rozkládá, čímž se ukončí mechanismus neurotransmise. Je potřeba zjistit zda-li látky ovlivňující morfologii této buněčné linie, jako je právě NGF, ale i dexametason či PACAP rovněž ovlivňují aktivitu AChE, která bývá užívána jako ukazatel diferenciaci PC12 buněk.



### 3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Stanovit vazebnou afinitu analogů peptidu CART k buňkám PC12 a posoudit významnost jednotlivých disulfidových můstků pro biologickou aktivitu peptidu CART.
2. Prověření *in vivo* aktivity analogů peptidu CART, které prokázaly vysokou vazebnou afinitu k buňkám PC12.
3. Identifikace možných signalizačních drah peptidu CART v buňkách PC12, k nimž se peptid CART specificky váže.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1. Materiál

Acetylcholin jodid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Akrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bisakrylamid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bromfenolová modř	Fluka, Buchs, Švýcarsko
c-Fos (9F6) králičí mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
c-Jun (60A8) králičí mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
CREB (86B10) myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
Dexametason (Dex)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Dodecylsulfát sodný (SDS)	Sigma, St. Louis, MO, USA
5,5'-dithiobisnitrobenzoová kyselina (DTNB)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Duracrol	Spofa – Dental, ČR
Fetální hovězí sérum (FBS) Standard quality	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Fosfo-CREB (S133) (1B6) myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
Fosfo-p-44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
Fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) králičí mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
Fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) králičí mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
Fyziologický roztok	Infusia, Hořátev, ČR
D-glukosa bezvodá	PENTA, Chrudim, ČR
L-glutamin 200 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
HEPES	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hovězí pankreatický inhibitor proteáz (BPTI)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hovězí sérový albumin (BSA)	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Iodo-Gen	Pierce Chemicals Co., Rockford, IL, USA
Koňské sérum (HS)	Invitrogen Grand Island, NY, USA
Merkaptoethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin myší mAb	Sigma, St. Louis, MO, USA
Na <sup>125</sup> I	MP Biomedicals, Illkirch, Francie
NGF	Sigma, St. Louis, MO, USA
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, St. Louis, MO, USA

p38 MAP Kinase králičí mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
Penicilin/streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Peptid CART(54-102) a CART(61-102)	Novo Nordisk, Kodaň, Dánsko
Peroxidázový konjugát připravený v koni	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
Peroxidázový konjugát připravený v koze	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
Persíran amonný	Fluka, Buchs, Švýcarsko
Polyethylenimin (PEI)	Sigma, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640	Sigma, St. Louis, MO, USA
SAPK/JNK (56G8) králičí mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA, USA
SB230580	Sigma, St. Louis, MO, USA
SP600125	Sigma, St. Louis, MO, USA
Standard dual color	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Trizma base Primary Standard and Buffer	Sigma, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Koch-Light Lab. Colnbrook, Berks, VB
U0126	Sigma, St. Louis, MO, USA

Dále byly používány v laboratoři běžně dostupné chemikálie v analytické čistotě dodávané firmou Lachema, a.s. ČR a Sigma-Aldrich, USA.

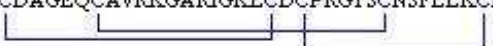
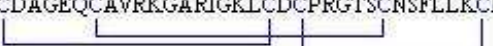

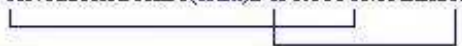
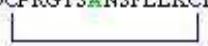
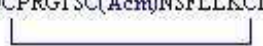
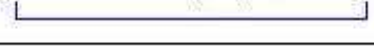

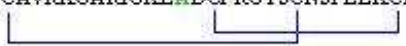
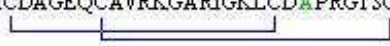
## 4.2. Metody

### 4.2.1. Peptidy CART a jejich analogy

Peptidy CART(54-102) a CART(61-102) byly darovány farmaceutickou firmou Novo Nordisk (Kodaň, Dánsko). Analogy peptidu CART byly syntetizovány v Ústavu organické chemie a biochemie, AVČR, v.v.i., Praha na oddělení peptidové syntézy. Jejich přehled a sekvence je uveden v tabulce 2.

**Tabulka 2. Struktura testovaných analogů peptidu CART**

Číslování je odvozeno od pre-propeptidu CART, červeně jsou označeny začátky peptidů, cysteiny tvořící disulfidickou vazbu, jsou vyznačené modrými čarami. Zkratky: Acm – acetamidomethyl.

Analog	Sekvence
<b>CART(54-102)</b>	54 61 68 74 86 88 94 101 RVPIYEK <b>K</b> YGVPMCDAGEQ <b>CAVRK</b> GARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL 
<b>CART(61-102)</b>	61 68 74 86 88 94 101 <b>K</b> YGVPMCDAGEQ <b>CAVRK</b> GARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL 
<b>Analog 1</b> [Nle <sup>67</sup> ] CART(61-102)	61 67 68 74 86 88 94 101 <b>K</b> YGV <b>P(Nle)</b> CDAGEQ <b>CAVRK</b> GARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL 
<b>Analog 2</b> [Cys(Acm) <sup>64</sup> ] CART(74-102)	74 86 88 94 101 CAVR <b>K</b> GARIGKLC(Acm)DCPRGTSCNSFLLKCL 
<b>Analog 3</b> [Ala <sup>74,94</sup> , Cys(Acm) <sup>63,84</sup> ] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 <b>K</b> YGVPMQ(Acm)DAGEQ <b>CAVRK</b> GARIGKLC(Acm)DCPRGT <b>S</b> AN <b>S</b> FLLKCL 
<b>Analog 4</b> [Ala <sup>63,84</sup> , Cys(Acm) <sup>74,94</sup> ] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 <b>K</b> YGVPM <b>A</b> DAGEQ <b>C</b> (Acm)AVR <b>K</b> GARIGK <b>L</b> DCPRGT <b>S</b> C(Acm)NSFLLKCL 
<b>Analog 5</b> [Ala <sup>88,101</sup> , Cys(Acm) <sup>63,84</sup> ] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 <b>K</b> YGVPMQ(Acm)DAGEQ <b>CAVRK</b> GARIGKLC(Acm)D <b>A</b> PRGTSCNSFLL <b>K</b> <b>A</b> L 
<b>Analog 6</b> [Ala <sup>74,94</sup> ] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 <b>K</b> YGVPMCDAGEQ <b>CAVRK</b> GARIGKLCDCPRGT <b>S</b> AN <b>S</b> FLLKCL 
<b>Analog 7</b> [Ala <sup>63,84</sup> ] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 <b>K</b> YGVPM <b>A</b> DAGEQ <b>CAVRK</b> GARIGK <b>L</b> DCPRGTSCNSFLLKCL 
<b>Analog 8</b> [Ala <sup>88,101</sup> ] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 <b>K</b> YGVPMCDAGEQ <b>CAVRK</b> GARIGKLC <b>A</b> PRGTSCNSFLL <b>K</b> <b>A</b> L 

#### 4.2.2. Jodace peptidu CART

Jodace peptidu CART(61-102) probíhala s Na<sup>125</sup>I (IZOTOP, Budapešť, Maďarsko) za použití Iodo-genu (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) (Fraker and Speck, 1978) v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,2, obsahujícím 0,15M NaCl po dobu 15 minut při laboratorní teplotě v laboratoři Radioizotopy, ÚOCHB, v.v.i., AVČR Praha podle návodu výrobce (Maixnerová et al., 2007).

Separace nejodovaného, mono-jodovaného a di-jodovaného peptidu CART(61-102) byla provedena na RP-HPLC s použitím kolony Luna 3 $\mu$ m fenyl-hexyl 150mm x 4,6mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) v gradientu 20 až 25 % acetonitrilu ve vodě obsahující 0,1% trifluoroctovou kyselinu po dobu 60 minut (Maletínská et al., 2007).

Mono-jodovaný <sup>125</sup>I-CART(61-102) byl uchován v alikvotech při -20 °C a spotřebován pro vazebné experimenty v průběhu jednoho měsíce (Maixnerová et al., 2007).

#### 4.2.3. Pěstování buněčné linie PC12

Linie potkaních feochromocytomálních buněk byla zakoupena od firmy ATCC (Manassas, VA, USA). Kultivace buněk probíhala ve sterilním prostředí za standardních podmínek pro pěstování buněčných linií. Buňky byly pěstovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru (MCO 18AIC, Sanyo, Osaka, Japonsko), při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Kultivační médium RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) obsahovalo 10 % inaktivovaného koňského séra (IHS) (Invitrogen Grand Island, NY, USA), 5% inaktivovaného fetálního hovězího séra (IFBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko), L-glutamin ve finální koncentraci 2mM (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) a penicilin/streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) rovněž ve finální koncentraci 2mM (Maletínská et al., 2007).

Pro dosažení exponenciálního růstu byla buněčná linie pasážována jednou týdně. Pro vazebné experimenty byly použity 24-jamkové destičky (Nuclon, NUNC, Roskilde, Dánsko), potažené polyethyleniminem (PEI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) s průměrem jamky 15mm. Byly užity buď nediferencované buňky PC12, buňky diferencované na neurony pomocí nervového růstového faktoru (NGF) či buňky diferencované na chromafinní pomocí dexametasonu (Dex). Pro dosažení optimální hustoty nediferencovaných buněk pro vazebné experimenty, tj. 5x10<sup>5</sup> buněk na jamku, byly potřeba dva dny růstu. NGF pro diferenciaci buněk měl koncentraci 50 ng/ml média (Sigma, St. Louis, MO, USA). Médium s NGF bylo u těchto buněk měněno vždy každý první, třetí a pátý den. Diferencované buňky byly použity sedmý den, kdy byla dosažena hustota přibližně

$5 \times 10^5$  buněk na jamku destičky (Maixnerová et al., 2007). Dexametason pro diferenciaci buněk měl koncentraci 50 ng/ml. Médium s Dex bylo měněno rovněž první, třetí a pátý den. Buňky byly použity sedmý den. Stav, kvalita a diferenciaci buněk byla kontrolována před každým pokusem mikroskopicky. Počet buněk byl počítán před pokusem i po pokusu.

Vzorky pro stanovení signalizace byly u nediferencovaných buněk a buněk diferencovaných pomocí NGF či Dex připraveny z buněčného lyzátu. Buňky byly napěstovány na 6-jamkových či 24-jamkových destičkách potažených PEI. Optimální hustota buněk byla  $4 \times 10^5$  na jamku (24-jamková destička) a  $9 \times 10^5$  na jamku (6-jamková destička). Počet buněk byl počítán před pokusem i po pokusu.

Pro metodu stanovení acetylcholinesterasy byly nediferencované buňky PC12 napěstovány na 6-jamkových destičkách potažených PEI. Počet buněk byl počítán před pokusem i po pokusu (Adler et al., 2006).

#### 4.2.4. Vazebné experimenty $^{125}\text{I}$ – CART(61-102) s buňkami PC12

##### 4.2.4.1. Teorie vazebných experimentů

Při realizaci vazebných experimentů je třeba dosáhnout rovnováhy mezi asociací ligandu s receptorem a disociací komplexu ligand · receptor, tedy rychlosti skladné a rozkladné reakce. Tento děj můžeme charakterizovat rovnovážnou disociační konstantou  $K_d$  (Motulsky and Neubig, 2002):

$$\frac{[ligand] \times [receptor]}{[ligand \cdot receptor]} = K_d \quad K_d [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} = \text{M}]$$

Rovnovážná disociační konstanta určuje takovou koncentraci ligandu, která v rovnováze obsadí polovinu receptorů.

Vazebné pokusy jsou charakterizovány specifickou ( $B_{sp}$ ) a nespecifickou ( $B_{nsp}$ ) vazbou, jež dohromady tvoří vazebnou radioaktivitu, tedy celkové množství vázaného radioligandu  $B_t$  (Motulsky and Neubig, 2002).

Specifickou vazbou rozumíme navázání radioaktivně značeného ligandu (radioligandu) na konkrétní receptor. Navázání do jiných míst, například na buněčnou membránu či na receptorový transportér, je určeno nespecifickou vazbou.

Saturační vazebné experimenty stanovují celkový počet receptorů  $B_{\max}$  a afinitu ligandu určenou  $K_d$ .

U kompetitivních vazebných experimentů značíme koncentraci neznačeného ligandu, která vytěsňuje polovinu radioligandu z vazebných míst jako  $IC_{50}$  (inhibiční koncentrace 50%). Pro neznačený ligand můžeme užít rovnovážné disociační konstanty  $K_i$ , tj. koncentrace neznačeného ligandu, která se naváže na polovinu vazebných míst bez přítomnosti radioligandu či jiných kompetujících látek (kompetitorů). Hodnota rovnovážné disociační konstanty  $K_i$  je proporcionální k  $IC_{50}$ , tedy pokud je hodnota  $K_i$  nízká,  $IC_{50}$  je rovněž nízká.

Rovnovážnou disociační konstantu  $K_i$  určíme užitím rovnice Chenga a Prusoffa (Chang and Cheng, 1978):

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

$K_i$  – rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu ; M

$IC_{50}$  – inhibiční koncentrace ;  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$

$K_d$  – rovnovážná disociační konstanta ; M

#### 4.2.4.2. Saturační vazebné experimenty

Stanovení specifické vazby bylo provedeno dle podmínek optimalizovaných dříve (Maletínská et al., 2007) ve vazebném pufru (20 mM HEPES pufr o pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5,5 mM glukózy, 1 mg/ml BSA, 0,1 mg/ml BPTI) s koncentracemi  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) v rozmezí 0,5 – 5 nM v celkovém objemu 250  $\mu\text{l}$  na jamku. Pro stanovení nespecifické vazby pro jednotlivé koncentrace značeného peptidu byl současně přítomen neznačený peptid CART(54-102) či CART(61-102) o koncentraci  $10^{-5}$  M. Vazba probíhala 30 minut při 37 °C. Po inkubaci byla jamka třikrát promyta 1ml promývacího pufru (10 mM HEPES pufr o pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5,5 mM glukózy), buňky byly solubilizovány v 0,1 M NaOH po dobu nejméně 15 minut. Radioaktivita vázaná na buňky byla určena pomocí gama-čítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

#### **4.2.4.3. Kompetitivní vazebné experimenty**

Kompetitivní vazebné experimenty byly provedeny s použitím principů Motulského a Neubiga (Motulsky and Neubig, 2002). Metoda byla optimalizována dříve (Maletínská et al., 2007).

