

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie

Studijní obor: YBICH



Mgr. Veronika Pražienková

**Nové analogy anorexigenních neuropeptidů ovlivňujících příjem
potravy**

New analogs of anorexigenic neuropeptides involved in food intake
regulation

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Praha, 2016

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 01. 02. 2016

Veronika Pražienková

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM

PRAŽIENKOVÁ, Veronika. *Nové analogy anorexigenních neuropeptidů ovlivňujících příjem potravy. [New analogs of anorexigenic neuropeptides involved in food intake regulation]*. Praha, 2016. 134 stran, 4 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i. . Vedoucí závěrečné práce RNDr. Maletínská Lenka, CSc.

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Maletínské, CSc., za neutuchající optimismus a podporu při mém studiu a za vytvoření přátelského prostředí. Také za cenné rady a podnětné nápady při provádění experimentů. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Blance Železné, CSc. za korekturu mé disertační práce a praktické rady. Děkuji rovněž RNDr. Jaroslavu Kunešovi, DrSc. za revizi a cenné nápady při psaní mé disertační práce. Také chci poděkovat mému konzultantovi Prof. MUDr. Martinu Haluzíkovi, DrSc. za odborné rady.

Mé velké díky patří celé skupině Lenky Maletínské, za vytvoření kreativního a přátelského prostředí. Děkuji za pomoc při mých experimentech Anežce Tiché, Andree Popelové, Martině Holubové a dalším.

Děkuji laboratoři radioisotopů, Doc. RNDr. Tomáši Elbertovi, CSc. a Aleši Markovi, PhD. za jodace peptidů a také za ochotu a vstřícnost. Ing. Miroslavě Blechové děkuji za syntézu peptidů. Velké díky patří PharmDr. Zdenkovi Pirnikovi, PhD. za provádění imunohistochemie.

Děkuji RNDr. Zdeně Lacinové a Miloslavě Čechové ze 3. interní kliniky 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice za stanovení exprese mRNA.

Dále děkuji Lence Žákové za rady při provádění *in vitro* experimentů a za vytvoření přátelského prostředí. Také bych chtěla poděkovat Hedvice Vysušilové za skvělou práci se zvířaty.

V neposlední řadě chci poděkovat svému muži za vřelá slova podpory při neúspěších, za nekonečnou motivaci a rady, za pomoc během mých studií, kterými mě celou dobu provází. Velké díky patří také mé rodině, bez které bych teď nebyla tam, kde jsem.

Disertační práce a s ní související publikace vznikly na Ústavu organické chemie a biochemie s finanční podporou Akademie věd České republiky (výzkumný záměr Z40550506 a RVO: 61388963), Grantové agentury České republiky (granty č. 303/10/1368 a č. 15-08679S) a Technologické agentury České republiky (grant č. TE01020028).

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ	4
OBSAH	5
ABSTRAKT	8
KLÍČOVÁ SLOVA	9
ABSTRACT	10
KEY WORDS	11
SEZNAM ZKRATEK	12
1. ÚVOD	15
2. TEORETICKÁ ČÁST	16
2.1 Obezita a její prevalence	16
2.2 Regulace příjmu potravy	16
2.3 Periferní hormony zapojené do dlouhodobé regulace příjmu potravy	19
2.3.1 Leptin	21
2.3.2 Insulin	21
2.3.3 Ghrelin	22
2.4 Neuropeptidy zapojené do regulace příjmu potravy	23
2.4.1 Peptid CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript)	23
2.4.1.1 Objev	23
2.4.1.2 Struktura	23
2.4.1.3 Vazebné studie s peptidem CART	25
2.4.1.4 Hledání receptoru a signalizace peptidu CART	26
2.4.1.5 Výskyt a fyziologická funkce	27
2.4.1.6 Příjem potravy	27
2.4.1.7 Další role v organismu	28
2.4.1.8 Fragmenty a analogy peptidu CART	29
2.4.2 PrRP (prolactin-releasing peptide)	30
2.4.2.1 Objev a výskyt	30
2.4.2.2 Struktura PrRP	31
2.4.2.3 Afinita PrRP k receptoru pro neuropeptid FF 2 (NPFF2)	32
2.4.2.4 Homologie receptoru GPR10 s Y receptory	32
2.4.2.5 Fyziologická role	32

2.4.2.6	Vliv na příjem potravy	33
2.4.2.7	Myši s vyřazeným genem pro GPR10 a PrRP	34
2.4.2.8	Analogy PrRP	34
2.4.2.9	Lipidizace peptidů	35
2.4.3	Další peptidy ovlivňující příjem potravy působící přes receptory spřažené s G-proteinem (GPCR)35	
2.4.3.1	Neuropeptid Y (NPY)	36
2.4.3.2	Neuropeptid FF (NPFF)	36
2.5	Zvířecí modely obezity	37
2.5.1	Geneticky modifikované obézní modely	37
2.5.2	Modely dietou indukované obezity	38
3.	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	40
4.	MATERIÁL	41
5.	METODY	45
5.1	Syntéza peptidů a jodace	45
5.2	Kultivace buněčných linií	47
5.3	Metody týkající se peptidu CART a jeho analogů prováděné <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i>	48
5.3.1	Kompetitivní a saturační vazebné experimenty	48
5.3.2	Stanovení signalizačních drah pomocí imunoblotu	49
5.3.3	Imunohistochemické stanovení aktivace c-Jun po ICV podání	50
5.3.3.1	Zpracování tkání	50
5.3.3.2	Imunohistochemie	51
5.3.4	Příjem potravy po ICV podání peptidu CART a jeho analogů	51
5.4	Metody týkající se PrRP a jeho lipidovaných analogů	51
5.4.1	Kompetitivní vazebné experimenty na buněčné linii RC-4B/C	51
5.4.2	Kompetitivní vazebné experimenty na buněčných membránách s NPFF2 receptorem	52
5.4.3	Kompetitivní vazebné experimenty na buněčné linii CHO-K1 s transfekovaným receptorem GPR10	52
5.4.4	Saturační a kompetitivní vazebné experimenty na buněčné linii U2OS s transfekovaným receptorem Y5	52
5.4.5	Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET, fluorescence resonance energy transfer) s beta-laktamázy referenčním genem na buněčné linii CHO-K1 s receptorem GPR10	52
5.4.6	Krátkodobý příjem potravy po podání lipidovaných analogů PrRP se změnami na C-konci na štíhlých myších	53
5.4.7	Účinky dlouhodobého podávání lipidovaných analogů PrRP u myšího modelu dietou indukované obezity (DIO)	53
5.4.7.1	Stanovení biochemických parametrů v plasmě	54
5.4.7.2	Stanovení exprese mRNA v tukové tkáni a játrech	54
5.5	Statistické vyhodnocení	54
5.5.1	Vyhodnocení vazebných experimentů	54

5.5.2	Signalizace na buněčné linii PC12	55
5.5.3	Vyhodnocení imunohistochemického stanovení c-Jun	56
5.5.4	Vyhodnocení signalizačních experimentů na CHO-K1 s transfekovaným receptorem GPR10	56
5.5.5	Vyhodnocení experimentů <i>in vivo</i> u hladových myší	56
5.5.6	Statistické vyhodnocení dat z dlouhodobého experimentu na DIO myších	56
6.	VÝSLEDKY	57
6.1	Peptid CART	57
6.1.1	Specifická vazba peptidu CART na buněčné linii PC12	57
6.1.2	Význam jednotlivých disulfidových můstků peptidu CART pro jeho biologickou aktivitu <i>in vitro</i>	59
6.1.3	Význam jednotlivých disulfidových můstků peptidu CART pro jeho biologickou aktivitu <i>in vivo</i>	60
6.1.4	Signalizace peptidu CART v buňkách PC12	62
6.1.5	Imunohistochemické stanovení aktivace c-Jun u hladových myší	64
6.2	Studium lipidovaných analogů PrRP	65
6.2.1	Syntéza lipidovaných analogů PrRP31 a PrRP20	66
6.2.2	Afinita lipidovaných analogů PrRP <i>in vitro</i> k různým receptorům	66
6.2.3	Saturační a kompetitivní vazebné experimenty na buněčné linii U2OS s transfekovaným receptorem Y5	69
6.2.4	Aktivace beta-laktamázy reportérového genu	72
6.2.1	Účinek lipidovaných analogů PrRP v krátkodobém podávání u hladových myší	73
6.2.2	Účinky lipidovaných analogů PrRP v dlouhodobém podávání DIO myším	76
7.	DISKUSE	81
7.1	Peptid CART a jeho analogy	81
7.1.1	Specifická vazba peptidu CART na buněčné linii PC12	81
7.1.2	Význam jednotlivých disulfidových můstků peptidu CART pro jeho biologickou aktivitu	81
7.1.3	Signalizace peptidu CART v buňkách PC12	83
7.1.4	Imunohistochemické stanovení aktivace c-Jun u hladových myší	84
7.2	PrRP a jeho nové lipidované analogy	85
7.2.1	Afinita lipidovaných analogů PrRP <i>in vitro</i> k různým receptorům	86
7.2.2	Účinek lipidovaných analogů PrRP v krátkodobém podávání hladovým myším	87
7.2.3	Účinek lipidovaných analogů PrRP v dlouhodobém podávání DIO myším	88
8.	ZÁVĚR	90
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	91
	SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ	99
	PŘÍLOHY	101

ABSTRAKT

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

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

PrRP patří do rodiny RF-amidových peptidů a byl u něj potvrzen anorexigenní účinek. PrRP se váže na svůj receptor GPR10 a vykazuje vysokou afinitu i k receptoru pro neuropeptid FF (NPFF2). V naší laboratoři byly navrženy lipidované analogy PrRP, které po periferním podání snižují příjem potravy, a u kterých je předpokládán přestup přes hematoencefalickou bariéru. Byla testována biologická aktivita nových lipidovaných analogů PrRP s myristovou nebo palmitovou kyselinou na N-konci a se změnami Phe³¹ za jiné aromatické nekódové aminokyseliny na C-konci, a to *in vitro* a *in vivo*. Lipidované analogy se vážou s vysokou afinitou k hypofyzární buněčné linii RC-4B/C a k buňkám s transfekovaným GPR10 nebo NPFF2. Navíc byla prokázána vazba lipidovaných analogů, nikoliv však přirozeného PrRP, na receptor neuropeptidu Y - Y5, který vykazuje homologii s GPR10.