Ze všech jamek bylo nejprve odsáto médium, poté byly jamky promyty 1 ml promývacího pufru viz kapitola 4.2.4.2. o teplotě 37 °C. Buňky PC12 byly inkubovány s  $10^{-10}$  M  $^{125}$ I-CART(61-102) a s neradioaktivním peptidem CART(54-102), peptidem CART(61-102) či analogy peptidu CART o koncentraci v rozmezí  $10^{-11}$  –  $10^{-5}$  M ve vazebném pufru viz. kapitola 4.2.4.2. v celkovém objemu 250  $\mu$ l na jamku po 30 minut při 37 °C. Po inkubaci byly buňky promyty promývacím puftrem a solubilizovány jako v kapitole 4.2.4.1., radioaktivita vázaná na buňky byla určena pomocí gama-čítače.

Celková vazba činila 2 až 5 % z přidané radioaktivity. Nespecifická vazba v kompetitivních vazebných experimentech činila méně než 15 % celkové vazby. Pokusy byly provedeny v duplikátech alespoň třikrát pro danou látku (Maletínská et al., 2007).

#### **4.2.4.4. Analýza dat získaných z vazebných experimentů**

Saturační a kompetitivní vazebné křivky byly vyhodnocovány programem Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA), za použití modelu pro vazbu k jednomu vazebnému místu (metodou nelineární regrese byly získány hodnoty  $IC_{50}$ ). Inhibiční konstanty ( $K_i$ ) byly spočítány dosažením  $IC_{50}$  do rovnice Chenga a Prusoffa (Chang and Cheng, 1978) viz kapitola 4.2.4.1. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny jako průměrná hodnota  $\pm$  střední chyba průměru (SEM).

#### **4.2.5. Sběr vzorků pro stanovení buněčné signalizace na buňkách PC12 účinkem peptidu CART a jeho analogů**

Buňky byly napěstovány na 6- či 24-jamkových destičkách, viz kapitola 4.2.3. Asi 16 hodin před pokusem bylo buňkám vyměněno médium se sérem za médium bez séra, obsahující jen 2mM L-glutamin a penicilin. Další den bylo z každé jamky odsáto médium na objem 1 ml u 6-jamkové destičky či na 250  $\mu$ l u 24-jamkové destičky. Do každé jamky poté bylo přidáno buď samotné médium bez séra (kontrola) nebo CART(54-102) do finální koncentrace  $10^{-6}$  M, NGF 50 ng/ml, inhibitory samotné U0126 (inhibitor c-Fos), SB203580 (inhibitor p38), SP600125 (inhibitor c-Jun



a JNK) do  $10^{-5}$ M, či kombinace peptidu CART nebo NGF s inhibitory. Obsah byl inkubován za stálého míchání při 37 °C 10 či 60 minut. Po inkubaci byla destička s roztoky dána na led, médium odsáto a buňky třikrát promyty promývacím pufrům PBS (phosphate-buffered saline; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 1,76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) o teplotě 4 °C. Solubilizace byla provedena po dobu 5 minut v lyzačním pufru (62,5 mM Tris-HCl o pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glycerol, 0,01 % bromfenolová modř, merkaptoetanol, 50mM NaF, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Alikvoty byly uchovány při -20 °C.

#### **4.2.6. Stanovení bílkovin**

Ke stanovení koncentrace bílkovin bylo užito stanovení podle Bradfordové (Bradford, 1976). Z kalibrační křivky hovězího sérového albuminu (BSA) byla odečtena odpovídající koncentrace. Výsledná hodnota pak zprůměrnována ze tří koncentrací proteinu.

#### **4.2.7. Detekce proteinů buněčné signalizace metodou Western blot**

##### **4.2.7.1. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)**

Vzorky (viz kapitola 4.2.5.) byly po dobu 1 minuty sonikovány a po sonikaci zahřáty na 100 °C po dobu 2 minut. Zahřáté vzorky byly centrifugovány 5 minut při 500 x g. Pro identifikaci molekulových hmotností na blotu byl použit dvojbarevný standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Na 4/12 % (4% zaostřovací gel, 12% dělicí gel) SDS-polyakrylamidový gel byly upravené vzorky nanášeny. Jako pozitivní kontrolní proteiny byly použity fosforylovaná MAPK, c-Jun, fosforylovaná JNK a p38 MAPK (všechny: Cell signalling Technology, Beverly MA, USA).

Elektroforéza byla prováděna na přístroji Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Herkules, CA, USA) při konstantním napětí ve dvou krocích, nejprve při 100 V po dobu 10 minut a poté při 150 V po dobu 50-60 minut.

##### **4.2.7.2. Přenos proteinů na PVDF membránu**

Pro stanovení signalizačních fosforylovaných proteinů byly proteiny přeneseny z gelu na membránu PVDF-Immobilon<sup>TM</sup>-P (polyvinyliden difluorid) (Sigma-Aldrich, USA). Přenos proteinů

probíhal v blotovacím pufru o pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20 % methanol) při konstantním napětí 30 V při 4 °C přes noc.

#### **4.2.7.3. Detekce proteinů na PVDF membráně**

Po dokončení přenosu byly membrány promyty v promývacím pufru (TBS o pH 7,6; 20 mM Tris, 140 mM NaCl) s 0,1 % Tween-20 5 minut při pokojové teplotě. Membrány byly inkubovány v blokujícím pufru (5% netučné sušené mléko, TBS, 0,1 % Tween-20, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> a 50 mM NaF) 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byly třikrát promyty promývacím pufrům TBS po 5 minutách. Promyté membrány byly inkubovány 1 hodinu s primární protilátkou zředěnou blokovacím pufrům. Seznam použitých primárních protilátek je uveden v tabulce 3. Membrány byly třikrát promyty promývacím pufrům po 5 minutách. Promyté membrány byly inkubovány se sekundární protilátkou značenou peroxidasou. Seznam užitých sekundárních protilátek je uveden v tabulce 3. Následně byly membrány opět promyty třikrát po 5 minutách v promývacím pufru TBS. Postup byl proveden podle doporučeného protokolu firmy Cell Signalling Technology (Beverly MA, USA).

Po aplikaci činidla Femto (Pierce SuperSignal, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) byla detekována pomocí CCD kamery LAS-3000 (Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, Germany) chemiluminiscence.

**Tabulka 3. Přehled protilátek a ředění**

Název	Charakteristika protilátky a ředění
Primární c-Fos	c-Fos (9F6) králičí mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Primární Fosfo-CREB	Fosfo-CREB (S133) (1B6) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Primární CREB	CREB (86B10) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Primární Fosfo-MAPK	Fosfo-p-44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (E10) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:2000
Primární MAPK	p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:2000
Primární Fosfo-JNK	Fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (98F2) králičí mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Primární JNK	SAPK/JNK (56G8) králičí mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Primární c-Jun	c-Jun (60A8) králičí mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Primární Fosfo-p38	Fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) králičí mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Primární p-38	p38 MAP Kinase králičí mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Sekundární proti myší	Peroxidázový konjugát připravený v koni (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:2000
Sekundární proti králičí	Peroxidázový konjugát připravený v koze (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:2000

#### 4.2.8. Stanovení aktivity acetylcholinesterasy

Acetylcholinesterasa hydrolyzuje acetylthiocholin na thiocholin a acetát. Thiocholin pak reaguje s přidáním dithiobisnitrobenzoátem (DTNB) za vzniku žlutého 5-thio-2-nitrobenzoátu. Toto žluté zbarvení je detekovatelné spektrofotometricky. Poté lze určit množství bílkovin a vypočítat aktivitu AChE za minutu na buňku či aktivitu AChE za minutu na mikrogram bílkoviny. Pro stanovení R (rychlost reakce v molech hydrolyzovaného substrátu acetylcholinu, jednou buňkou PC12 za minutu) bylo užito rovnice (Schwartz et al., 2007):

$$R = \frac{\Delta A}{1,36 \times 10^4} \times \frac{1}{(\mu\text{g buněčného proteinu PC12}/200\mu\text{l lyzátu})}$$

R – rychlost reakce hydrolyzovaného acetylcholinu [ $\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ]

$\Delta A$  – změna absorbance za minutu pro každý vzorek

$1,36 \times 10^4$  – extinční koeficient vzniklého produktu

Buňky byly napěstovány na 6 jamkových destičkách viz kapitola 4.2.3. Do každé jamky bylo přidáno buď samotné médium bez séra nebo CART(61-102) o finální koncentraci  $10^{-6}$  M, NGF o koncentraci 50 ng/ml, PACAP o finální koncentraci  $10^{-7}$  nM a dexametason o finální koncentraci  $2,5 \times 10^{-6}$  M (Schwartz et al., 2007). Po 24 hodinové inkubaci, probíhající za sterilních podmínek v inkubátoru, byla odsáta reakční směs a buňky třikrát promyty promývacím pufrem (PBS o pH 7,4) o teplotě, seškrabány a resuspendovány v 1 ml PBS do připravených zkumavek. Zkumavky byly centrifugovány v mikrocentrifuze při pokojové teplotě. Po opatrném odsátí supernatantu byla peleta resuspendována v 500  $\mu\text{l}$  solubilizačního pufru (10 mM Tris, pH 7,2, 1 M NaCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 % Triton X-100). Alikvoty skladovány při  $-80$  °C (Adler et al., 2006).

Vzorky byly resuspendovány a míchány po dobu 20 s. Pro stanovení aktivity acetylcholinesterasy bylo odebráno vždy 200  $\mu\text{l}$  vzorku, do kterého bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  0,1 M fosfátového pufru o pH 8, směs byla zamíchána opět po dobu 20s. Jako kontrolní vzorek bylo použito 200  $\mu\text{l}$  solubilizačního pufru a 200  $\mu\text{l}$  0,1 M fosfátového pufru o pH 8. Do připravené květy bylo vpraveno 400  $\mu\text{l}$  měřeného vzorku, přidáno 12,5  $\mu\text{l}$  DTNB (kyselina dithio-bis-nitrobenzoová; 4 mg DTNB, 1,5 mg  $\text{NaHCO}_3$  na 1 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7) a promícháno. Po 5 minutovém ustálení roztoku bylo do směsi přidáno 2,5  $\mu\text{l}$  acetylcholin jodidu (21,7 mg/ml vody). Po promíchání byla měřena absorbance směsi při 412 nm po dobu 5 min (Lambda 25, PerkinElmer, USA). Měření bylo zopakováno vždy dvakrát u stejného vzorku (Schwartz et al., 2007).

## 4.2.9. Stanovení příjmu potravy u myší

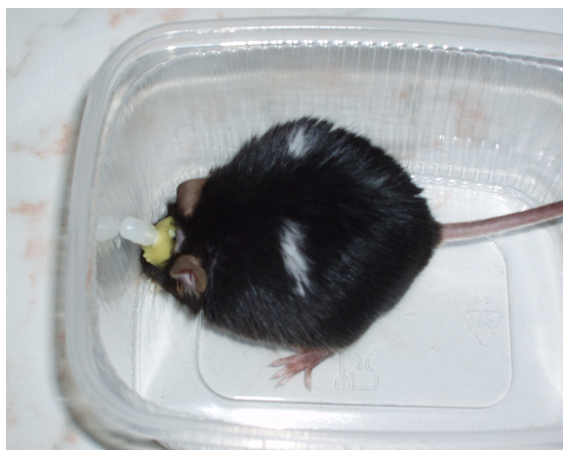
### 4.2.9.1. Experimentální zvířata

Myší samci C57Bl/6 z Anlab PRAHA byli chováni při teplotě 23 °C a denním cyklu 12 hodin světla a 12 hodin tmy (tj. světlo 7:00 – 19:00). K potravě standardní diety (St-1, Mlýn Kocanda, Jesenice) a vodě měli samci volný přístup. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.) a protokol pokusu byl schválen resortní komisí AVČR pro ochranu zvířat (Maletínská et al., 2007).

### 4.2.9.2. Zavedení ICV kanyl

Tato metoda byla provedena podle Maletínské a kol. (Maletínská et al., 2007) u myší ve věku 3 měsíce (25-30g). Myši byly během operace v anestezii (IP injekce ketaminu/xylazinu: 100 mg/kg ketaminu, 16 mg/kg xylazinu). Hlava myši byla fixovaná ve stereotaxickém přístroji a vnější kanyla (Roanoke, VA, USA) se zavedla do třetí mozkové komory (AP (anterior posterior neboli předozadní) 2 mm, V (vertikální) 3 mm od bregmy). Okolo kanyly byla aplikovaná zubařská pryskyřice rozpuštěná v duracrolu (Spofa-Dental, ČR). Po ztvrdnutí pryskyřice se vsunula vnitřní kanyla, aby se zabránilo ucpávání (obrázek 8).

Po operaci byly myši ponechány čtyři dny v klidu a měly volný přístup k potravě a pití. Po tomto období se prováděl pokus na příjem potravy.



**Obrázek 8. Zavedení ICV kanyly**

*Myš s kanylou zavedenou do třetí mozkové komory.*

#### **4.2.9.3. ICV podání látek**

Peptid CART(61-102) (0,5 a 1 µg/myš), analog 1 (0,5 a 1 µg/myš), analog 2 (12,5 µg/myš) a analog 7 (1 a 5 µg/myš) byly podány ICV do třetí mozkové komory. Látky byly podávány v objemu 5 µl.

#### **4.2.9.4. Test příjmu potravy**

V den pokusu byly myši hladové 17 hod, během pokusu měly volný přístup k vodě. Každá koncentrace peptidu byla testována alespoň dvakrát na 6 – 8 myších na skupinu. Po 15 min od ICV podání látky se myším podala předem zvážená potrava a odečet příjmu potravy se prováděl pravidelně po 30 min po dobu 6 hod. Každé zvíře bylo na testování použito pouze jednou a pokus byl opakován vždy s novou sadou myší.

#### **4.2.10. Test pohybu v otevřeném prostoru „open field“ a analgetické účinky pomocí testu na horké plotně „hot plate“**

Vzdálenost, kterou myši urazily v otevřeném prostoru „open field“ (obrázek 10A) a která ukazuje sedativní resp. excitační účinek látek, byla měřena pomocí systému VideoMot (TSE Systems, Bad Homburg, Německo). Myši měly před pokusem volný přístup k potravě i pití. Během pokusu byly myši samostatně ve volném prostoru (rozměry dna 0,5 x 0,5m) a po dobu 10 min byla měřena celková vzdálenost, kterou myš urazila. Myším byl 15 minut před testem ICV podán CART(61-102) (0,5 a 1 µg/myš), analog 1 (0,5 a 1 µg/myš) nebo analog 7 (1 a 5 µg/myš).

Analgetická aktivita horké plotny „hot plate“ vyhřáté na 53 °C (obrázek 10B) testuje bolest vyvolanou tepelným drážděním všech čtyř končetin. Myším byly podávány stejné látky o stejné koncentraci jako u testu pohybu ve volném poli (viz výše). Test byl prováděn po testu pohybu v otevřeném prostoru „open field“.

**(A) Myš v otevřeném prostoru**



**(B) Metoda horké plotny**



**Obrázek 10. Test sedativních účinků v otevřeném poli a test analgesie na horké plotně**

*Obrázek A zachycuje otevřené pole, pro testování sedativních excitačních účinků na pohybovou aktivitu zvířete. Na obrázku B je zachycena horká plotna pro testování analgesie.*

#### **4.2.11. Výpočty a statistika**

Všechny parametry jsou prezentovány v tabulkách a grafech. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pro zjištění směrodatnosti rozdílů mezi skupinami a jsou uvedeny jako průměrná hodnota  $\pm$  střední chyba průměru (SEM). Statistika byla prováděna metodou One-way ANOVA (jednocestná ANOVA) po kterém pak následoval Dunnettův test s použitím programu Graph-Pad Prism. Rozdíly byly považovány za významné, pokud  $P < 0,05$ .

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Analogy peptidu CART

V tabulce 2 (kap. 4.2.1.) je uveden přehled sekvencí analogů peptidu CART. Tyto analogy byly syntetizovány metodou na pevné fázi (Maixnerová et al., 2007). Molekulové hmotnosti peptidů byly ověřené na hmotnostním spektrofotometru MALDI-TOF, Reflex IV hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

Analog 1 má sekvenci aminokyselin téměř stejnou jako peptid CART(61-102), jen methionin je v pozici 67 vyměněn za norleucin (Nle), pro vyšší stabilitu tohoto peptidu, neboť methionin snadno podléhá oxidaci. Všechny tři disulfidové můstky jsou zachovány. Analog 2 je fragmentem CART(61-102) odpovídajícím úseku 74-102. Cystein v pozici 86 je trvale chráněn S-acetamidomethylem (Acm), tj. Cys(Acm)<sup>86</sup> v peptidu jsou zachovány dva zbylé cysteinové můstky v pozici 74-94 (II-V) a 88-101 (IV-VI).

U analogů 3 až 8 peptidu CART(61-102) byly modifikovány disulfidové můstky. Analogy 3, 4 a 5 obsahují jen jeden cysteinový můstek. Analogy 3 a 4 mají jediný disulfidový můstek mezi cysteiny 88-101 (IV-VI). Zbylé dvojice cysteinů, které u peptidu CART(61-102) tvoří disulfidové můstky, jsou modifikovány: jedna dvojice za Acm cysteiny a druhá za alanin. Analog 5 je modifikován podobně, zbylý disulfidový můstek je mezi cysteiny v pozici 74 a 94 (II-V).

Analogy 6 až 8 obsahovaly vždy dva disulfidové můstky a zbylé dva cysteiny nahrazené pokaždé v jiné kombinaci. Analog 7 obsahoval místo cysteinů v pozici 68 a 86 alanin a peptid měl dva disulfidové můstky v pozici 74-94 (II-V) a 88-101 (IV-VI).

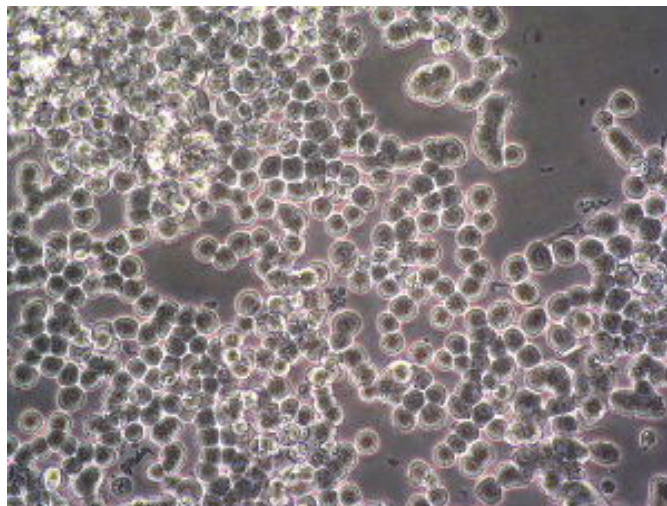
### 5.2. Buněčná linie

Pěstování buněčné linie PC12 probíhalo za standardních sterilních podmínek (viz kapitola 4.2.3). Buňky byly kulovitěho tvaru a tvořily shluky (obrázek 11A). Přidáním NGF se buňky změnily v neuronální fenotyp a tvořily typickou nervovou síť (obrázek 11B). Přidáním dexametasonu bylo úspěšně dosaženo změny v chromafinní buňky, tvarově podobné nediferencovaným buňkám, ale rostoucím v menší hustotě (obrázek 11C).

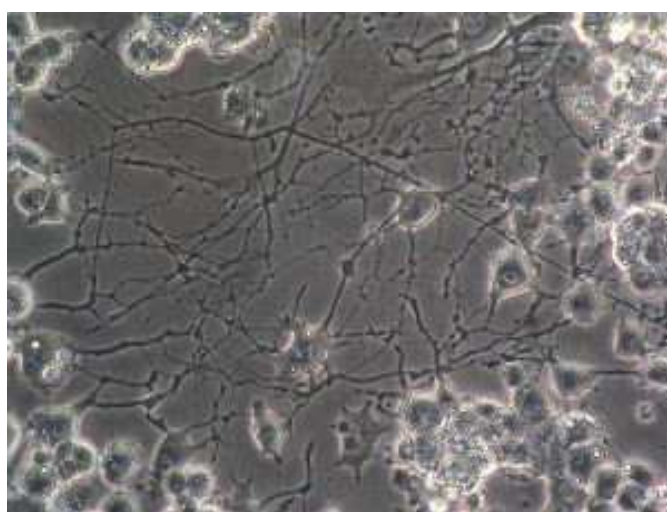
Pro vazebné experimenty byly použity destičky potažené PEI, na které buňky PC12 dobře přisedaly, byly rovnoměrně rozloženy a rovněž se neodlepovaly během prováděného pokusu.



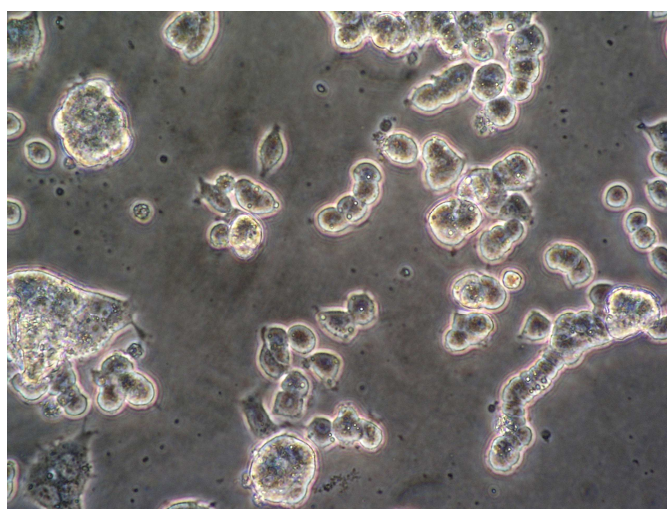
**(A) Nediferencované buňky**



**(B) Buňky diferencované NGF**



**(C) Buňky diferencované Dex**



**Obrázek 11. Buněčná linie PC12**

*Obrázek (A) zachycuje nediferencované buňky PC12. Buňky diferencované NGF jsou na obrázku (B). Na obrázku (C) jsou zachyceny buňky diferencované Dex. Zvětšeno 20x.*

### 5.3. Vazebné experimenty

#### 5.3.1. Saturační vazebné experimenty

Saturační vazebné pokusy na buněčné linii PC12 byly provedeny při optimalizovaných podmínkách, viz kapitola 4.2.4.2. Se zvyšující se koncentrací radioligandu lineárně stoupala nespecifická vazba a byla přibližně 36 % u nediferencovaných buněk, 14 % u buněk diferencovaných NGF a více než 50% u buněk diferencovaných Dex (obrázek 12).

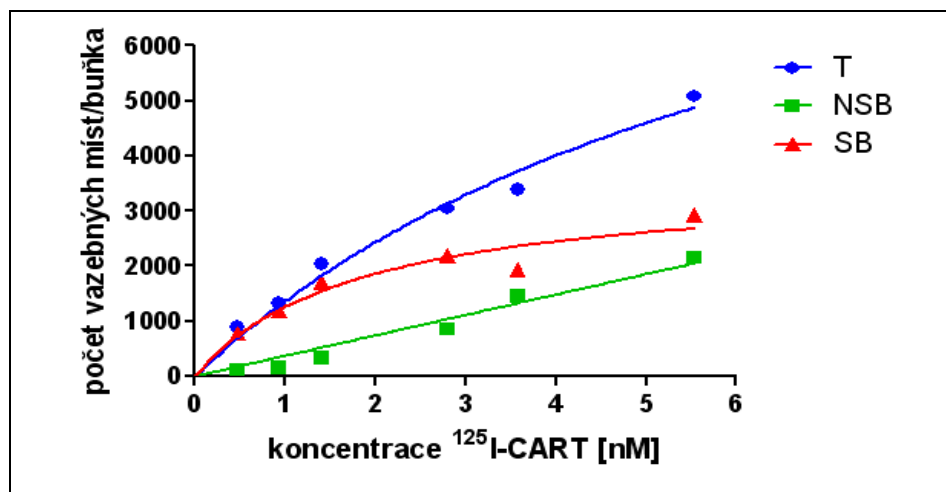
Saturační vazebné experimenty s  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) prokázaly, že se disociační konstanta  $K_d$  u nediferencovaných a diferencovaných buněk pomocí NGF pohybovala v nM oblasti, což je hodnota běžná pro komplex receptor-ligand. Maximální počet vazebných míst  $B_{\max}$  byl u nediferencovaných buněk řádově v tisících vazebných míst/buňku (obrázek 12A). Buňky diferencované NGF měly počet vazebných míst/buňka přibližně třikrát větší než nediferencované buňky (obrázek 12B). Hodnoty potvrzují naše předchozí experimenty (Maletínská et al., 2007). Buňky diferencované Dex vykazovaly vysokou hodnotu nespecifické vazby a tudíž nebylo možno stanovit počet vazebných míst (obrázek 12C). Hodnoty  $K_d$  a  $B_{\max}$  jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4. Saturační vazba  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) u buněčné linie PC12**

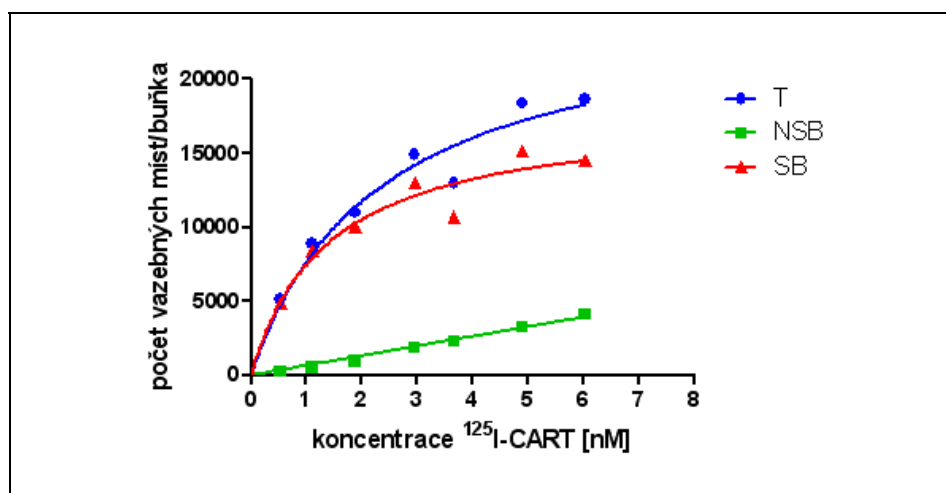
*Hodnota  $B_{\max}$  i  $K_d$  byla zjišťována při saturačních vazebných experimentech, probíhajících 30 minut při teplotě 37 °C.*

buňky PC12	$B_{\max}$ [vazebná místa/buňka]	$K_d$ [nM]
nediferencované	$3601 \pm 569$	$2,360 \pm 0,826$
diferencované NGF	$11248 \pm 2521$	$2,090 \pm 0,549$
diferencované Dex	nízká hodnota $B_{\max}$	

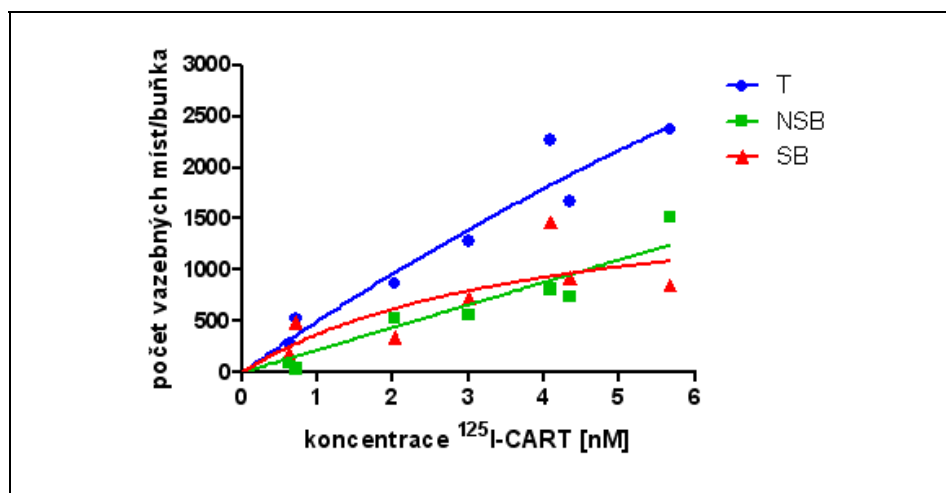
(A) Nediferencované  
buňky PC12



(B) Buňky PC12  
diferencované  
pomocí NGF



(C) Buňky PC12  
diferencované Dex



Obrázek 13. Saturační vazebné křivky peptidu CART(61-102) u buněčné linie PC12

Saturační vazebné experimenty probíhaly při teplotě 37 °C po dobu 30 minut, s rostoucím množstvím  $^{125}\text{I-CART}(61-102)$  v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická

vazba)  $10^{-5}M$  CART(61-102). Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové vazby a nespecifické vazby. Křivky byly vyneseny pomocí nelineární regrese.