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

KLÍČOVÁ SLOVA

peptid CART, PC12, c-Jun, JNK, PrRP, GPR10, NPFF2, Y5, příjem potravy, lipidizace

ABSTRACT

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

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

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

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

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

KEY WORDS

CART peptide, PC12, c-Jun, JNK, PrRP, GPR10, NPFF2, Y5, food intake, lipidization

SEZNAM ZKRATEK

α -MSH	α -melanocyty stimulující hormon
ACACA	acetyl-CoA karboxylasa 1 (acetyl-CoA carboxylase 1)
ACC	<i>nucleus accumbens</i>
ACTH	adrenokortikotropní hormon (adrenocorticotropic hormone)
AgRP	agouti-related peptid
AP	<i>area postrema</i>
ARC	<i>nucleus arcuatus</i>
ATP	adenosintrifosfát
B2M	β_2 -mikroglobulin
BAT	hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue)
BBB	hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
BPTI	hovězí pankreatický trypsinový inhibitor (bovine pancreatic trypsin inhibitor)
CART	kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (cocaine- and amphetamine-regulated transcript)
CCK	cholecystokinin
CNS	centrální nervová soustava
CREB	protein vázající responzivní element pro cyklický adenosin monofosfát (cyclic AMP-response element-binding protein)
CRH	kortikoliberin (corticotropin-releasing hormone)
DEX	dexametason
DIO	dietou indukovaná obezita (diet-induced obesity)
DMN	dorsomediální jádro (dorsomedial nucleus)
ELISA	enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
Erk	extracelulárně regulovaná kinasa (extracellular-regulated kinase)
FABP-4	protein vázající mastné kyseliny (fatty acid binding protein 4)
FASN	syntasa mastných kyselin (fatty acid synthase)
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie (fluorescence resonance energy transfer)
GABA	γ -aminomáselná kyselina (γ -aminobutyric acid)

GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GHS-R	receptor pro ghrelin (growth hormone secretagogue receptor)
GIT	gastrointestinální trakt
GLP	peptid podobný glukagonu (glucagon-like peptide)
GPCR	receptor spřažený s G proteinem (G-protein coupled-receptor)
GPR10	hGRP3, UHR-1, receptor spřahující G protein 10 (G-protein coupled-receptor 10)
GTP	guanosintrifosfát
HF	vysokotuková (high fat)
HPA	hypothalamo-hypofyzární osa (hypothalamic-pituitary-adrenal axis)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
ICV	intracerebroventrikulární (podané do mozkové komory)
IP	vnitrobřišně, intraperitoneálně (intraperitonealy)
IPAT	vnitrobřišní tuk (intraperitoneal adipose tissue)
JNK	c-Jun N-koncová kinasa (c-Jun N-terminal kinase)
LHA	laterální hypothalamus (lateral hypothalamic area)
LPL	lipoproteinová lipasa
MC3R a MC4R	melanokortinový receptor 3 a 4
mAb	monoklonální protilátka (monoclonal antibody)
NGF	nervový růstový faktor (nerve growth factor)
NPFF	neuropeptid FF
NPFF2	receptor 2 pro neuropeptid FF
NPY	neuropeptid Y
NTS	<i>nucleus tractus solitarii</i>
<i>ob</i>	gen kódující leptin
Ob-Rb	dlouhá forma leptinového receptoru
PACAP	hypofyzární peptid aktivující adenylátcyklázu (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PFA	perifornikální oblast hypothalamu (perifornical area)
POMC	proopiomelanokortin
PP	pankreatický peptid

PrRP	peptid uvolňující prolaktin (prolactin-releasing peptide)
PVN	paraventrikulární jádro (paraventricular nucleus)
PYY	peptid YY
RIA	radioimunologická analýza (radioimmunoassay)
UCP-1	termogenin (uncoupling protein 1)
SC	podkožně, subkutánně (subcutaneously)
SCAT	podkožní tuk (subcutaneous adipose tissue)
SHR	spontánně hypertenzní potkan (spontaneously hypertensive rat)
SHROB	obézní spontánně hypertenzní potkan, tzv. Koletského (spontaneously hypertensive obese rat)
SREBP	protein vázající sterolový regulační element (sterol regulatory element-binding protein)
TRH	thyreoliberin (thyrotropin-releasing hormone)
VLM	ventrolaterální retikulární jádro (ventrolateral medulla)
VMN	ventromediální jádro (ventromedial nucleus)
WHO	světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

1. ÚVOD

Západní civilizace je charakteristická příjmem potravin s vysokou kalorickou hodnotou a specifická sedavým způsobem života s minimem vydané energie. Tento tzv. západní model se však rozšiřuje a po celém světě tak dochází k prudkému nárůstu obezité populace a osob s nadváhou. Proto je potřeba zabývat se výzkumem látek ovlivňujících metabolismus, příjem potravy a tělesnou hmotnost, které by mohly vést také k případné léčbě obezity a souvisejících zdravotních komplikací.

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

Ačkoliv byl peptid CART objevený v roce 1995, stále se nepodařilo nalézt jeho receptor. Pro možné využití je nezbytné další studium tohoto peptidu, které by případně vedlo k objevu jeho receptoru/receptorů. V této práci byla studována vazba a signalizace peptidu CART u buněk PC12 obsahujících potenciální vazebné místo pro peptid CART.

PrRP je známý pro své anorexigenní účinky po intracerebroventrikulárním (ICV) podání. V naší laboratoři byly syntetizovány analogy s navázanou mastnou kyselinou na N-konec řetězce, jejichž účinkem dochází ke snížení příjmu potravy i po podání látky do periferie (subkutánně či intraperitoneálně). Lipidované analogy PrRP byly studovány z hlediska jejich působení na receptory patřící do stejné nebo podobné skupiny, jako receptor pro PrRP *in vitro* a *in vivo*.

Tato disertační práce je součástí projektů skupiny RNDr. Lenky Maletínské, CSc. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. Některé články týkající se obou projektů publikované v odborných časopisech se staly základem této práce. Seznam těchto publikací je uveden na straně 99 v pořadí, které odpovídá jejich řazení v šesté kapitole ve výsledcích.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Obezita a její prevalence

V současné době je obezita považována za jednu z nejrozšířenějších civilizačních chorob a dosahuje epidemických rozměrů po celém světě. Obezita postihuje nejen dospělé, ale i dospívající a děti. Dle informací světové zdravotnické organizace (WHO) dosáhl v roce 2014 počet osob s nadváhou 1,9 miliardy a 600 milionů bylo obézních (WHO, 2000). Téměř 2,8 milionů osob každoročně umírá na komplikace spojené s nadváhou či obezitou.

Obezita je charakterizována jako nadměrné uložení tělesného tuku a rozvíjí se při dlouhodobém zvýšeném energetickém příjmu, převažujícím nad energetickým výdejem. Můžeme ji definovat pomocí indexu tělesné hmotnosti (BMI) vypočítaného jako tělesná hmotnost [kg] děleno druhou mocninou výšky [m²]. U dospělých je nadváha definována jako hodnota BMI mezi 25 – 29,9 kg/m² a obezita BMI ≥ 30 kg/m². Dalším důležitým kritériem pro stanovení obezity je obvod pasu, který pozitivně koreluje s obsahem břišního tuku. Hraniční hodnota je ≥ 94 cm u mužů a ≥ 80 cm u žen (Tsigos et al., 2008; Yu and Kim, 2012).

Nadváha a obezita je spojená s rozvojem dalších chorob a zdravotních komplikací, jako je diabetes mellitus 2. typu, ischemická choroba srdeční, hypertenze, dyslipidémie, rakovina, osteoartritida a mnoho dalších (Tsigos et al., 2008). Při léčbě obezity se zpočátku přistupuje k dietetickým opatřením, zvýšení pohybové aktivity a kontroluje se energetický příjem a výdej. Farmakologická léčba či bariatrická operace je varianta pro pacienty, u kterých běžnými opatřeními ke snížení hmotnosti dochází velmi sporadicky nebo vůbec nedochází (Heal et al., 2012).

2.2 Regulace příjmu potravy

Studium fyziologických interakcí mezi periferií a centrální nervovou soustavou (CNS) je důležitou složkou pro pochopení regulace energetické rovnováhy a příjmu potravy. Hlavním centrem regulace příjmu potravy je hypothalamus, který přijímá signály z periferie a upravuje tak potravní chování a energetickou homeostázu (Suzuki et al.,

2012; Yu and Kim, 2012). Hypothalamus je oblast mozku, která se nachází na spodině lebeční a skládá se z několika jader: *nucleus arcuatus* (ARC), paraventriculární jádro (PVN), laterální hypothalamus (LHA), ventromediální jádro (VMN) a dorsomediální jádro (DMN) (Schwartz et al., 2000).

Nucleus arcuatus je považován za nejdůležitější oblast hypothalamu, která integruje periferní signály i podněty pocházející z CNS a řídí regulaci příjmu potravy. Nachází se ve ventromediální části hypothalamu a sousedí s *eminentia medialis*, oblastí s deficientní hematoencefalickou bariérou (BBB), přes kterou mohou cirkulující periferní látky snadno přejít do ARC (Broadwell and Brightman, 1976; Yu and Kim, 2012).

V ARC se nachází dvě populace neuronů s opačným působením na příjem potravy. První vylučuje neuropeptid Y (NPY) a agouti-related peptid (AgRP), neuropeptidy zvyšující příjem potravy (orexigenní), druhá populace vylučuje α -melanocyty stimulující hormon (α -MSH), posttranslační produkt proopiomelanokortinu (POMC) a CART, látky, které příjem potravy snižují (anorexigenní). POMC/CART a NPY/AgRP neurony mají na sebe vzájemný fyziologický antagonistický účinek.

α -MSH působí jako agonista receptorů melanokortinu 3 a 4 (MC3R a MC4R) obsažených v neuronech různých hypothalamických oblastí a snižuje příjem potravy (Cone, 2005). Deficience MC4R či mutace v genu *Mc4r* vede u myši i lidí k hyperfagii (příjem nadměrného množství potravy) a obezitě (Huszar et al., 1997; Yeo et al., 1998). Právě centrální melanokortinová dráha (zahrnující POMC neurony a neurony exprimující MC4R) hraje klíčovou roli při regulaci příjmu potravy vedoucí k anorexigennímu účinku.