### 5.3.2. Kompetitivní vazebné experimenty

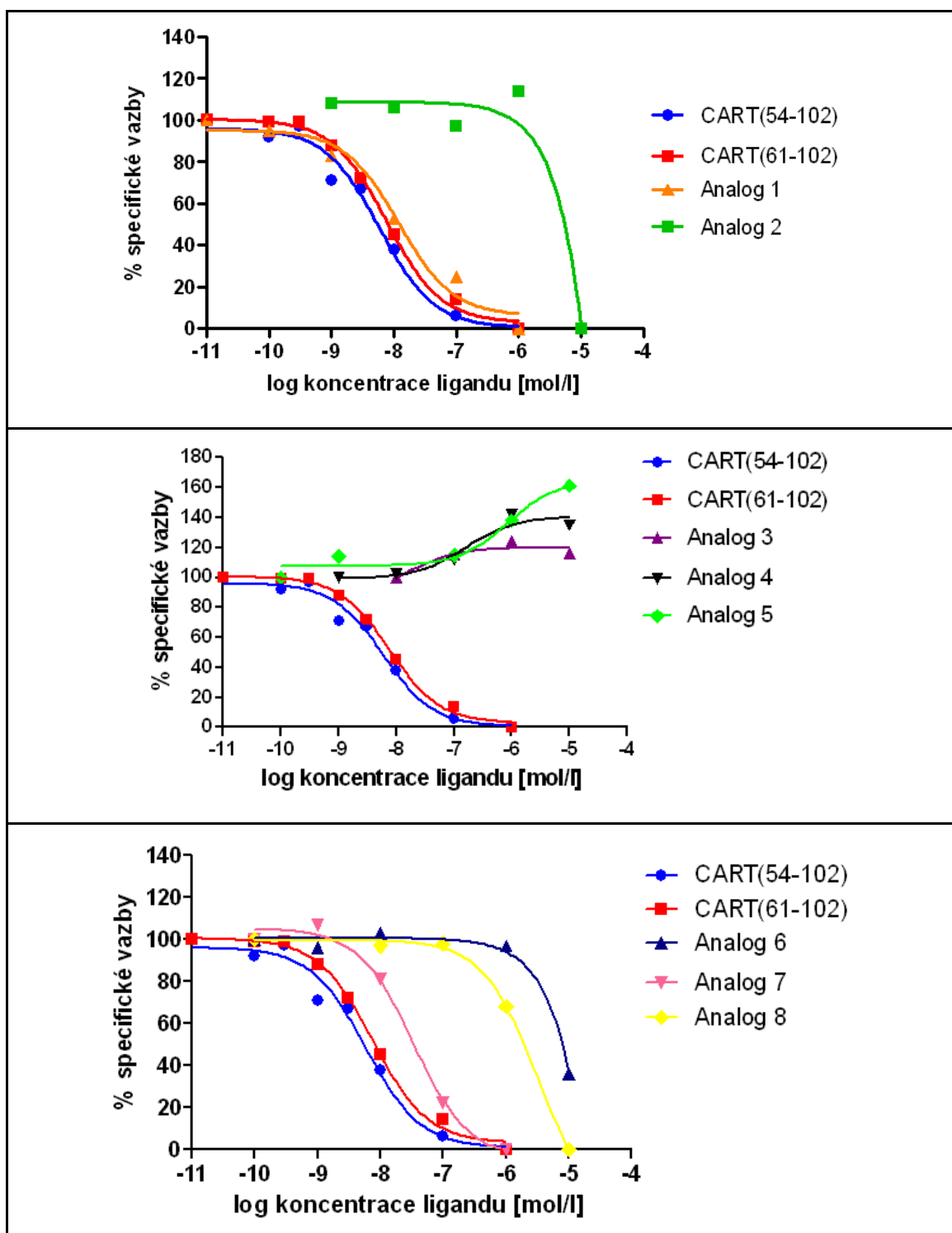
Kompetitivní vazebné pokusy na buňkách PC12 byly provedeny v optimalizovaných podmínkách při koncentraci radioligandu 0,1 nM (viz kapitola 4.2.4.3.). Hodnota  $K_d$  byla použita ze saturačních vazebných experimentů, u nediferencovaných buněk 2,36 nM, u buněk diferencovaných pomocí NGF 2,09 nM. Rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu  $K_i$  byla stanovena z rovnice Chenga a Prusoffa (Chang and Cheng, 1978). K vytěsnění radioaktivního  $^{125}I$ -CART(61-102) došlo účinkem CART(61-102) a CART(54-102) a rovněž analogy 1 a 7, ale nikoliv analogy 2 – 6 a 8 jak je znázorněno na obrázku 14 a v tabulce 5. CART(61-102), CART(54-102) a všechny analogy se k buňkám diferencovaným NGF vážaly s rovnovážnou disociační konstantou  $K_i$  srovnatelnou s nediferencovanými buňkami viz tabulka 5.

#### Tabulka 5. Výsledky kompetitivních vazebných experimentů pro buněčnou linii PC12

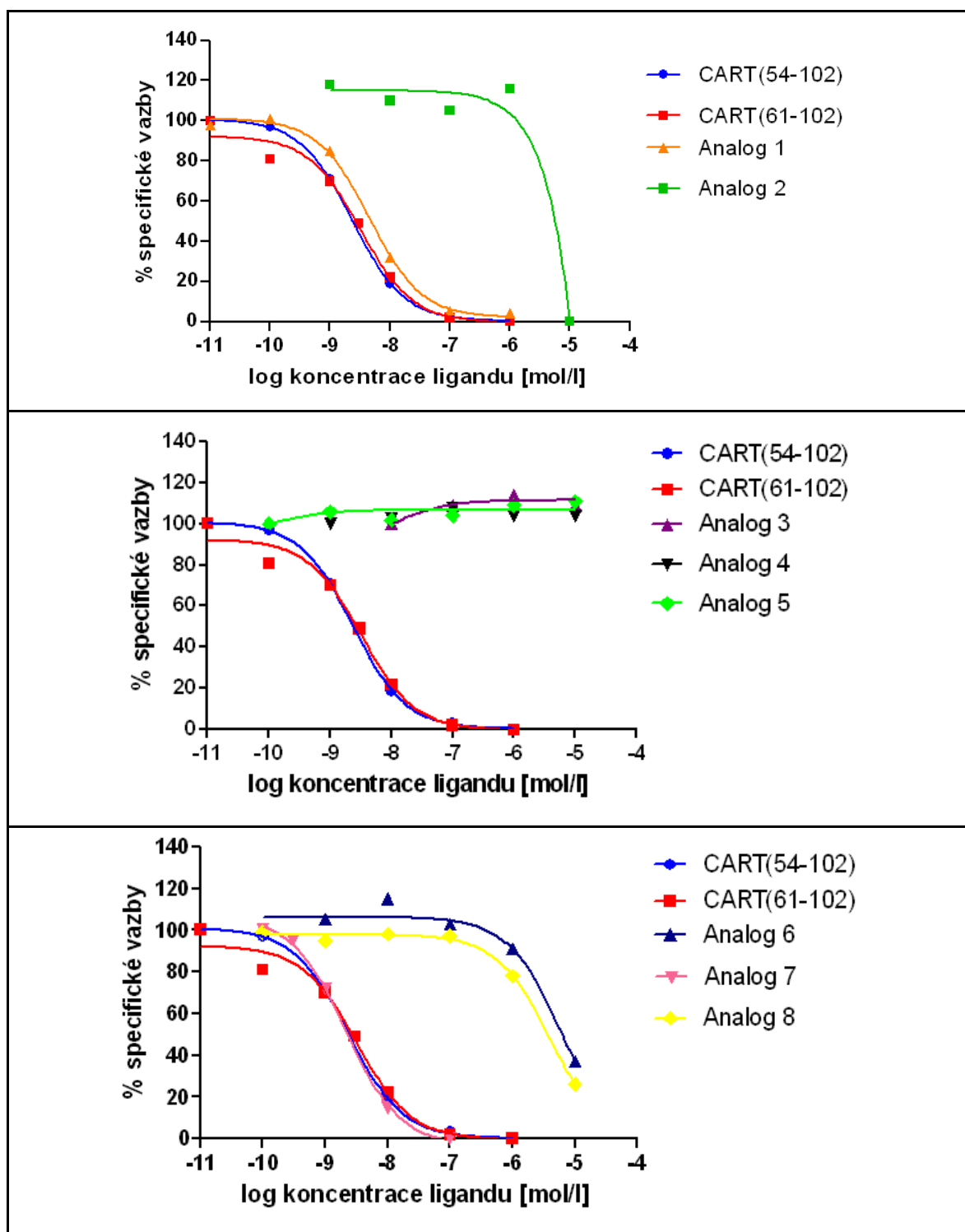
Průměr  $\pm$  S.E.M. ze tří až pěti samostatných experimentů. Kompetitivní vazebné pokusy probíhaly 30 min při 37 °C.  $K_i$  bylo vypočteno z rovnice Chenga-Prusoffova,  $K_d$  bylo u nediferencovaných buněk byla 2,36 nM, u buněk diferencovaných pomocí NGF byla 2,09 nM .

Analog	$K_i$ [M] nediferencované PC12	$K_i$ [M] diferencované PC12
<b>CART(54-102)</b>	$(3,97 \pm 1,91) \times 10^{-9}$	$(3,49 \pm 1,70) \times 10^{-9}$
<b>CART(61-102)</b>	$(7,78 \pm 3,38) \times 10^{-9}$	$(4,73 \pm 1,73) \times 10^{-9}$
<b>Analog 1</b>	$(3,98 \pm 2,10) \times 10^{-9}$	$(3,61 \pm 0,705) \times 10^{-9}$
<b>Analog 2</b>	$> 10^{-4}$	$> 10^{-4}$
<b>Analog 3</b>	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
<b>Analog 4</b>	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
<b>Analog 5</b>	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
<b>Analog 6</b>	$(2,43 \pm 3,37) \times 10^{-5}$	$(1,34 \pm 0,698) \times 10^{-5}$
<b>Analog 7</b>	$(3,95 \pm 1,77) \times 10^{-8}$	$(1,85 \pm 0,0328) \times 10^{-8}$
<b>Analog 8</b>	$(3,37 \pm 1,95) \times 10^{-6}$	$(4,24 \pm 1,60) \times 10^{-6}$

(A) Kompetitivní vazebné experimenty na nediferencovaných buňkách PC12



**(B) Kompetitivní vazebné experimenty na buňkách PC12 diferencovaných NGF**



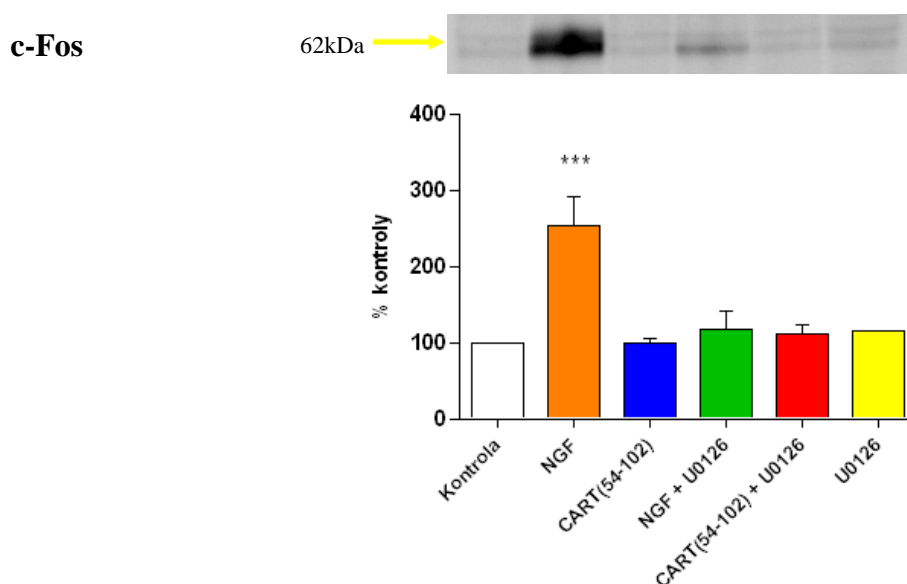
**Obrázek 14. Reprezentativní grafy kompetitivních vazebných křivek analogů peptidu CART u buněčné linie PC12**

(A) Nediferencované buňky (B) Buňky diferencované NGF. Inkubace 30 min při 37 °C. Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10<sup>-5</sup> M CART(54-102)). Reprezentativní křivky z alespoň tří experimentů v duplikátech.

## 5.4. Buněčná signalizace

Pro stanovení buněčné signalizace peptidu CART v buněčné linii PC12 byly buňky pěstovány za standardních podmínek na 6-jamkových či 24-jamkových destičkách (kapitola 4.2.3.). Buňky byly inkubovány s peptidem CART(54-102), NGF a kombinacemi těchto látek s inhibitory U0126, SP600125 či SB203580 10 či 60 minut při 37°C. U stanovení c-Fos, c-Jun, fosfo-JNK, fosfo-p38, fosfo-CREB a fosfo-MAPK/ERK1/2 fungoval NGF jako pozitivní kontrola, neboť v buňkách PC12 tyto dráhy stimuluje. Výsledky těchto experimentů jsou znázorněny na obrázku 15 – 20.

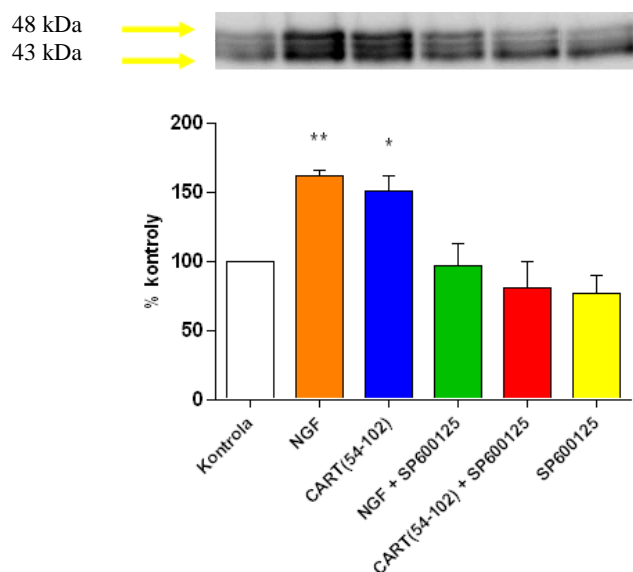
Po působení peptidu CART(54-102) došlo k významnému zvýšení fosforylace c-Jun (obrázek 16). K mírnému, avšak nevýznamnému zvýšení fosforylace došlo rovněž u signalizační dráhy fosfo-JNK, která předchází aktivaci c-Jun (obrázek 17). Peptid CART(54-102) nespouštěl signalizační dráhu u c-Fos, fosfo-CREB, fosfo-MAPK/ERK1/2 (obrázek 15, 19 a 20). Inhibitor SP600125 a rovněž kombinace NGF + SP600125 a CART(54-102) + SP600125 mírně, avšak nevýznamně snižovaly fosforylaci dráhy c-Jun a JNK (obrázek 16, 17). Peptid CART mírně, ale nevýznamně zvyšoval fosforylaci p38. Inhibitor SB203580 a kombinace NGF + SB203580 a CART(54-102) + SB203580 významně snižovaly fosforylaci p38 (obrázek 18). Pro proteiny JNK, p38, CREB, MAPK/ERK 1/2 bylo rovněž stanovena jejich celkové množství.



**Obrázek 15. Graf znázorňující účinek peptidu CART(54-102), NGF, inhibitoru U0126 a jejich kombinací na spouštění signalizace c-Fos v nediferencovaných buňkách PC12**

Buňky PC12 byly stimulovány peptidem CART(54-102), NGF, U0126 a jejich kombinací po dobu 60 min při 37°C. Data jsou průměr ± S.E.M. Bazální úroveň fosforylace byla definována jako 100 %. Signifikance je \*\*\* $P < 0,001$  oproti kontrole.

## c-Jun

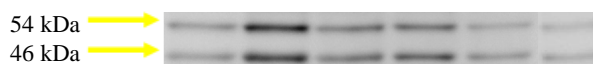


**Obrázek 16. Graf znázorňující účinek peptidu CART(54-102), NGF, inhibitoru SP600125**

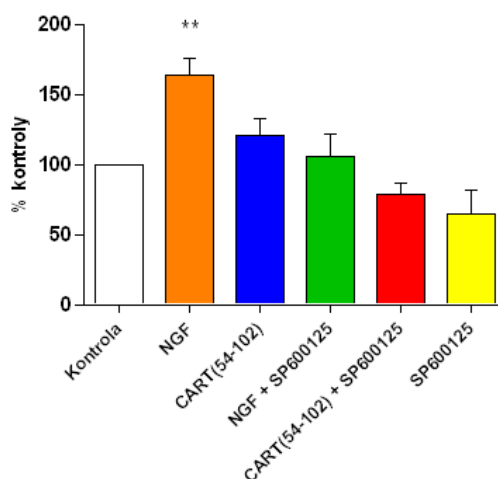
### **a jejich kombinací na spouštění signalizace c-Jun v nediferencovaných buňkách PC12**

Buňky PC12 byly stimulovány peptidem CART(54-102), NGF, SP600125 a jejich kombinací po dobu 60 min při 37°C. Data jsou průměr ± S.E.M. Bazální úroveň fosforylace byla definována jako 100 %. Signifikance je \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  oproti kontrole.

## Fosfo-JNK



## Celkový JNK



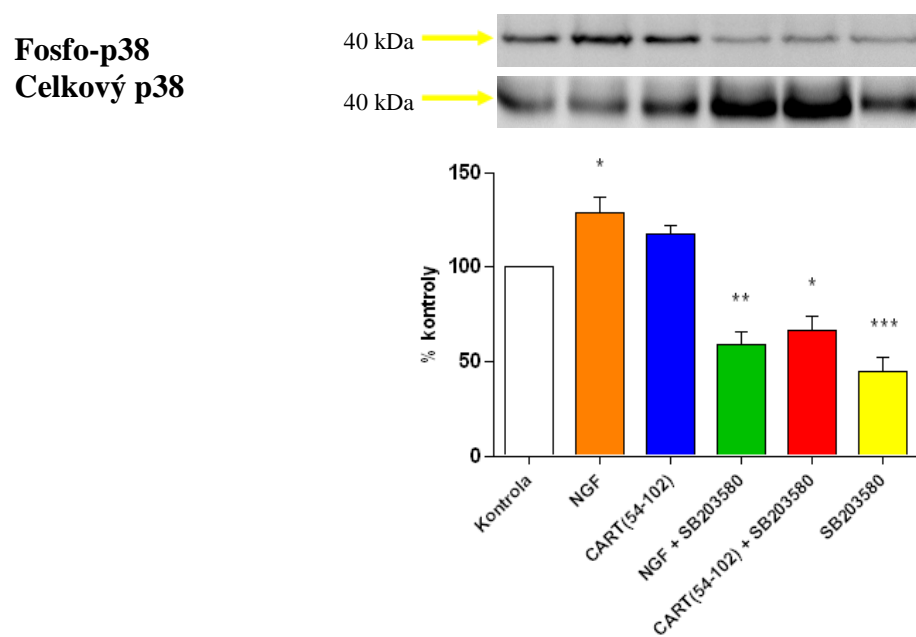
**Obrázek 17. Graf znázorňující účinek peptidu CART(54-102), NGF, inhibitoru SP600125**

### **a jejich kombinací na spouštění signalizace fosfo-JNK v nediferencovaných buňkách PC12**

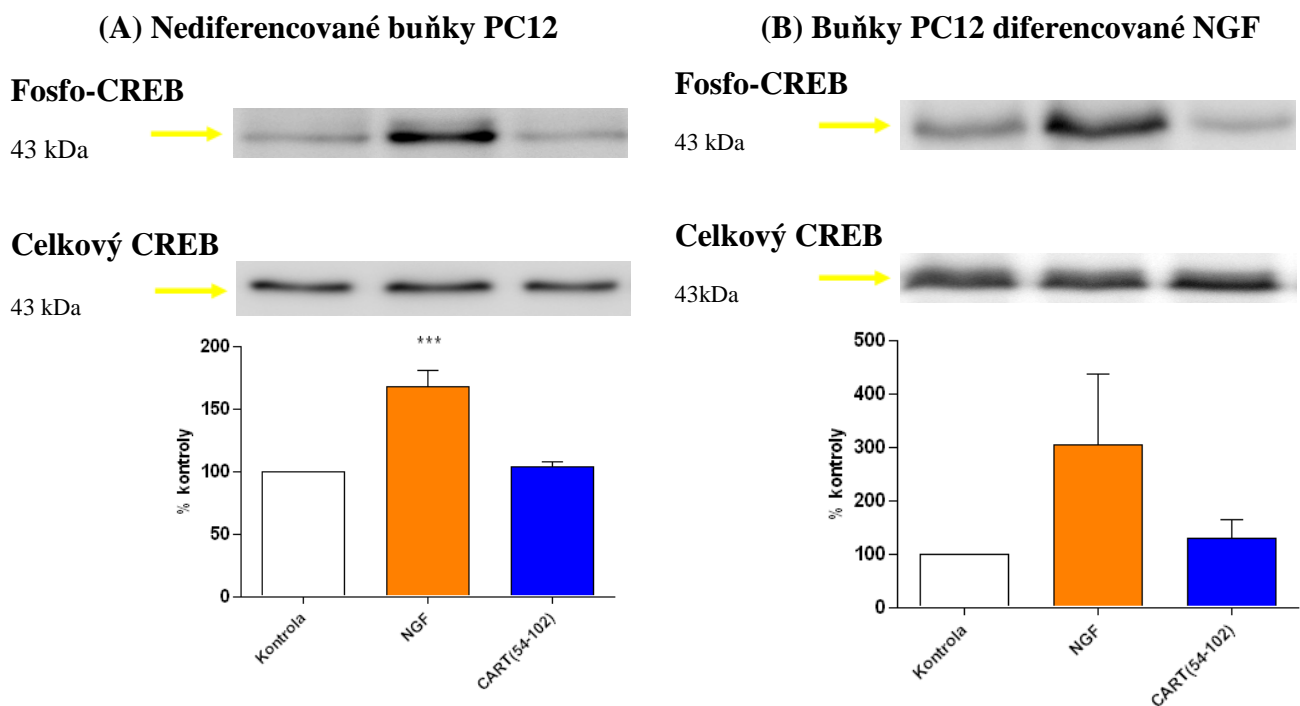
Buňky PC12 byly stimulovány peptidem CART(54-102), NGF, SP600125 a jejich kombinací po dobu 60 min při 37°C. Data jsou průměr ± S.E.M. Bazální úroveň fosforylace byla definována jako 100 %.



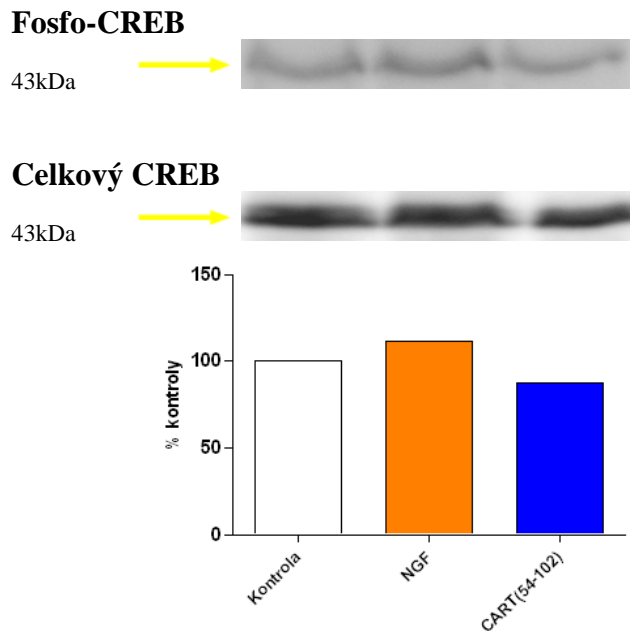
100 %. Signifikance je  $**P < 0,01$  oproti kontrole.



**Obrázek 18.** Graf znázorňující účinek peptidu CART(54-102), NGF, inhibitoru SB203580 a jejich kombinací na spouštění signální dráhy p38 v nediferencovaných buňkách PC12. Buňky PC12 byly stimulovány peptidem CART(54-102), NGF, SB203580 a jejich kombinací po dobu 10 min při 37°C. Data jsou průměr ± S.E.M. Bazální úroveň fosforylace byla definována jako 100 %. Signifikance je  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$  a  $***P < 0,001$  oproti kontrole.



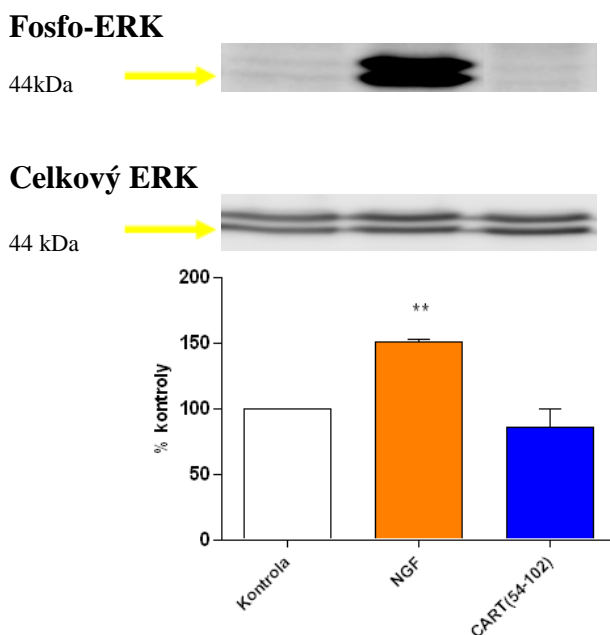
**(C) Buňky PC12 diferencované Dex**



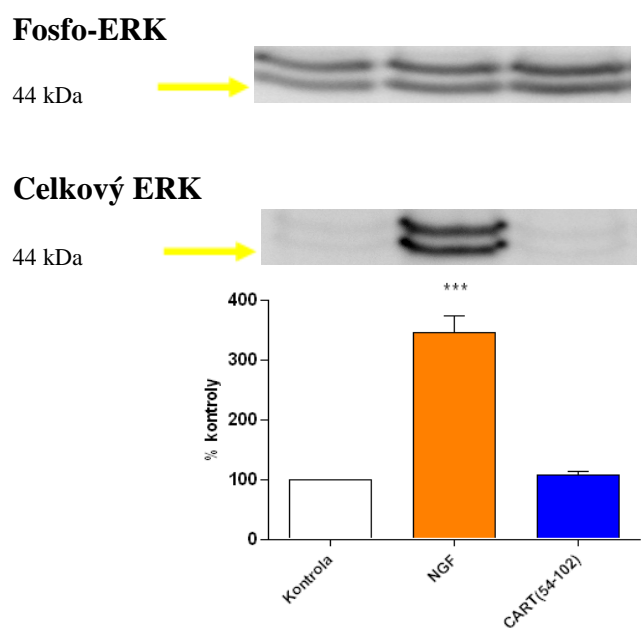
**Obrázek 19. Graf znázorňující účinek peptidu CART(54-102) a NGF na spouštění signální dráhy CREB u nediferencovaných buněk PC12 a u buněk diferencovaných NGF a Dex**