NPY je naopak velmi silným orexigenním stimulem (Clark et al., 1984). Aktivací NPY/AgRP neuronů dochází k výrazné stimulaci příjmu potravy, navíc tyto neurony vylučují gama-aminomáselnou kyselinu (GABA), inhibiční neurotransmiter, který potlačuje anorexigenní aktivitu POMC/CART neuronů (Joly-Amado et al., 2014; Sohn, 2015). U AgRP byl zjištěn inverzní antagonismus k MC3R a MC4R (Ollmann et al., 1997).

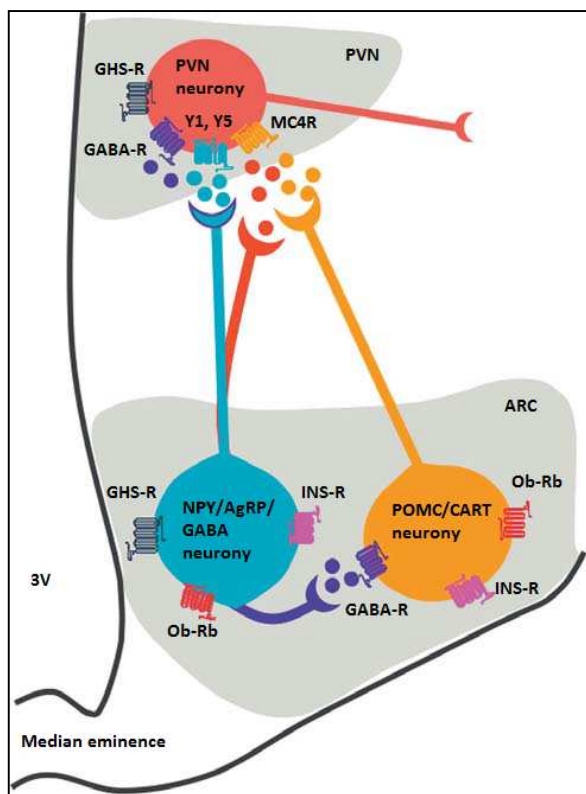
Tyto dvě populace primárních neuronů obsahují receptory pro periferní hormony, které regulují příjem potravy na dlouhodobé úrovni, jako je leptin a insulin, ale i krátkodobé úrovni, jako je peptid YY (PYY), cholecystokinin (CCK) či peptid podobný glukagonu (GLP) a ghrelin, který působí v dlouho i krátkodobé regulaci příjmu potravy. NPY/AgRP neurony jsou inhibovány leptinem a insulinem a stimulovány ghrelinem a naopak neurony POMC/CART jsou leptinem a insulinem stimulovány (Morton et al.,

2006). ARC je také propojen s dalšími oblastmi hypothalamu, které regulují příjem potravy, jako je PVN, VMN, DMH a LHA (Harrold et al., 2012).

PVN integruje signály z neuronů obsahující NPY/AgRP a POMC/CART v ARC a také z orexigenních neuronů v LHA (obrázek 1). Stimulace PVN vede ke snížení příjmu potravy a léze v této oblasti vedou k hyperfagii, sníženému výdeji energie a obezitě (Leibowitz et al., 1981; Wang et al., 2013). V PVN se nacházejí receptory NPY (Y1 a Y5 receptory), MC3R/MC4R a také neurony, které syntetizují a vylučují neuropeptidy s katabolickým účinkem a snižují příjem potravy (obrázek 1).

Léze v LHA či perifornikální oblast hypothalamu (PFA) naopak způsobují snížení příjmu potravy a úbytek hmotnosti (Schwartz et al., 2000). Stejně jako PVN, i LHA získává signály z ARC a obsahuje neurony, které syntetizují peptidy s anabolickým účinkem a zvyšují příjem potravy a tělesnou hmotnost. Hypothalamická centra s opačnými účinky na příjem potravy slouží k rychlé a efektivní kontrole energetické homeostáze, protože může dojít za aktivace centra jednoho k potlačení účinku centra druhého (Woods and D'Alessio, 2008).

Další důležitou oblastí v regulaci příjmu potravy je *nucleus tractus solitarii* (NTS), který se nachází v mozkovém kmeni a integruje krátkodobé signály pocházející z periferie prostřednictvím bloudivého nervu (*nervus vagus*). NTS je propojen s oblastmi v hypothalamu, například PVN a podílí se tak na regulaci velikosti porce a na frekvenci přijímání potravy (Arora and Anubhuti, 2006).



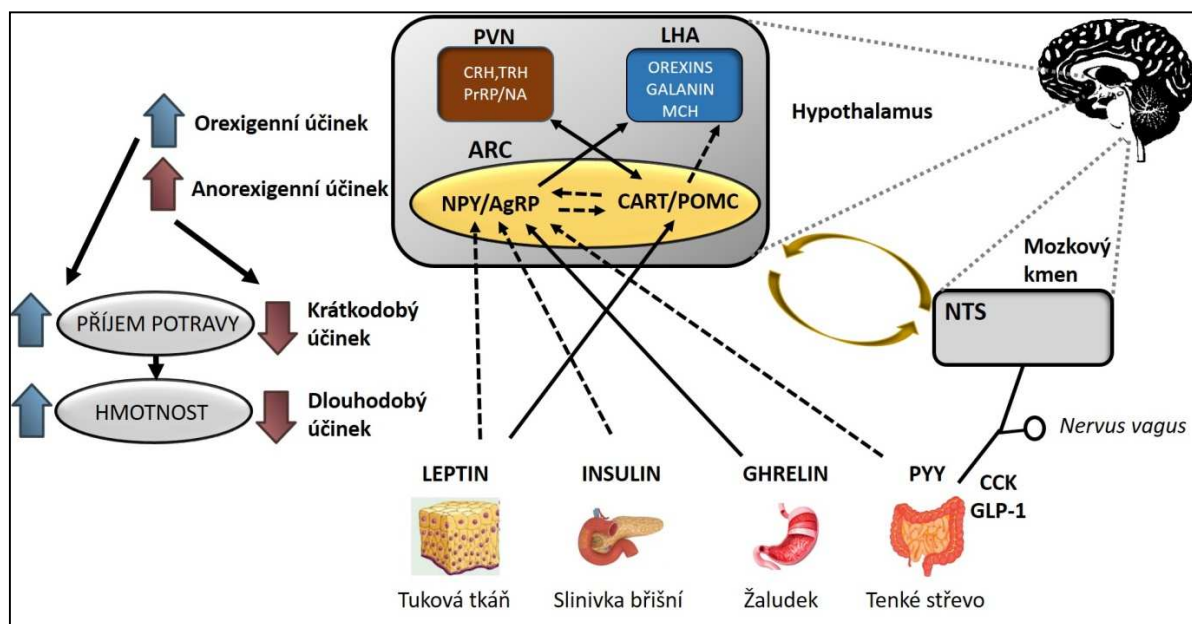
Obrázek 1: NPY/AgRP a POMC/CART neuronů v nucleu arcuatu

Skupina neuronů prvního řádu NPY/AgRP (modrá) a POMC/CART (oranžová) v nucleu arcuatu (ARC). Z těchto populací dále vedou signály do paraventriculárního jádra (PVN). Zvýšená aktivita POMC neuronů zvýší hladinu α -MSH v PVN, zde dojde k aktivaci neuronů s MC4R a ke snížení příjmu potravy. Neurotransmitter GABA, vylučovaný z NPY/AgRP neuronů, blokuje pomocí receptorů GABA-R anorexigenní účinek POMC/CART neuronů. NPY/AgRP neuronů obsahují receptory pro mnoho hormonů, například pro ghrelin (GHS-R), insulin (INS-R) a leptin (Ob-Rb). POMC/CART skupina neuronů však GHS-R neobsahuje. Převzato a upraveno z (Briggs and Andrews, 2011). Zkratky: neuropeptid Y (NPY), agouti-related peptid (AgRP), proopiomelanokortin (POMC), kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (CART), α -melanocyty stimulující hormon (α -MSH), γ -aminomáselná kyselina (GABA)

2.3 Periferní hormony zapojené do dlouhodobé regulace příjmu potravy

Do regulace příjmu potravy je zapojené velké množství periferních hormonů (obrázek 2). Hormony vylučované v gastrointestinálním traktu (GIT), jako je CCK, PYY,

GLP-1 či oxytomodulin mají roli v krátkodobé regulaci příjmu potravy. Nejdůležitější periferně vylučované a centrálně i periferně působící hormony, které energetickou rovnováhu udržují na dlouhodobé úrovni, jsou anorexigenní leptin a insulin. Krátkodobým i dlouhodobým periferním hormonem s unikátní strukturou je orexigenní ghrelin (obrázek 2).



Obrázek 2: Regulace příjmu potravy

Regulace příjmu potravy je komplexní děj spojující signály z CNS a periferie. Hypothalamus, zejména nucleus arcuatus (ARC), integruje signály z periferních hormonů, jako je leptin, insulin či ghrelin. Periferně vylučované hormony (např. peptid YY (PYY), cholecystokinin (CCK), peptid podobný glukagonu (GLP-1)) působí přes nervus vagus do nucleu tractu solitarii (NTS) v mozgovém kmeni. Tyto hormony ovlivňují neurony prvního řádu a signalizující anorexigenní a orexigenní peptidy působí na další jádra hypothalamu. Převzato a upraveno z Maletínská a kol. 2016 (v tisku).

Zkratky: neuropeptid Y (NPY), agouti-related peptid (AgRP), kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (CART), proopiomelanokortin (POMC), paraventrikulární jádro (PVN), kortikoliberin (CRH), tyreoliberin (TRH), peptid uvolňující prolaktin (PrRP), laterální hypothalamus (LHA), hormon koncentrující melanin (MCH).