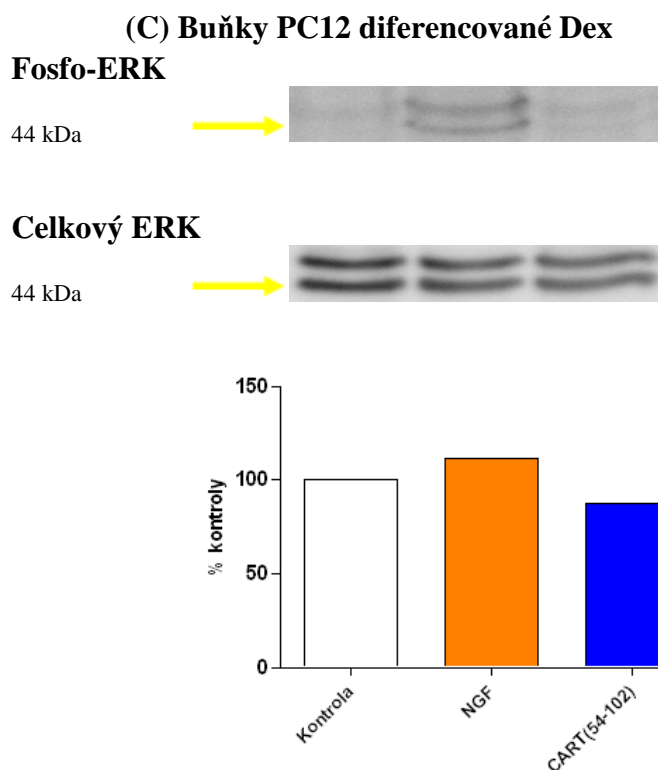
(A) Nediferencované buňky PC12, (B) Buňky PC12 diferencované NGF, (C) Buňky PC12 diferencované Dex. Buňky PC12 byly stimulovány peptidem CART(54-102) a NGF po dobu 10 min při 37°C. Data jsou průměr ± S.E.M. Bazální úroveň fosforylace byla definována jako 100 %. Signifikance je \*\*\* $P < 0,001$  oproti kontrole.

**(A) Nediferencované buňky PC12**



**(B) Buňky PC12 diferencované NGF**





**Obrázek 20. Graf znázorňující účinek peptidu CART a NGF na spouštění signální dráhy ERK u nediferencovaných buněk PC12 a u buněk diferencovaných NGF a Dex**

(A) Nediferencované buňky PC12, (B) Buňky PC12 diferencované NGF, (C) Buňky PC12 diferencované Dex. Buňky PC12 byly stimulovány peptidem CART(54-102) a NGF po dobu 10 min při 37°C. Data jsou průměr ± S.E.M. Bazální úroveň fosforylace byla definována jako 100 %. Signifikace je \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,00$  oproti kontrole.

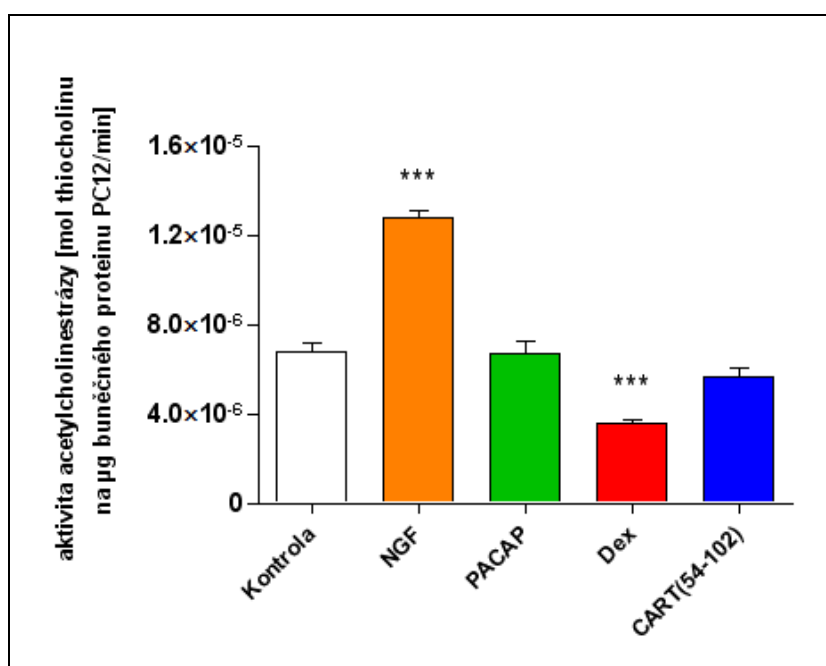
## 5.5. Vliv peptidu CART na aktivitu acetylcholinesterasy

Pro stanovení aktivity acetylcholinesterasy byla buněčná linie PC12 pěstována za standardních podmínek na 6-jamkových destičkách (kapitola 4.2.3.). Buňky byly inkubovány s NGF, PACAP, Dex a peptidem CART(54-102) po dobu 24 hodin za sterilních podmínek při 37 °C v inkubátoru. Aktivita acetylcholinesterasy byla u buněk PC12 významně zvýšená po působení NGF. K významnému snížení aktivity acetylcholinesterasy došlo po působení Dex. Peptidy CART(54-102) a PACAP neměly významný vliv na aktivitu acetylcholinesterasy (tabulka 6, obrázek 21).

**Tabulka 6. Aktivita acetylcholinesterasy**

*Aktivita acetylcholinesterasy u nediferencovaných buněk PC12 po 24-hodinové inkubaci s NGF, PACAP, Dex či s peptidem CART(54-102).*

Buňky PC 12	Aktivita acetylcholinesterasy [mol uvolněného thicholinu na $\mu\text{g}$ buněčného proteinu PC12/min]
Nediferencované buňky	$(6,76 \pm 0,53) \times 10^{-6}$
Nediferencované buňky s přidáním NGF	$(1,28 \pm 0,04) \times 10^{-5}$
Nediferencované buňky s přidáním PACAP	$(6,71 \pm 0,75) \times 10^{-6}$
Nediferencované buňky s přidáním Dex	$(3,60 \pm 0,23) \times 10^{-6}$
Nediferencované buňky s přidáním CART	$(5,96 \pm 0,50) \times 10^{-6}$

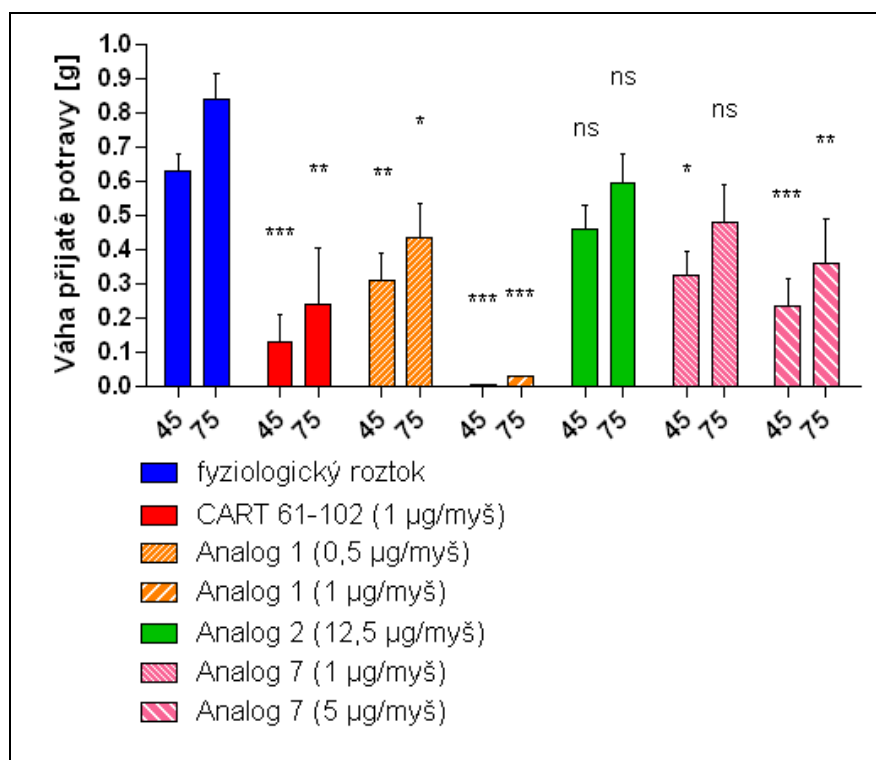


**Obrázek 21. Graf znázorňující aktivitu acetylcholinesterasy u nediferencovaných buněk PC12**

*Po inkubaci s NGF, PACAP, Dex a peptidem CART(54-102) po 24 hodin při podmínkách viz kapitola 4.2.8. Signifikance je  $***P < 0,001$  oproti kontrole.*

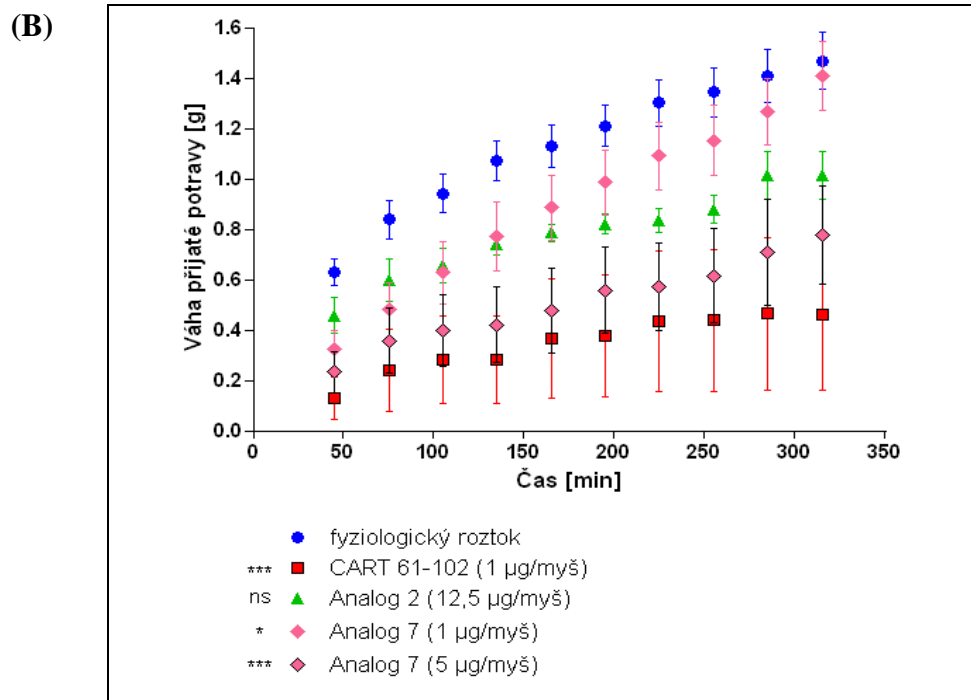
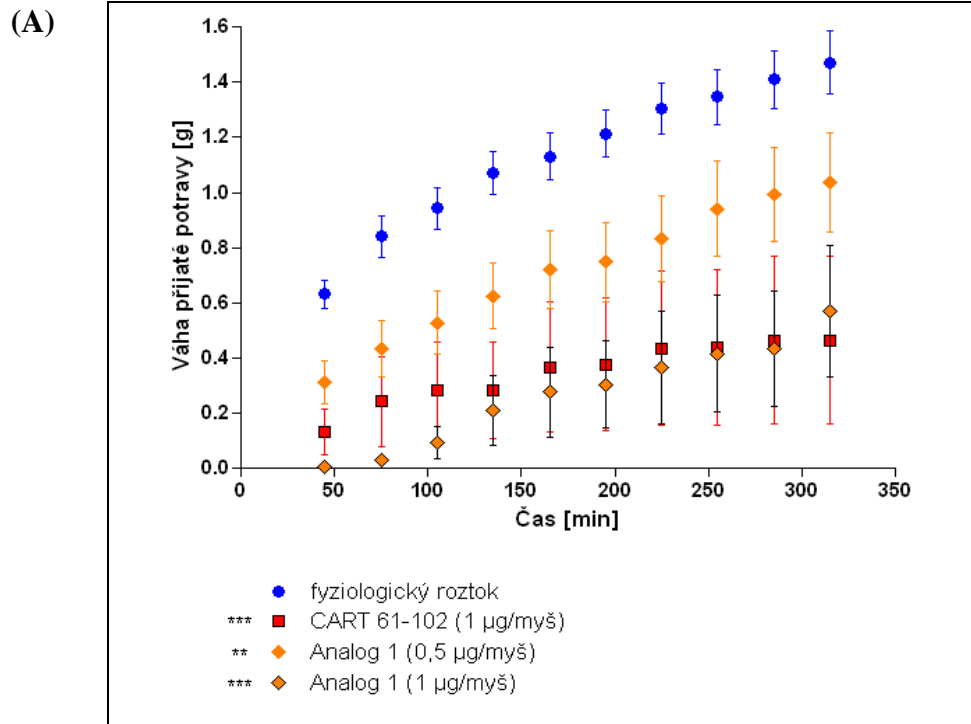
## 5.6. Stanovení příjmu potravy u myší

Byl sledován příjem potravy u samců kmene C57Bl/6 po podání peptidu CART(61–102) a jeho analogů do třetí mozkové komory (ICV) po 17 hod hladovění. Po ICV podání peptidu CART(61-102) (1 $\mu$ g/myš) došlo k významnému snížení příjmu potravy ve srovnání s účinkem po podání fyziologického roztoku (obrázek 22 a 23A, B). Po podání analogu 1 peptidu CART v dávce 0,5  $\mu$ g/myš došlo pouze k částečnému snížení příjmu potravy, vyšší dávka analogu 1 – 1  $\mu$ g/myš již měla významný účinek na příjem potravy ve srovnání s kontrolní skupinou myší (obrázek 22 a 23A). U analogu 2 (12,5  $\mu$ g/myš) nedošlo k významnému snížení potravy. Analog 7 (1 a 5  $\mu$ g/myš) příjem potravy u myší významně snížil (obrázek 22 a 23B) ve srovnání s účinkem u kontrolní skupiny myší.