Dráhy: —————> aktivační
 - - - - -> inhibiční

2.3.1 Leptin

Leptin je klíčovou součástí regulace příjmu potravy a energetické rovnováhy. Je to anorexigenní hormon produkovaný adipocyty v bílé tukové tkáni a vylučovaný v poměru k hmotě tělesného tuku (Kim et al., 2014). Je produktem obézního (*ob*) genu a k vyvolání fyziologického účinku interaguje s dlouhou formou leptinového receptoru Ob-Rb (Balthasar et al., 2004). *Ob* gen kódující leptin byl identifikován v roce 1994 u spontánně obézních *ob/ob* myší s mutacemi pouze v tomto jediném genu (Zhang et al., 1994).

Leptin je transportován do mozku přes BBB pomocí transportérového systému (Banks et al., 1996). V ARC, kde jsou hojně exprimovány leptinové receptory, je pak vyvolán anorexigenní účinek. Aktivace leptinové signalizace v hypothalamu vede ke zvýšené neuronové aktivitě v POMC/CART skupině neuronů a snížení aktivity NPY/AgRP neuronů. Dochází tak k redukci příjmu potravy a zvýšenému energetickému výdeji (Sahu, 2003).

U lidí i hlodavců s leptinovou deficiencí podávání leptinu snižuje hyperfagii a obezitu (Licinio et al., 2004), avšak většina obézních osob má zvýšenou hladinu leptinu v plasmě značící leptinovou rezistenci. U těchto osob je léčba leptinem neúčinná. Jedním z možných vysvětlení leptinové rezistence je snížený transport leptinu do mozku vlivem zahlcení leptinových transportérů v BBB či omezená leptinová signalizace v neuronech hypothalamu (Munzberg, 2010; Yu and Kim, 2012).

2.3.2 Insulin

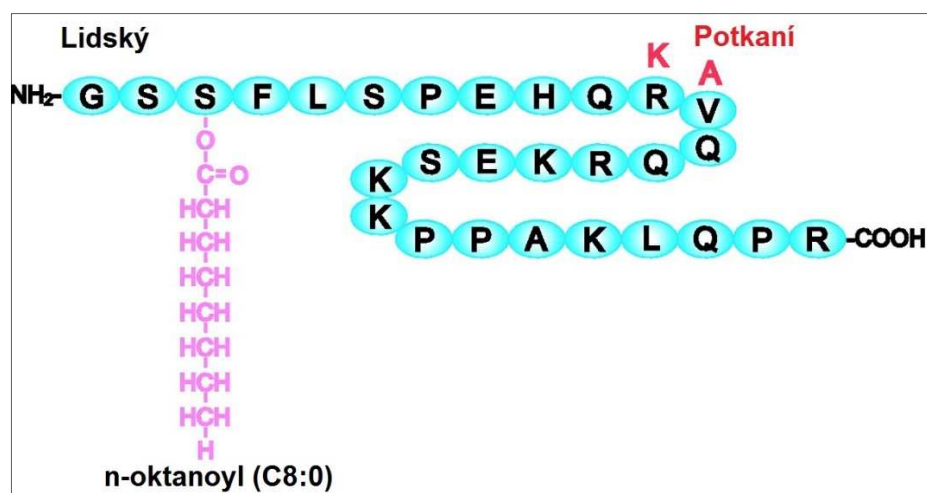
Insulin je produkován β buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní a reguluje homeostázi glukosy v těle (Bagdade et al., 1967). Je vylučován po jídle a transportován do mozku pomocí insulinových receptorů, kde má důležitou roli jako dlouhodobý anorexigenní regulátor energetické rovnováhy. Hladina insulinu v plasmě je pozitivně ovlivňována objemem tuku v těle, proto je insulin vedle leptinu považován za ukazatel adipozity v těle.

V CNS jsou insulinové receptory v hypothalamických oblastech důležitých pro udržení energetické rovnováhy jako je ARC, DMN a PVN (Corp et al., 1986). ICV podání insulinu vede u hlodavců i opic ke snížení příjmu potravy a tělesné hmotnosti (Suzuki et al., 2012). Stejně jako leptin, insulin spouští aktivaci POMC neuronů a inhibuje NPY/AgRP neurony. U myší se specificky inaktivovaným insulinovým receptorem

dochází ke zvýšení tělesné hmotnosti, hmotnosti tuku, zvýšenému příjmu potravy a k obezitě (Bruning et al., 2000).

2.3.3 Ghrelin

Ghrelin je jediný dosud známý periferní orexigenní hormon. Je syntetizován jako preprohormon a po acylaci n-oktanovou kyselinou na serin v pozici 3 a následným štěpením vznikne aktivní peptid složený z 28 aminokyselin (obrázek 3). Ghrelin je jediným dosud známým lipidovaným peptidovým hormonem regulujícím příjem potravy. Byl izolován z potkaního žaludku jako ligand sirotčího receptoru GHS-R (growth hormone secretagogue receptor) (Kojima et al., 1999). Je vylučován specializovanými endokrinními buňkami z žaludku. Centrální i periferní podání ghreluinu stimuluje příjem potravy a zvyšuje tělesnou hmotnost (Kojima et al., 1999). Hladina ghreluinu v plasmě je zvýšená během hladovění, prudce se zvyšuje před každým jídlem a rychle klesá po jídle. Proto je ghrelin nazýván hormonem hladu. Myši s deficiencí ghreluinu a GHS-R jsou rezistentní vůči obezitě navozené vysokotukovou dietou, ale tato rezistence nepřetrvává do dospělosti (Sun et al., 2003; Zigman et al., 2005).



Obrázek 3: Struktura lidského a potkaního ghreluinu

Ghrelin je složen z 28 aminokyselinového řetězce a serin v pozici 3 je acylován n-oktanoylovou skupinou. Tato modifikace je nezbytná pro biologickou aktivitu ghreluinu. Převzato a upraveno dle (Kojima and Kangawa, 2005).

2.4 Neuropeptidy zapojené do regulace příjmu potravy

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

2.4.1.1 Objev

CART byl poprvé popsán v roce 1995 pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) jako mRNA zvyšující svou hladinu ve striatu v mozku po podání kokainu či amfetaminu, ale nikoliv po podání dalších návykových drog, například morfinu (Douglass et al., 1995). V roce 1998 Thim a kol. purifikovali a charakterizovali rekombinantně vyrobené peptidy CART, které byly exprimovány v kvasinkách po vložení cDNA kódující CART 1-102 (Thim et al., 1998). Poté v roce 1999 Thim a kol. izolovali z různých potkaních tkání dva peptidy CART (obrázek 5) (Thim et al., 1999). Již před objevením CART byl z ovčího hypothalamu izolován fragment (Spiess et al., 1981), který byl později podle sekvence přiřazen k peptidu CART.

2.4.1.2 Struktura

Z genu pro CART jsou u potkanů a myší transkribovány a poté sestřiženy dvě různě dlouhé mRNA a následně přepsána krátká a dlouhá forma propeptidu proCART 1-89 a proCART 1-102 (obrázek 4). ProCART obsahují specifická místa, které umožňují posttranslační úpravy prohormonem konvertasou (Dey et al., 2003). Tímto procesem vznikají dva biologicky aktivní peptidy CART 55-102 (obrázek 5) a CART 62-102, které se číslovají podle delšího propeptidu. U lidí je exprimován pouze kratší propeptid proCART 1-89, a tak vzniká peptid CART 42-89 (analogický CART 55-102) a CART 49-89 (analogický CART 62-102) (obrázek 4) (Rogge et al., 2008). Biologicky aktivní jsou peptidy CART 54-102, CART 55-102, CART 61-102 a CART 62-102 (Thim et al., 1998).

Potkaní dlouhá forma

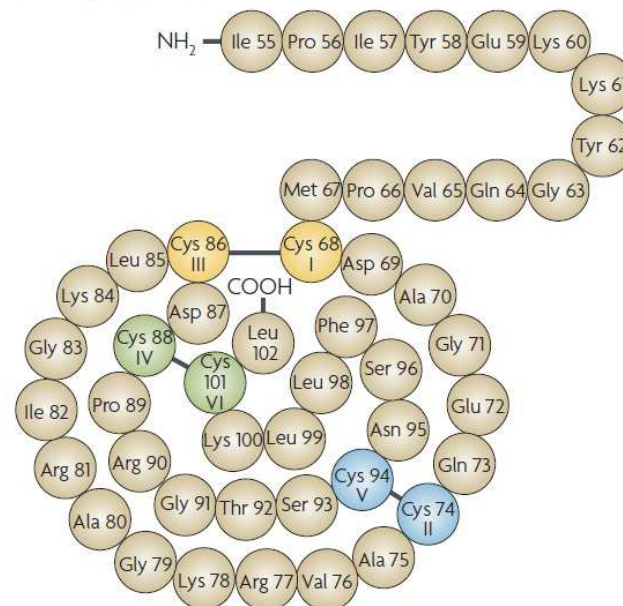
QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKEL**LPRRLRAPGAVLQ**IEALQEVLLKLLKSKR**IPIYEKKYQVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL**
 55 62 102

Potkaní krátká forma

QEDAELQPRALDIYSAVDDASHEKEL**L**IEALQEVLLKLLKSKR**IPIYEKKYQVPMCDAGEQCAVRKGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL**
 42 49 89

Obrázek 4: Struktura potkaního proCART propeptidu

Dlouhá forma potkaního propeptidu CART 1-102 (nahore) a krátká forma proCART 1-89 (dole). Z dlouhé formy vznikají biologicky aktivní peptidy CART 55-102 a CART 62-102. Z krátké formy propeptidu pak vznikají strukturně stejné peptidy CART 42-89 a CART 49-89. U lidí vznikají biologicky aktivní peptidy pouze z krátké formy propeptidu. Převzato a upraveno z (Rogge et al., 2008).

Struktura peptidu CART 55-102**Obrázek 5: Struktura peptidu CART 55-102**

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

2.4.1.3 Vazebné studie s peptidem CART

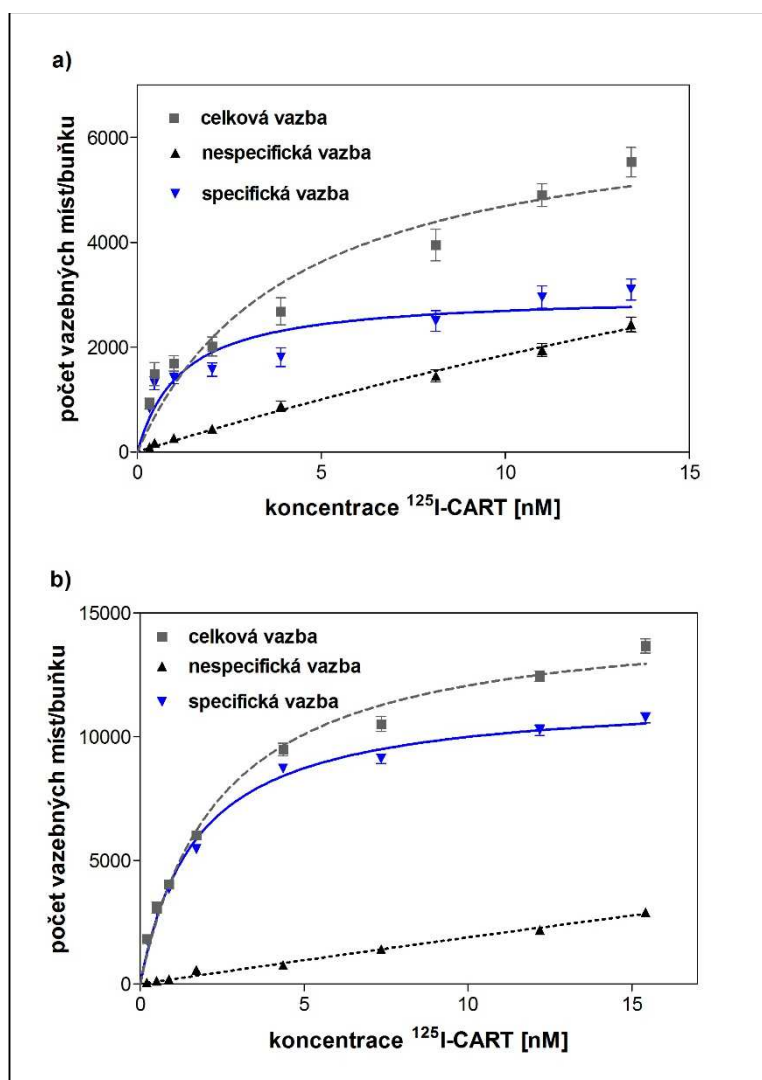
Při hledání receptoru je obvykle využíváno hledání specifické vazby k potenciálnímu vazebnému místu pomocí radioaktivně značeného peptidu. Pro vazebné studie se nejčastěji využívá komerčně dostupný peptid CART 61-102, který má stejnou afinitu k vazebnému místu jako přirozený peptid CART 62-102 a peptid CART 55-102 a pro jodaci se využívá tyrosinu v pozici 62.

První vazebné studie byly prováděny na myší hypofyzární buněčné linii AtT20, kde byla publikována specifická vazba peptidu ^{125}I -CART 61-102 (Vicentic et al., 2005).

Další studie s komplexem peptidu CART 55-102 a zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) prokázala vazbu na lidskou hepatocytární buněčnou linii HepG2 a disociované hypothalamické buňky (Keller et al., 2006).

Naše skupina prokázala specifickou vazbu peptidu CART 61-102 na potkaní feochromocytomovou buněčnou linii PC12 (obrázek 6) (Maletínská et al., 2007). Ze saturačních vazebných experimentů byla změřena hodnota K_d $0,48 \pm 0,16$ nM a B_{max} 2228 ± 529 vazebných míst/buňku pro nediferencované buňky a K_d $1,90 \pm 0,27$ nM a B_{max} 11194 ± 261 vazebných míst/buňku u PC12 diferencovaných v neuronový fenotyp pomocí nervového růstového faktoru (NGF) (Maletínská et al., 2007).

Ve studii Jonese a kol. bylo zjištěno, že se peptid CART specificky váže na primární buněčnou linii z potkaního nucleu accumbens. Afinita peptidu k receptoru byla snížena v přítomnosti analogu GTP, zatímco po přidání ATP analogu k tomuto efektu nedošlo, což naznačuje, že receptor pro peptid CART by mohl být receptorem spřaženým s G-proteinem (GPCR) (Jones and Kuhar, 2008).



Obrázek 6: Saturační vazebné experimenty na buněčné linii PC12

Saturační vazebné experimenty na **a)** nediferencovaných buňkách, hodnoty K_d $0,48 \pm 0,16$ nM a B_{max} 2228 ± 529 vazebných míst/buňku a na **b)** PC12 diferencovaných v neurony nervovým růstovým faktorem (NGF), hodnoty K_d $1,90 \pm 0,27$ nM a B_{max} 11194 ± 261 vazebných míst/buňku. Převzato a upraveno dle (Maletínská et al., 2007).

2.4.1.4 Hledání receptoru a signalizace peptidu CART

Po objevu CART mRNA a peptidů se mnoho laboratoří pokoušelo najít receptor, avšak ten nebyl dosud identifikován. Vazebné studie na buněčné linii PC12 naznačují, že receptor/y pro peptid CART existuje/í. Afinita peptidu CART k jeho specifickým vazebným místům je typická pro receptory, stejně jako počet vazebných míst na buňku. Bylo popsáno, že po centrálním podání peptidu CART dochází ke zvýšení hladiny c-Fos mRNA v různých oblastech mozku, především v hypothalamu a v mozkovém kmeni (Vrang et al., 1999b). Peptid CART inhibuje napětím řízené vápníkové kanály a tím snižuje průnik Ca^{2+} iontů přes

buněčnou membránu u potkaních hipokampálních neuronů. Tento efekt je blokován pomocí pertusového toxinu, což naznačuje, že signalizace peptidu CART může být zprostředkována G_i a G_o proteiny (Yermolaieva et al., 2001). Sarkar a kol. zjistili, že CART výrazně zvyšuje fosforylaci proteinu vzájemného responzivní element pro cyklický adenosinmonofosfát (CREB) v PVN hypothalamu sytých i hladových potkanů (Sarkar et al., 2004). Z *in vitro* studií na myši hypofyzární buněčné linii AtT20 a potkaní hypofyzární buněčné linii GH3 bylo zjištěno, že peptid CART rovněž zvyšuje fosforylaci extracelulárně regulované kinasy (Erk1/2). Aktivovaná signalizační dráha Erk1/2 byla u AtT20 buněk po stimulaci peptidem CART inhibována pertusovým toxinem (Lakatos et al., 2005). Tyto experimenty naznačují, že peptid CART aktivuje dráhu spřaženou s G-proteinem a jeho receptor by mohl být GPCR. V naší skupině jsme tyto experimenty zopakovali, avšak nebyla nalezena specifická vazba peptidu CART, ani signalizace popsaná účinkem peptidu CART (nepublikované výsledky).

2.4.1.5 Výskyt a fyziologická funkce

Nedlouho po objevu bylo zjištěno, že peptidy CART se vyskytují v mozku v oblastech spojených s regulací příjmu potravy a energetickou homeostázou, zvláště pak v hypothalamu – v ARC, LHA, PVN a *nucleu accumbens* (ACC) (Koylu et al., 1998). Peptidy CART se vyskytují nejen v mozku, ale i periferních oblastech souvisejících s příjmem potravy – v gastrointestinálním traktu ve střevech (Ekblad, 2006) či v *nervu vago* (Broberger et al., 1999).

2.4.1.6 Příjem potravy

První studie účinků peptidu CART byla provedena Kristensenem a kol., kdy po ICV podání peptidu CART došlo ke snížení příjmu potravy u hladových i sytých potkanů. Naopak ICV podaná polyklonální protilátka proti peptidu CART příjem potravy zvýšila (Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1998). Expres CART mRNA je v ARC pozitivně ovlivňována leptinem (Kristensen et al., 1998). U hladových myší a u modelů s mutací genu pro leptin – ob/ob myší, které neprodukují leptin a u obézních Zuckerových fa/fa potkanů s nefunkčním leptinovým receptorem, dochází k výraznému snížení exprese CART mRNA v ARC (Kristensen et al., 1998). Periferní podání leptinu obézním myším vede ke zvýšení hladiny CART mRNA v ARC. Toto naznačuje, že exprese CART mRNA v ARC je závislá na leptinové signalizaci, neboť porušená leptinová signalizace vede ke snížené expresi CART (Kristensen et al., 1998).

Peptid CART se nachází v ARC v neuronech produkujících rovněž POMC mRNA, ze které vzniká produkt α -MSH, který inhibuje příjem potravy a blokuje orexigenní účinek NPY po ICV podání (Elias et al., 1998).

Neurony ARC obsahující peptidy CART byly také lokalizovány u nervových zakončení neuronů NPY. Toto zjištění naznačuje vzájemný vztah peptidů CART a NPY. Rovněž bylo zjištěno, že ICV podání peptidu CART blokuje zvýšení příjmu potravy po podání orexigenního NPY (Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1998). Nervová zakončení NPY neuronů rovněž obklopují těla neuronů obsahující peptid CART v PVN a po ICV podání do PVN dochází ke snížení příjmu potravy (Lambert et al., 1998).

Dlouhodobé ICV podávání peptidu CART po dobu 7 a 10 dní vedlo ke snížení příjmu potravy a hmotnosti u štěhlých i obézních fa/fa potkanů (Larsen et al., 2000). Po ICV podání peptidu CART potkanům došlo k vedlejším účinkům, jako je snížení pohybové aktivity a narušení koordinace pohybů (ataxie) (Larsen et al., 2000). Podání peptidu CART 55-102 nejen do ARC, ale i do ACC rovněž snížilo příjem potravy (Yang et al., 2005).

V naší laboratoři byl rovněž prokázán anorexigenní účinek peptidu CART 61-102, stejně jako di-jodovaného peptidu CART 61-102, který vykázal vysokou fyziologickou účinnost (Maletínská et al., 2007). Po společném podání peptidu CART s anorexigenním CCK, produkovaném v GIT, došlo k synergistickému účinku na snížení příjmu potravy (Maletínská et al., 2008). Podáním obou peptidů dochází také k stimulaci neuronů v ARC, PVN a DMH hypothalamu, dále pak v NTS mozkového kmene (Maletínská et al., 2008; Pirnik et al., 2010).