**Obrázek 22. Příjem potravy po ICV podání látek u hladových kontrolních C57Bl/6 samců:**

*Příjem potravy po ICV podání látek. Peptid CART(61-102) (1 $\mu$ g/myš), analog 1 (0,5 a 1  $\mu$ g/myš), analog 2 (12,5  $\mu$ g/myš) a analog 7 (1 a 5  $\mu$ g/myš).  $n = 6 - 13$  myší na skupinu. Statistika byla provedena při 45 a 75 min. Signifikance je \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,001$  (látka vůči fyziologickému roztoku).*

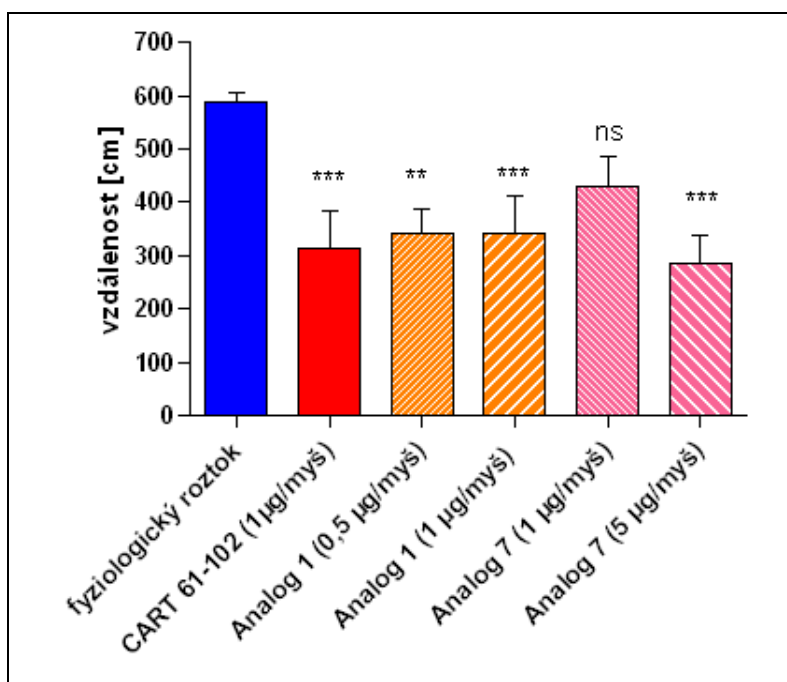


**Obrázek 23. Příjem potravy po ICV podání látek u hladových kontrolních C57Bl/6 samců:**  
 (A) Příjem potravy po ICV podání peptid CART(61-102) (1µg/myš), analog 1 (0,5 a 1 µg/myš),  
 (B) Příjem potravy po ICV podání peptid CART(61-102) (1µg/myš), analog 2 (12,5 µg/myš)  
 a analog 7 (1 a 5 µg/myš); n = 6 – 13 myši na skupinu. Statistika byla provedena pro čas 75 min.  
 Signifikance je \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,001$  (látka vůči fyziologickému roztoku).

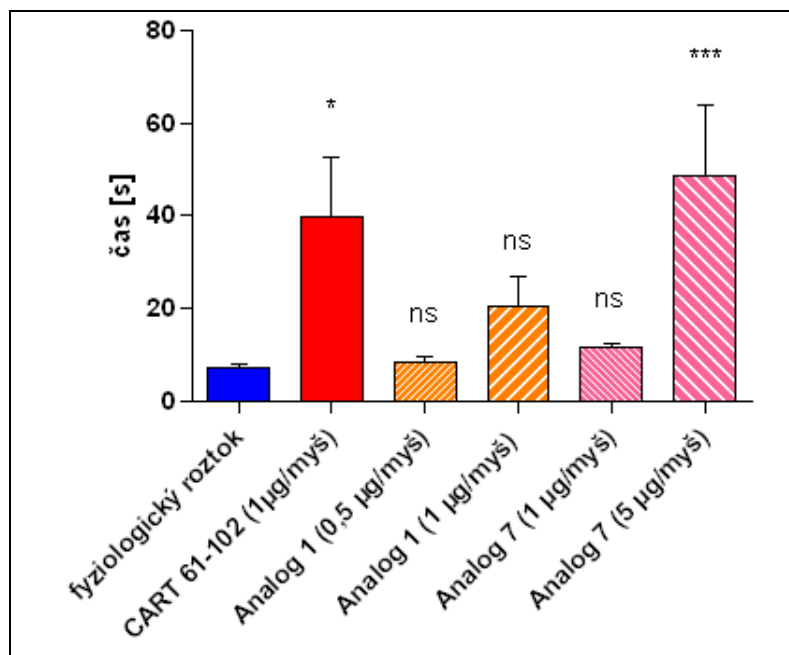
## 5.7. Test pohybu v otevřeném prostoru „open field“ a analgetické účinky pomocí testu „hot plate“

Behaviorální účinky peptidu CART(61-102) a analogu 1 a 7 byly měřeny pomocí testu pohybu v otevřeném poli „open field“ a analgetického testu na horké plotně „hot plate“. Obě metody měly zjistit, jaké další účinky související s příjmem potravy má peptid CART(61-102) a jeho analogy 1 a 7. Peptid CART(61-102) (1  $\mu\text{g}/\text{myš}$ ), analog 1 (0,5 a 1  $\mu\text{g}/\text{myš}$ ), analog 7 ve vyšší dávce 5  $\mu\text{g}/\text{myš}$ , významně snížil uběhnutou vzdálenost v otevřeném poli v porovnání s kontrolní skupinou, které byl podán ICV fyziologický roztok (obrázek 24A). Analgetické účinky látek jsme sledovali měřením doby po jaké si sledované myši začnou lízat přední končetiny (obrázek 24B) a po jaké vyskočí v reakci na horkou plotnu (obrázek 24C) ve srovnání s kontrolní skupinou. Stanovení času lízání předních končetin bylo zatíženo velkou odchylkou ale CART(61-102) i analog 7 v dávce 5  $\mu\text{g}/\text{myš}$  měl statisticky významné účinky. Testu doby skoku na horké plotně byl zatížen menší odchylkou (obrázek 24B, C). Analog 7 (1 a 5  $\mu\text{g}/\text{myš}$ ) měl podobné účinky jako výše uvedený analog 1.

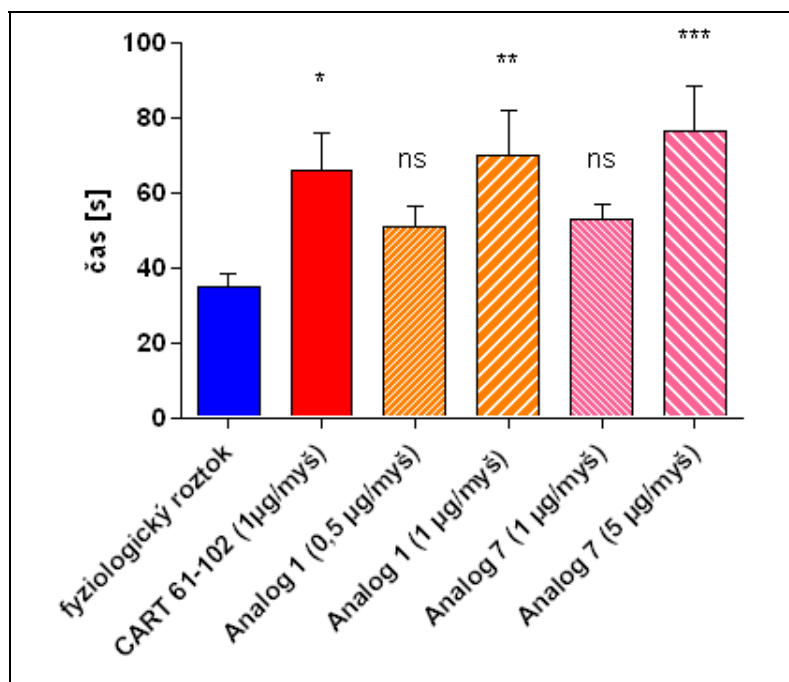
(A) Test pohybu  
v otevřeném poli



**(B) Test analgesie na horké plotně – lízání předních končetin**



**(C) Test analgesie na horké plotně - skok**



**Obrázek 24. Behaviorální účinky u kontrolních myši**

Obrázek (A) test otevřeného pole „open field“, celková vzdálenost, kterou myši urazí za 10 min. Obrázek (B) analgetický test na horké plotně (53 °C) „hot plate“ – doba, po které si myši začnou lízat přední končetiny. Obrázek (C) analgetický test na horké plotně – doba, po které myši vyskočí v reakci na horkou plotnu. Behaviorální účinky byly měřeny po ICV podání peptidu CART(61-102) (1 µg/myš), analogu 1 (0,5 a 1 µg/myš) a analogu 7 (1 a 5 µg/myš). Signifikace je \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  oproti fyziologickému roztoku.



## 6. DISKUZE

Ačkoliv byl peptid CART objeven již před 15 lety, jeho receptor, stejně jako přesná funkce v organismu nejsou dosud známy. V naší skupině publikovaná specifická vazba peptidů CART k feochromocytomálním buňkám PC12 (Maletínská et al., 2007) umožnila následné testování fragmentů peptidu CART (Maixnerová et al., 2007), které vedlo ke zjištění, že struktura peptidu CART stabilizovaná disulfidovými můstky je absolutně nezbytná pro zachování biologické aktivity.

Model feochromocytomálních buněk PC12 a buněk diferencovaných v neurony pomocí NGF nám dále umožňuje jak testovat další analogy a zkoumat vztah mezi strukturou a aktivitou analogů CART, tak zkoumat možnou signalizaci peptidu CART do buňky a tak přispět k charakterizaci vazebného místa a možných účinků peptidu CART.

### 6.1. Vazba peptidu CART a jeho analogů k buněčné linii PC12

Naše předchozí studie ukázala, že syntetizované fragmenty peptidu CART odpovídající úsekům mezi jednotlivými cysteiny, nevykazují v testovaném rozmezí koncentrací významnou afinitu k vazebným místům na buňkách PC12.

V této studii jsme tedy chtěli prověřit důležitost jednotlivých dvojic cysteinů tvořících příslušné disulfidové můstky. Pomocí tzv. Ala-scanu byly dvojice cysteinů postupně nahrazovány alaniny. Ačkoliv přirozené peptidy CART(61-102) a CART(54-102) se obvykle získávají rekombinantně (Thim et al., 1998), naše analogy byly syntetizovány metodou na pevné fázi, což umožnilo použít i nekódové aminokyseliny, které zvyšují stabilitu peptidu, protože jsou odolné proti proteolytické degradaci.

Peptid CART a jeho analogy byly testovány v kompetitivních vazebných experimentech u buněčné linie PC12, neboť tyto vazebné studie jsou vhodné pro porovnání afinity a biologické aktivity různých strukturních analogů (Maletínská et al., 2007). Byla studována afinita peptidu CART(54-102), CART(61-102) a analogů, které se lišily v počtu a pozicích disulfidových můstků. Nejprve byl syntetizován analog 1 (viz tabulka 2) strukturně podobný peptidu CART(61-102), avšak v pozici 67 byl methionin nahrazen norleucinem pro zvýšení stability peptidu. Tato záměna neovlivnila schopnost analogu 1 vázat se k buňkám PC12 se stejnou afinitou jako CART(54-102) (tabulka 5). U analogu 2, CART(74-102), obsahujícího 2 disulfidové můstky v pozici 74-94 a 88-101 nedošlo k vytěsnění vazby  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) v testovaném rozmezí koncentrací. To ukazuje,

že je potřeba pro uchování biologické aktivity nejen disulfidové můstky, ale i N-koncovou část molekuly peptidu CART.

Analogy 3, 4 a 5, které obsahují vždy jeden disulfidový můstek (tabulka 2) vykazovaly velmi nízkou afinitu k buňkám PC12, což ukazuje na skutečnost, že cysteinové můstky hrají zásadní roli při biologické aktivitě peptidu (Maixnerová et al., 2007).

Analogy 6, 7 a 8 obsahovaly dva disulfidové můstky v různých pozicích, zbylé dva cysteiny byly nahrazeny alaninem (tabulka 2). Analog 6 obsahoval S-S můstek v pozici 68-86 a 88-101, alaniny v pozici 74-94. Tento analog měl nízkou afinitu k buňkám PC12. Analog 7 s disulfidovými můstky v pozici 74-94 a 88-101 a alaninem v pozici 68-86 vykazoval vysokou afinitu k buňkám PC12 a byl schopen vytěsnit z vazby  $^{125}\text{I-CART}(61-102)$  s  $K_i 10^{-8}$  M (tabulka 5), což je  $K_i$  jen o 1 řád vyšší než u CART(61-102). U analogu 8 došlo k nahrazení cysteinů za alanin v pozici 88-101, k tvorbě disulfidových můstků došlo v pozici 68-86 a 74-94. Analog 8 vytěsňoval  $^{125}\text{I-CART}(61-102)$  s  $K_i 10^{-6}$  M (tabulka 5). Výše zmíněná fakta ukazují na to, že pro zachování vysoké afinity je potřeba zejména disulfidové vazby v pozici 74-94 a 88-101, nikoliv 68-86. V porovnání analogu 7 s analogem 2 (oba tyto analogy měly disulfidové vazby 74-94 a 88-101) můžeme konstatovat, že kromě těchto disulfidových vazeb je ještě potřeba i N-koncové sekvence k vytěsnění  $^{125}\text{I-CART}(61-102)$  z vazby.

Analog 7, jehož syntéza je mnohem jednodušší než syntéza kompletního peptidu (2 disulfidové můstky versus 3 disulfidové můstky), bude použit jako základní analog pro naše budoucí strukturně-aktivitní studie.