2.4.1.7 Další role v organismu

Peptid CART je zmiňován ve spojitosti s drogovou závislostí na kokainu či amfetaminu. U osob, které zemřely v důsledku předávkování kokainem, byla zvýšená hladina CART mRNA (Tang et al., 2003). Podání různých psychostimulantů (kokainu, amfetaminu, metamfetaminu či etanolu) vede k aktivaci neuronů obsahující peptid CART v ACC. Různé studie naznačují, že peptid CART hraje roli v mesolimbickém dopaminovém systému (Salinas et al., 2006). CART moduluje dopaminovou aktivitu přímo stimulací dopaminergních neuronů či nepřímo inhibicí vylučování GABA (Dallvechia-Adams et al., 2002).

Peptid CART ovlivňuje hypotalamo-hypofyzární osu (HPA) (Couceyro et al., 1997; Smith et al., 1997), která má úlohu při stresové reakci a dalších fyziologických procesech, jako je trávení či hospodaření organismu s energií. Z hypothalamu je vylučován CRH, který

stimuluje sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH). Ten následně stimuluje tvorbu kortizolu a kortikosteronu (Keller-Wood, 2015). Tím, že peptid CART stimuluje sekreci CRH, ACTH i kortizolu, je naznačena jeho role ve stresové odpovědi. ICV podání peptidu CART 55-102 vede ke zvýšení hladiny ACTH a kortikosteronu (Smith et al., 2004; Stanley et al., 2001). Při dlouhodobém vystavení chladu dochází u potkanů ke zvýšené expresi CART mRNA v ARC, což rovněž naznačuje roli peptidu CART v regulaci odpovědi organismu na stres a zároveň v energetickém výdeji a termogenezi (Kong et al., 2003). V Porsoltově plovacím testu, který akutně vyvolává stres, dochází k signifikantnímu zvýšení hladiny peptidu CART v PVN u samic potkanů, nikoliv však v ARC (Gozen et al., 2007).

Peptid CART rovněž ovlivňuje hypothalamo-hypofýzo-tyroidální osu (HPT) (Fekete et al., 2000) podílející se na regulaci metabolismu. Neuronů produkujících α -MSH/CART i AgRP/NPY v hypothalamu vysílají synapse do neuronů produkujících thyreoliberin (TRH). TRH reprezentuje další regulátor energetického výdeje a termoregulace (Lau et al., 2016). α -MSH/CART produkci TRH stimuluje, zatímco AgRP/NPY syntézu inhibují. Během hladovění dochází ke snížení stimulační dráhy a zvýšení inhibiční dráhy a dochází ke snížení produkce TRH. Peptid CART inhibuje stimulační účinek TRH a společná sekrece TRH a peptidu CART do hypofyzárního oběhu může naznačovat podíl peptidu CART na účinku TRH v hypofýze (Fekete and Lechan, 2006).

2.4.1.8 Fragменты a analogy peptidu CART

Peptid CART se přirozeně vyskytuje ve dvou formách, 55-102 a 62-102. Thim a kol. rekombinantně připravili a izolovali z kvasinek peptidy CART 54-102, CART 55-102, CART 61-102 a 62-102, které se liší N-koncovou sekvencí a mají podobnou biologickou aktivitu *in vivo* a *in vitro* (Thim et al., 1998).

V CNS se přirozeně vyskytují peptidy CART 55-102 a 62-102. V periférii jsou však produkovány i delší formy peptidu CART. Z potkaních nadledvin byly izolovány delší formy, peptid CART 1-89 a CART 10-89 (Dylag et al., 2006; Thim et al., 1999). N-koncové fragmenty peptidu CART 61-102, CART 1-26 a CART 1-27 nebyly účinné *in vitro* ani *in vivo* a slouží jako negativní kontrola aktivity peptidu CART 55-102. N-koncové fragmenty CART 55-76 a CART 62-76 byly po ICV podání schopny snižovat příjem potravy u potkanů a fragment CART 62-76 byl účinnější než CART 55-76 (Lambert et al., 1998). Syntetizovaný c-koncový fragment CART 85-102 interagoval s opioidním systémem a byl schopen snížit lokomoci navozenou podáním morfinu (Dylag et al., 2006). V naší laboratoři byly syntetizovány fragmenty odvozené ze studie Lamberta a kol. resp. Dylaga a kol., kdy

se žádný z fragmentů nevázal na buněčnou linii PC12 a rovněž nedošlo ke snížení příjmu potravy u hladových myší. Rozpor mezi dříve publikovanými a našimi výsledky může být způsoben různými druhy použitých zvířat (potkani resp. myši), experimentálním uspořádáním experimentu (volně žeroucí resp. hladová zvířata) či podáním do různých oblastí mozku.

V naší laboratoři byly syntetizovány různě dlouhé fragmenty peptidu CART 61-102, které byly následně testovány pomocí vazebných experimentů na buněčné linii PC12 a *in vivo* na myších. Bylo zjištěno, že pro zachování vysoké afinity k buňkám PC12 a fyziologické aktivity jsou nezbytné tři disulfidové můstky. Pouze u analogů CART 74-86 a CART 62-86, obsahujících disulfidové můstky v pozici 74-86 a 68-86, byla prokázána velmi slabá vazba k PC12 buňkám, řádově třikrát nižší než CART 61-102 a tyto analogy nesnižovaly příjem potravy po ICV podání (Maixnerová et al., 2007).

2.4.2 PrRP (prolactin-releasing peptide)

2.4.2.1 Objev a výskyt

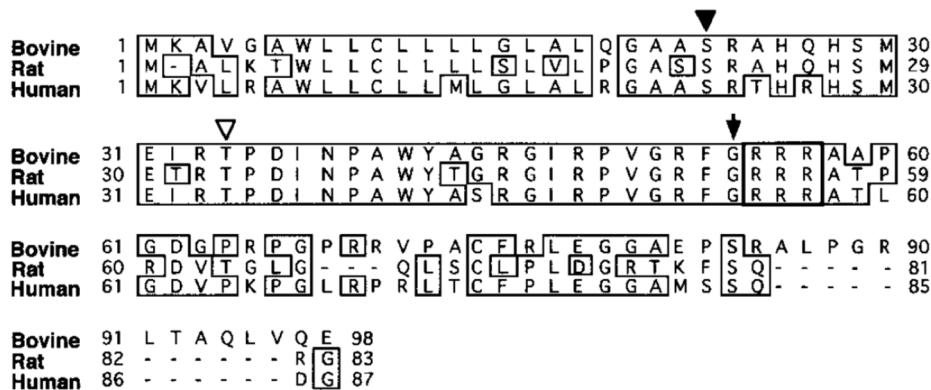
Peptid uvolňující prolaktin (PrRP) byl objeven Hinumou a kol. v roce 1998 v kravském hypothalamu pomocí reverzní transkripce PCR tzv. metodou „obrácené farmakologie“ jako endogenní ligand sirotčího receptoru spřáhujícího G protein 10 (GPR10, jinak též hGR3 či potkaní UHR-1) (Hinuma et al., 1998; Marchese et al., 1995; Welch et al., 1995).

PrRP se nachází především v mozku a jen nízkou koncentrací můžeme nalézt v plasmě, dřeni nadledvin, slinivce, varlatech či placentě (Fujiwara et al., 2005; Onaka et al., 2010; Yasui et al., 2001). V mozku se neurony exprimující PrRP mRNA nachází v prodloužené míše, v hypothalamu především ve VMN a DMN a v zadním mozku v NTS (Fukusumi et al., 2006).

GPR10 byl původně izolován z hypothalamu ze suprachiasmatického jádra (Hinuma et al., 1998) a je složen z 369 aminokyselin (Marchese et al., 1995). GPR10 mRNA se hojně nachází v celém mozku, především pak v hypothalamu v PVN, DMH a periventrikulárním jádře, v thalamu ve ventrolaterálním retikulárním jádře (VLM), dále v mozkovém kmeni v *area postrema* (AP) a v NTS a také v hypofýze. V periférii byly receptory nalezeny ve dřeni nadledvin a žaludku (Fujii et al., 1999; Roland et al., 1999).

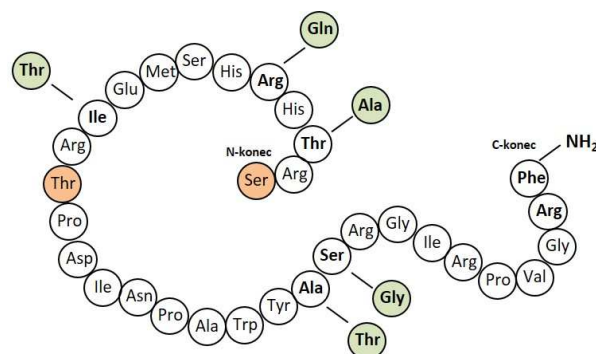
2.4.2.2 Struktura PrRP

PrRP patří do rodiny RF-amidových peptidů, která obsahuje C-koncovou aminokyselinovou sekvenci Arg-Phe-NH₂ (Hinuma et al., 1998; Quillet et al., 2016; Takayanagi and Onaka, 2010). PrRP byl identifikován v různých živočišných druzích (ryby, ptáci, savci) a prepropeptid se u různých živočišných druhů liší délkou řetězce. U hovězího dobytka obsahuje prepropeptid 98 aminokyselin, u lidí 87 a u potkanů 83 aminokyselin (obrázek 7) (Hinuma et al., 1998). Prepropeptid obsahuje dvě štěpná místa, ze kterých posttranslačními úpravami vznikají dva peptidy obsahující 31 nebo 20 aminokyselin, PrRP31 a PrRP20 (obrázek 8), které mají identickou C-koncovou sekvenci. Aminokyselinová struktura PrRP20 je vysoce konzervovaná. U savců je potkaní a myší PrRP identický a vykazuje vysokou homologii s hovězím a lidským PrRP.



Obrázek 7: Sekvence hovězího, potkaního a lidského prepropeptidu PrRP

Sekvence jsou odvozené z cDNA. Plný černý trojúhelník označuje N-konec PrRP31 a prázdný trojúhelník označuje N-konec PrRP20. Šipka označuje C-konec a glycin, který je amidovaný (Hinuma et al., 1998).



Obrázek 8: Struktura lidského PrRP31 a PrRP20

Struktura krátké a dlouhé formy lidského PrRP. Zvýrazněným serinem (Ser) začíná PrRP31 a zvýrazněný threonin (Thr) označuje místo, kde začíná krátká forma PrRP20. Zeleně zvýrazněné aminokyseliny označují místa, kde jsou změny v sekvenci potkaního PrRP oproti lidskému PrRP.

2.4.2.3 Afinita PrRP k receptoru pro neuropeptid FF 2 (NPFF2)

Jak již bylo výše zmíněno, PrRP patří do skupiny RF-amidových peptidů. RF-amidové peptidy a jejich receptory mají u savců vysokou evoluční podobnost (Hinuma et al., 2000). Bylo zjištěno, že PrRP se váže nejen na svůj receptor GPR10, ale i na lidský NPFF2 receptor, a to s afinitou jen o řád nižší než má přirozený ligand NPFF (Engstrom et al., 2003; Maletinska et al., 2013). NPFF má naopak ke GPR10 receptoru velmi nízkou afinitu ($K_i > 30 \mu\text{M}$). GPR10 je vysoce selektivní receptor a jeho jediný dosud známý vysoce afinitní ligand je PrRP (Langmead et al., 2000). V naší laboratoři byla prokázána vysoká vazebná afinita PrRP k hypofyzárním nádorovým buněčným liniím AtT20, GH3 a RC-4B/C, které přirozeně obsahují receptor GPR10 a NPFF2 (Maletinska et al., 2011b).

2.4.2.4 Homologie receptoru GPR10 s Y receptory

Receptor GPR10 patří do rozsáhlé rodiny GPCR a s Y receptory se vyvinuly ze společného předka. Jejich homologie je 31% a 46% v transmembránových doménách (Marchese et al., 1995). Byla prokázána pouze velmi slabá afinita NPY ke GPR10 s hodnotou $K_i > 30 \mu\text{M}$ (Langmead et al., 2000).

2.4.2.5 Fyziologická role

V počátku byl PrRP považován za faktor, který spouští sekreci prolaktinu *in vitro* u buněčné linie RC-4B/C a v buňkách adenohipofýzy (Hinuma et al., 1998). V testech *in vitro* bylo na hypofyzárních buňkách změřeno, že PrRP vyvolává stejně silný účinek na sekreci prolaktinu jako TRH, jehož působením dochází k sekreci prolaktinu (Spuch et al., 2007). V *in vivo* testech byla však ke stimulaci sekrece prolaktinu u potkaních samců potřebná vysoká dávka PrRP31. U potkaních samic byla potřebná dávka nižší, v závislosti na cyklu (Matsumoto et al., 1999). V imunocytochemických studiích bylo zjištěno, že PrRP se vyskytuje především v oblastech hypothalamu, mozkového kmene a dalších, ale studie neprokázaly přítomnost PrRP v *eminetia medialis*, oblasti důležité pro uvolňování běžných hypofyzotropních hormonů (Maruyama et al., 1999; Minami et al., 1999; Samson et al., 2000). Studie s ICV podáním PrRP naznačují, že účinek na sekreci prolaktinu není tak výrazný jako jiné možné fyziologické účinky (Matsumoto et al., 2000) a později byl tento účinek zpochybněn (Fukusumi et al., 2006).

PrRP ovlivňuje rovněž HPA tím, že po podání dochází ke stimulaci neuronů v hypothalamu obsahujících CRH a oxytocin. Po ICV podání PrRP dochází u potkanů ke zvýšení koncentrace ACTH a kortikosteronu v plasmě (Samson et al., 2003). Při podání

antiséra proti CRH dochází k zablokování zvýšení hladiny CRH pomocí PrRP. Anorexigenní účinek PrRP je pak oslaben po podání antagonistů receptorů pro tyto hormony (Bechtold and Luckman, 2006).

Bylo zjištěno, že PrRP má také úlohu v kardiovaskulárním systému, kdy po ICV podání zvyšuje krevní tlak u potkanů (Samson et al., 2000).

2.4.2.6 Vliv na příjem potravy

Další studie prokázaly účinek PrRP na snižování příjmu potravy, zvýšení energetického výdeje a zároveň zvýšení tělesné teploty u myší a potkanů po ICV podání či roli ve stresové reakci (Ellacott et al., 2002; Fukusumi et al., 2006; Lawrence et al., 2000; Lawrence et al., 2002). Lawrence a kol. navrhli, že PrRP hraje roli jako regulátor příjmu potravy a exprese PrRP mRNA je snížena během negativní energetické rovnováhy, podobně jako je tomu u POMC/CART (Lawrence et al., 2000). Centrální podání PrRP u hlodavců snižuje příjem potravy a tělesnou hmotnost (Lawrence et al., 2002; Maixnerova et al., 2011). Rovněž dochází k aktivaci c-Fos, markeru neurální aktivity, v oblastech výskytu PrRP či jeho receptorů (Lawrence et al., 2002).

Po opakovaném třídním podání PrRP potkanům byl snížen příjem potravy a hmotnost a nedošlo k ovlivnění chování (Vergoni et al., 2002). Ellacott a kol. zjistili, že při opakovaném centrálním podání PrRP dochází k toleranci a zvířata přestanou reagovat na jeho anorexigenní účinek (Ellacott et al., 2003). To naznačuje, že PrRP ovlivňuje energetickou homeostázu na krátkodobé úrovni, stejně jako CCK, orexin-A či MCH.

U různých živočišných druhů má však PrRP na příjem potravy různý účinek. U potkanů a myší dochází po ICV podání PrRP ke snížení příjmu potravy a zvýšení tělesné teploty, avšak u kuřat vyvolává PrRP opačný efekt (Tachibana et al., 2004).

Po ICV podání PrRP a leptinu dochází k aditivnímu efektu na snížení příjmu potravy a tělesnou hmotnost (Ellacott et al., 2002), což naznačuje interakci PrRP a leptinu v regulaci metabolismu a příjmu potravy. Neurony exprimující PrRP se nacházejí v oblastech s leptinovými receptory, například DMH, NTS či VLM (Ellacott et al., 2002). Expresa PrRP je snížena během hladovění či laktace, kdy dochází k negativní energetické rovnováze a hladiny leptinu v plasmě jsou nízké (Lawrence et al., 2000).

V krátkodobé regulaci energetické rovnováhy bylo studováno vzájemné působení PrRP s CCK, který hraje roli v ukončení příjmu potravy a snížení porce jídla (Onaka et al., 2010). Příjem potravy nebo podání CCK aktivuje v NTS neurony obsahující PrRP. U myší s deficientním GPR10 či PrRP je snížen anorexigenní účinek CCK, což naznačuje, že

signalizace PrRP může být důležitá pro přenos periferních signálů, jako je právě CCK, do mozku (Bechtold and Luckman, 2006; Lawrence et al., 2002).

2.4.2.7 Myši s vyřazeným genem pro GPR10 a PrRP

Myši s vyřazeným genem pro GPR10 (GPR10^{-/-}) na standardní dietě zkonsumují oproti kontrolám více potravy a dochází u nich v dospělosti (od 16. týdne u samců a od 26. týdne u samic) k rozvoji obezity. GPR10^{-/-} myši mají zvýšenou hladinu leptinu a insulinu a dochází u nich ke snížení glukosové tolerance. Zvýšená hladina leptinu je v korelaci se zvýšenou akumulací tělesného tuku oproti kontrolní skupině. U GPR10^{-/-} myší rovněž nedochází ke kompenzaci zvýšeným energetickým výdejem. V porovnání GPR10^{-/-} myší se skupinou myší krmených vysokotukovou dietou došlo ke stejnému rozvoji obezity a insulinové rezistence (Gu et al., 2004). U myší s vyřazeným genem pro GPR10 je rovněž zvýšená hladina cholesterolu, LDL a HDL a zvířata trpí steatózou jater (Bjursell et al., 2007).

U myší s deficientním PrRP dochází v dospělosti k obezitě v důsledku zvýšení příjmu potravy a ke snížení odpovědi na působení anorexigenních signálů CCK a leptinu. Navíc u nich dochází k rozvoji insulinové rezistence a porušené glukosové toleranci. U myší s deficientním PrRP nedochází ke zvýšené spotřebě O₂, zvýšené tělesné teplotě po chladové expozici ani ke zvýšení hladiny mRNA proteinu termogeninu (UCP-1) v hnědé tukové tkáni. Tato data naznačují, že nárůst hmotnosti je způsoben spíše hyperfagií, než sníženým energetickým výdejem (Takayanagi et al., 2008). Myši s deficientním PrRP mají jiný fenotyp než myši s vyřazeným genem pro GPR10.

2.4.2.8 Analogy PrRP

PrRP má dvě přirozené formy, PrRP20 a PrRP31, které vznikají z jediné prekursorové molekuly a mají společnou C-terminální sekvenci obsahující dvacet aminokyselin (Hinuma et al., 1998). Nejkratší aktivní agonista, heptapeptid PrRP25-31, má oproti PrRP31 nižší vazebnou afinitu na GPR10 (Roland et al., 1999). Boyle a kol. provedli strukturně-aktivitní studii *in vitro* na analozích PrRP19-31 (Boyle et al., 2005). Bylo zjištěno, že C-koncová sekvence Ile²⁵-Arg²⁶-Pro²⁷-Val²⁸-Gly²⁹-Arg³⁰-Phe³¹-NH₂ je velmi důležitá pro biologickou aktivitu. Některé aminokyseliny v tomto úseku mohou být modifikovány, ale pro zachování *in vitro* biologické aktivity je naprosto nezbytný Arg³⁰. Bez ztráty biologické aktivity může být dále provedena modifikace v aromatickém kruhu Phe³¹ (Boyle et al., 2005; Maletinska et al., 2011b). V naší předchozí studii (Maletinska et al., 2011b) byly syntetizovány analogy PrRP20, u kterých došlo k nahrazení C-koncového Phe³¹

za jeho deriváty. Analogy [PheCl₂³¹] PrRP20, [PheF₅³¹] PrRP20 nebo [Tyr³¹] PrRP20 se vážaly na buněčnou linii RC-4B/C se stejnou afinitou jako přirozený PrRP20, což naznačuje zachování biologické aktivity a vysoké afinity ke GPR10 receptoru. Tyto analogy byly rovněž aktivní *in vivo* a prokázaly silný a dlouhodobý anorexigenní účinek po ICV podání hladovým myším (Maletinska et al., 2011b).