## **6.2. Anorektický, sedativní a analgetický účinek peptidu CART a jeho analogů u myši**

Většina prací popisujících anorektické účinky peptidu CART, používá přirozené analogy CART(61-102) a (55-102), jejichž vliv na snížení příjmu potravy je srovnatelný (Bannon et al., 2001; Lambert et al., 1998; Kristensen et al., 1998). Naše předchozí práce která srovnává příjem potravy CART(61-102) a fragmentů CART také potvrdila signifikantní účinek CART(61-102) na příjem potravy u myši v dávkách 0,1 a 0,2 nmol/myš, takže jsme ji zvolili i v naší studii.

Peptidy, které ukázaly významnou afinitu k buňkám PC12, byly testovány z hlediska vlivu na příjem potravy a možným sedativním a analgetickým účinkům. Do testování *in vivo* byl použit peptid CART(61-102), analog 1, 2 a 7. Peptid CART(61-102) v souladu s publikovanou prací

(Bannon et al., 2001) a našimi předchozími pracemi (Maletínská et al., 2008; Zelezná et al., 2009) významně snižoval příjem potravy a vykazoval výrazné sedativní účinky při testování v otevřením poli. Rovněž měl částečně analgetický účinek (Maletínská et al., 2007).

Analog 1 (0,5 a 1 µg/myš, tj. 0,1 a 0,2 nmol/myš) významně snižoval po ICV podání příjem potravy u hladových myší v obou koncentracích. Významné sedativní a analgetické účinky vykazoval až při vyšší koncentraci. V testu příjmu potravy měl analog 1 prodloužený účinek ve srovnání s účinky CART(61-102), což je způsobeno vyšší odolností proti degradaci enzymy (obsahuje Nle<sup>67</sup>). Analog 2 byl použit ve vyšší koncentraci (12,5 µg/myš tj. 4nmol/myš), podobně jako v naší předchozí studii s fragmenty (Maixnerová et al., 2007), neboť vykazoval nízkou afinitu k buňkám PC12. Příjem potravy nebyl u tohoto analogu signifikantně snížen. Analog 7 (1 a 5 µg/myš tj. 0,2 a 1 nmol/myš) způsobil výrazné snížení příjmu potravy po ICV podání, měl významné sedativní a analgetické účinky.

Všechny analogy, které snižovaly signifikantně příjem potravy (analogy 1 a 7), měly účinek závislý na dávce. Analog 7 byl použit ve vyšších dávkách, jak odpovídalo jeho o řád nižší afinitě k buňkám PC12. Účinky tohoto analogy jsou srovnatelné s účinky přirozených peptidů CART.

### 6.3. Aktivita acetylcholinesterasy

U buněčné linie PC12 dochází po působení NGF k diferenciaci buněk na sympatoadrenergní neurony. Tyto diferencované buňky jsou schopny uvolňovat dopamin a jsou citlivé na acetylcholin. Acetylcholinesterasa degraduje acetylcholin a tak ukončuje jeho neurotransmisi. Po 24 hodinové inkubaci s NGF došlo ke zvýšení aktivity acetylcholinesterasy v PC12, což je v souladu s dříve publikovanou prací (Greene and Tischler, 1976). Po 24 hodinovém působení PACAP, který rovněž způsobuje diferenciaci buněk PC12 v neurální fenotyp, nedošlo ke zvýšení aktivity acetylcholinesterasy. To naznačuje, že mechanismus diferenciaci v nervovou síť nebo čas pro tuto diferenciaci nejsou stejné jako u diferenciaci pomocí NGF (Vaudry et al., 2002).

Naopak po 24 hodinovém působení dexametasonu můžeme konstatovat snížení aktivity acetylcholinesterasy, neboť tyto buňky se diferencují na fenotyp normálních chromafinních buněk, což je v souladu s publikací (Adler et al., 2006).

Co se týče 24 hodinového působení peptidu CART, který nedokáže diferencovat buňky PC12 ani za několik dní v neurální či chromafinní fenotyp (naše nepublikované výsledky) a v souladu s tím ani nemá vliv na aktivitu acetylcholinesterasy.

## 6.4. Signalizace peptidu CART v buňkách PC12

Navzdory velké snaze nebyl ještě pro peptid CART identifikován receptor (Vicentic et al., 2006), byla ale navržena signalizační dráha, která vycházela ze signalizace peptidu CART sledované v různých typech buněk: v primárních hipokampálních neuronech (Yermolaieva et al., 2001), v hypofyzární linii AtT20 (Lakatos et al., 2005) a v neuronech hypothalamického PVN. V této práci jsme ověřovali dvě navržené signální dráhy, které měl peptid CART stimulovat – fosforylaci MAPK/ERK 1/2 a CREB v buňkách PC12, u kterých jsme našli specifickou vazbu peptidu CART. Pomocí metody Western blot byla dále stanovena aktivace c-Fos, c-Jun a fosforylace JNK a p38. Po působení CART(54-102) u buněčné linie PC12 nedošlo ke zvýšení signalizace u c-Fos. Pouze u c-Jun došlo k jeho významné aktivaci po působení peptidu CART(54-102), což ukazuje na možnost, že peptid CART může signalizovat touto dráhou. Nicméně nepodařilo se prokázat významně zvýšenou fosforylaci u JNK pomocí peptidu CART, který obvykle předchází aktivaci c-Jun.

U buněk PC12 jsme nepozorovali zvýšenou fosforylaci MAPK/ERK1/2 a CREB po působení CART(54-102), oproti práci Lin a kol. (Lin et al., 2011), kteří našli zvýšenou fosforylaci ERK po působení CART(55-102) v buňkách PC12, ale rovněž se nám nepodařilo prokázat aktivaci CREB.

Aktivace dráhy c-Jun naznačuje, že receptor pro peptid CART je spíše typu receptoru pro růstové hormony nebo receptoru pro cytokiny. To bude předmětem dalšího výzkumu.

## 7. ZÁVĚR

- V kompetičních vazebných experimentech došlo k vytěsnění radioaktivního  $^{125}\text{I}$ -CART(61-102) pomocí CART(61-102) a CART(54-102) a rovněž analogu 1, u kterého byl methionin v pozici 67 vyměněn za norleucin, a analogu 7 obsahujícího dva disulfidové můstky v pozici 74-94 a 88-101.
- Peptid CART(61-102) a analogy 1 a 7 v testech *in vivo* významně snižovaly příjem potravy. V testování v otevřeném poli měly výrazný sedativní účinek a v testu na horké plotně došlo pouze k částečné analgesii.
- Po testování možných signalizačních drah peptidu CART v buňkách PC12 došlo k významnému zvýšení signalizace c-Jun.

Naše studie je příspěvkem jak k objasnění vztahu mezi strukturou a aktivitou peptidu CART, tak k osvětlení možné signalizace tohoto peptidu do buněk PC12. Tento buněčný model obsahující vazebná místa pro peptid CART nám umožňuje zkoumat účinky analogů peptidu CART a ty neúčinnější analogy dále testovat *in vivo*. Nicméně úloha peptidu CART v organismu stále není příliš objasněna a receptor je neznámý.

S využitím našich nových analogů budeme tedy pokračovat v hledání možných signalizačních drah jak *in vitro*, tak *in vivo* u myší, kde plánujeme imunohistochemické studie na detekci proteinů jako c-Fos a c-Jun po centrálním podání peptidu CART v oblastech mozku souvisejících s příjmem potravy. Naše studie by měly přispět k hledání mechanismů účinku peptidu CART a tím i objasnění regulace příjmu potravy.

## 8. LITERATURA

- Adan RA, Tiesjema B, Hillebrand JJ, la Fleur SE, Kas MJ and de Krom M (2006) The MC4 receptor and control of appetite. *Br J Pharmacol* 149:815-827.
- Adan RA, Vanderschuren LJ and la Fleur SE (2008) Anti-obesity drugs and neural circuits of feeding. *Trends Pharmacol Sci* 29:208-217.
- Adler EM, Gough NR and Blundon JA (2006) Differentiation of PC12 cells. *Sci STKE* 2006:tr9.
- Atkinson TJ (2008) Central and peripheral neuroendocrine peptides and signalling in appetite regulation: considerations for obesity pharmacotherapy. *Obes Rev* 9:108-120.
- Bannon AW, Seda J, Carmouche M, Francis JM, Jarosinski MA and Douglass J (2001) Multiple behavioral effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptides in mice: CART 42-89 and CART 49-89 differ in potency and activity. *J Pharmacol Exp Ther* 299:1021-1026.
- Bouret S, Draper S and Simerly R (2004) Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci* 24:2797-2805.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bray GA and Tartaglia LA (2000) Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature* 404:672-677.
- Bronský J and Průša R (2008) Biochemické markery v regulaci nutričního stavu. *Klinická biochemie a metabolismus* 16 (37):8.
- Chang C and Cheng Y (1978) Ribonucleotide reductase isolated from human cells. Heterogeneity among the sources. *Biochem Pharmacol* 27:2297-2300.
- Chaudhri O, Small C and Bloom S (2006) Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1187-1209.
- Coll AP, Farooqi IS and O'Rahilly S (2007) The hormonal control of food intake. *Cell* 129:251-262.
- Douglass J, McKinzie AA and Couceyro P (1995) PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 15:2471-2481.
- Fraker PJ and Speck JC (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 80:849-857.

- Greene LA and Rukenstein A (1981) Regulation of acetylcholinesterase activity by nerve growth factor. Role of transcription and dissociation from effects on proliferation and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 256:6363-6367.
- Greene LA and Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424-2428.
- Haluzík M (2002) *Poruchy výživy a leptin*. GRADA Publishing, Praha.
- Haluzík M (2005) Chemie obezity. *Vesmír* 84:4.
- Heal DJ, Gosden J and Smith SL (2012) What is the prognosis for new centrally-acting anti-obesity drugs? *Neuropharmacology*.
- Internetový odkaz 1; WHO (2011) Obesity and overweight: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>; cit. 27. 4. 2012
- Internetový odkaz 2; Obezita.cz, Příčiny vzniku obezity: <http://www.obezita.cz/obezita/priciny-obezity/>; cit. 27. 4. 2012
- Internetový odkaz 3; Farmaceutika (2008): <http://www.farmaceutika.info/adipex-retard>; cit. 27. 4. 2012
- Internetový odkaz 4; Státní ústav pro kontrolu léčiv (2010): <http://www.sukl.cz/evropska-lekova-agentura-doporucuje-pozastaveni>; cit. 27. 4. 2012
- Internetový odkaz 5; Státní ústav pro kontrolu léčiv (2008): <http://www.sukl.cz/pozastaveni-registrace-acomplia?highlightWords=rimonabant>; cit. 27. 4. 2012
- Jones D and Kuhar M (2008) CART receptor binding in primary cell cultures of the rat nucleus accumbens. *Synapse* 62:122-127.
- Keller PA, Compan V, Bockaert J, Giacobino JP, Charnay Y, Bouras C and Assimacopoulos-Jeannet F (2006) Characterization and localization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) binding sites. *Peptides* 27:1328-1334.
- Kopelman PG (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635-643.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ and Hastrup S (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72-76.
- Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall RA and Kuhar MJ (2005) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci Lett* 384:198-202.

- Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y and Kuhar MJ (1998) CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29:293-298.
- Lin Y, Hall RA and Kuhar MJ (2011) CART peptide stimulation of G protein-mediated signaling in differentiated PC12 cells: identification of PACAP 6-38 as a CART receptor antagonist. *Neuropeptides* 45:351-358.
- Luquet S and Magnan C (2009) The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis. *Front Biosci (Schol Ed)* 1:448-465.
- Maixnerová J, Hlaváček J, Blokesová D, Kowalczyk W, Elbert T, Sanda M, Blechová M, Zelezná B, Slaninová J and Maletínská L (2007) Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. *Peptides* 28:1945-1953.
- Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Pirník Z, Kiss A and Zelezná B (2008) Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci* 9:101.
- Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Sloncová E, Elbert T, Slaninová J and Zelezná B (2007) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol* 559:109-114.
- Matyšková R, Maixnerová J and Maletínská L (2008) Epidemie obezity a regulace příjmu potravy. *Vesmír* 87:4.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS and Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-295.
- Motulsky H and Neubig R (2002) Analyzing radioligand binding data. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 7:Unit 7.5.
- Murphy KG (2005) Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4:95-111.
- Rogge G, Jones D, Hubert GW, Lin Y and Kuhar MJ (2008) CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci* 9:747-758.
- Sarkar S, Wittmann G, Fekete C and Lechan RM (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* 999:181-192.
- Schwartz MW and Morton GJ (2002) Obesity: keeping hunger at bay. *Nature* 418:595-597.



- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ and Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Schwartz PJ, Blundon JA and Adler EM (2007) A biochemical assay for acetylcholinesterase activity in PC12 cells. *Sci STKE* 2007:tr2.
- Spiess J, Villarreal J and Vale W (1981) Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. *Biochemistry* 20:1982-1988.
- Strader AD and Woods SC (2005) Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 128:175-191.
- Thim L, Nielsen PF, Judge ME, Andersen AS, Diers I, Egel-Mitani M and Hastrup S (1998) Purification and characterisation of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast. *FEBS Lett* 428:263-268.
- Tsigos C, Hainer V, Basdevant A, Finer N, Fried M, Mathus-Vliegen E, Micic D, Maislos M, Roman G, Schutz Y, Toplak H, Zahorska-Markiewicz B and Obesity OMTFotEAftSo (2008) Management of obesity in adults: European clinical practice guidelines. *Obes Facts* 1:106-116.
- Vaudry D, Stork PJ, Lazarovici P and Eiden LE (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 296:1648-1649.
- Vicentic A, Lakatos A and Jones D (2006) The CART receptors: background and recent advances. *Peptides* 27:1934-1937.
- Vicentic A, Lakatos A and Kuhar MJ (2005) CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells. *Eur J Pharmacol* 528:188-189.
- Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen PJ and Kristensen P (1999) Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res* 818:499-509.
- Yermolaieva O, Chen J, Couceyro PR and Hoshi T (2001) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci* 21:7474-7480.
- Zelezná B, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Blokesová D and Maletínská L (2009) Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. *Physiol Res* 58:717-723.
- Zhang M, Han L and Xu Y (2011) Roles of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*.