2.4.2.9 Lipidizace peptidů

V současnosti jsou peptidy považovány za novou generaci specifických biologicky aktivních látek, důležitých v regulaci fyziologických procesů, která nabízí velký potenciál v léčbě různých onemocnění. Ačkoliv mají peptidy terapeutický potenciál, překážkou v jejich využití je nedostatečná dostupnost a nízká stabilita za fyziologických podmínek. Další překážkou je rovněž i transport peptidů přes BBB do mozku po periferním podání pro jejich centrální účinek (Malavolta and Cabral, 2011). Modifikace peptidů je proto důležitou strategií pro zlepšení dostupnosti či stability.

Anorexigenní neuropeptidy regulující příjem potravy mohou být nástrojem v léčbě obezity (Dodd and Luckman, 2013; Maniscalco and Rinaman, 2013). Tyto peptidy jsou vylučovány v mozku, kde rovněž i působí a jejich účinek po periferním podání je omezen právě nemožností prostoupit BBB.

Lipidizace, připojení řetězce mastné kyseliny esterovou či amidovou vazbou, představuje jednu z variant modifikace peptidů. Lipidizace peptidů zvyšuje stabilitu a poločas rozpadu látky, a také pravděpodobně umožňuje průchod přes BBB z periferie do mozku (Bellmann-Sickert and Beck-Sickingler, 2010; Brasnjevic et al., 2009; Malavolta and Cabral, 2011). Přidání myristové či palmitové kyseliny přes amidovou vazbu na Lys bylo provedeno u analogu insulinu detemiru (Havelund et al., 2004) či u analogu GLP-1 liraglutidu (Gault et al., 2011). Oba tyto lipidované peptidy vykazovaly vysokou stabilitu a pomalejší degradaci v krvi. PrRP představuje vhodnou látku pro lipidizaci, neboť má lineární strukturu a žádné postranní řetězce.

2.4.3 Další peptidy ovlivňující příjem potravy působící přes receptory spřažené s G-proteinem (GPCR)

Mnoho receptorů, na které se váže široké spektrum peptidů, patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem (GPCR). Tato rozsáhlá rodina ve své struktuře vykazuje podobné vlastnosti, jako je například přítomnost sedmi transmembránových alfa-helixových domén a zachování vysokého počtu aminokyselinových zbytků (Marchese et al., 1995).

Počet různých GPCR se během evoluce výrazně zvýšil u obratlovců, a tento efekt může být způsoben jejich úlohou v různých specializovaných fyziologických funkcích, jako je regulace příjmu potravy, vliv na krevní tlak, vnímání bolesti, atd. (Lagerstrom et al., 2005).

2.4.3.1 Neuropeptid Y (NPY)

NPY je silný orexigenní peptid složený z 36 aminokyselin, produkováný v ARC hypothalamu (Zhang et al., 2011). Podání NPY do PVN silně stimuluje příjem potravy a snižuje energetický výdej. Dlouhodobé centrální podávání tohoto neuropeptidu způsobuje nárůst tělesné hmotnosti a rozvoj obezity (Schwartz et al., 2000). Je evolučně vysoce konzervovaný a má vysokou homologii s anorexigenními peptidy PYY (70%) a pankreatickým peptidem (PP) (50%).

Účinek NPY, PYY a PP je zprostředkován více Y receptory – Y1, Y2, Y4, Y5 a Y6 (Zhang et al., 2011). Všechny tyto receptory patří do rodiny GPCR a mají zachovanou vzájemnou homologii. Studie ukázaly, že podávání NPY stimuluje příjem potravy aktivací Y1 a Y5 receptorů v hypothalamu. Selektivní antagonisté NPY zaměřené zejména na Y5 receptory, inhibují příjem potravy a snižují tělesnou hmotnost u obézních jedinců. Y5 receptor je vysoce homologní s Y1 a vykazuje s ním 35% podobnost (Zhang et al., 2011). Aktivací Y2 receptorů dochází k navození sytosti a přes tyto receptory působí zejména PYY, který snižuje příjem potravy. Přes Y4 receptor působí zejména PP, který má po periferním podání rovněž anorexigenní účinek.

2.4.3.2 Neuropeptid FF (NPFF)

Neuropeptid FF (NPFF), patří do rodiny RF-amidových peptidů, obsahující C-koncovou sekvenci Arg-Phe-NH₂ (Quillet et al., 2016). Tato sekvence je velmi důležitá pro vazbu k receptorům (Elshourbagy et al., 2000). Tento krátký oktapeptid, FLFQPQRF-NH₂, se nachází v mozku, v oblastech, kde se nacházejí endogenní opioidy, ale také v hypothalamu a míše (Murase et al., 1996; Panula et al., 1996).

NPFF hraje důležitou roli jako modulátor opioidní analgesie nebo při vnímání bolesti, ale má v organismu více funkcí, ovlivňuje také krevní tlak či příjem potravy (Panula et al., 1996). NPFF signalizuje přes dva receptory NPFF1 a NPFF2 (Elshourbagy et al., 2000).

2.5 Zvířecí modely obezity

Při výzkumu regulace příjmu potravy, možných faktorů vzniku obezity a dalších parametrů jsou velmi cenné zvířecí modely. Zvířecí modely obezity mají společné či podobné znaky jako obézní lidé, proto na nich lze úspěšně testovat i nové látky, jako potenciální léčiva obezity, včetně studia mechanismů jejich účinku. U lidí dochází k obezitě vlivem genetických poruch velmi vzácně a rozvoj obezity je u lidské populace způsoben především příjmem vysokoenergetické potravy a nízkým výdejem energie. U zvířat lze obezitu vyvolat mutacemi či genetickou manipulací v různých genech, vystavit jedince obezogenému prostředí ve formě vysokotukové diety nebo i chirurgickým zásahem, kdy se vytvoří léze v mozku v centrech spojených s regulací příjmu potravy (Lutz and Woods, 2012).

2.5.1 Geneticky modifikované obézní modely

Nejčastějším genetickým modelem obezity jsou myši s deficientním leptinem – ob/ob myši, s deficientní signalizací leptinového receptoru – db/db myši, potkani s touto mutací jsou tzv. Zuckerovi (fa/fa) nebo tzv. Koletského potkani (Lutz and Woods, 2012).

Ob/ob myši, obézní myši (obrázek 9) mají mutaci v *ob* genu, kdy nedochází k sekreci aktivního leptinu, neboť je jeho syntéza předčasně ukončena. Leptin je syntetizován v adipocytech a jeho sekrece je závislá přímo úměrně na hmotnosti tukové tkáně. Leptinovou deficiencí trpí také velmi vzácně lidská populace (O'Rahilly, 2009). U ob/ob myší vzniká v raném věku obezita, trpí hyperfagií a sníženým energetickým výdejem. Myši mají insulinovou rezistenci, hyperglykémii, hyperinsulinemii a hypothyreosu (Lutz and Woods, 2012). Ob/ob myši jsou neplodné. Tato forma obezity může být léčena dodáním exogenního leptinu (Lutz and Woods, 2012; O'Brien et al., 2014).



Obrázek 9: Ob/ob myš se zdravým jedincem

Vpravo ob/ob myš s leptinovou deficiencí. Vlevo je zdravý štíhlý jedinec (Leibel, 2008).

Db/db myši, diabetické myši, jsou fenotypově velmi podobné ob/ob myším, avšak tyto mají mutaci v leptinovém receptoru. Myši rovněž trpí morbidní obezitou, insulinovou rezistencí a diabetem 2. typu (O'Brien et al., 2014).

Analogicky k db/db myším existují tzv. Zuckerovi, fa/fa („fatty“) a tzv. Koletského obézní spontánně hypertenzní potkani (SHROB), kteří mají rovněž mutace v leptinovém receptoru a je u nich vyvinuta obezita. Potkani vyvíjejí stejný fenotyp – hyperfagii, mají snížený energetický výdej, či sníženou plodnost. Koletského potkani, zkrřížení ze samice spontánně hypertenzního potkana (SHR) a samce kmene Sprague-Dawley (Ernsberger et al., 1999) jsou navíc hypertenzní a mají silnější insulinovou rezistenci oproti Zuckerovým potkanům (Kava et al., 1990; Lutz and Woods, 2012).

2.5.2 Modely dietou indukované obezity

Dietou indukované obézní (DIO, diet-induced obesity) myši nebo potkani mají mnoho podobností s obezitou u lidí a reprezentují vhodnější srovnání oproti zvířecím modelům s genetickou mutací (Van Heek et al., 1997). Myši krmené vysokotukovou (HF, high fat) dietou, obsahující 45 - 60% kcal z tuku po několika týdnech vyvíjí dietou indukovanou obezitu (Balland and Cowley, 2015). Kromě komerčně vyráběných diet se používají také vysokotukové diety s individuálním složením. Příkladem takovéto HF diety je dieta ze studie Kopeckého a kol. (Kopecky et al., 1996) obsahující 13% kcal bílkovin, 60% kcal tuku a 27% kcal sacharidů. Oproti standardní dietě, obsahující 25% kcal bílkovin, 9% tuku a 66% sacharidů s energetickou hodnotou 3,4 kcal/g, má tato HF dieta energetickou hodnotou 5,3 kcal/g. Je složená z 40% standardní diety, 34% sušeného mléka, 25%

slunečnicového oleje a 1% kukuřičného škrobu (Kopecky et al., 1996; Surwit et al., 1988). U zvířat, která jsou vystavena této dietě, dochází k hyperfagii a k častějšímu přijímání potravy. To následně vede ke zvýšení hmotnosti, zvýšení tělesného tuku a hladiny leptinu, hyperinsulinemii a k narušení glukózové tolerance (Balland and Cowley, 2015; O'Brien et al., 2014; Van Heek et al., 1997). Jak již bylo výše zmíněno, HF dieta podávána zvířatům obsahuje 32 – 60% tuku, u lidí je ovšem 60% tuku obsažených ve stravě velmi extrémní hodnotou. Těto extrémně vysokotukové diety se využívá u zvířat především pro rychlejší a výraznější nárůst tělesné hmotnosti.

Obdobou HF diety je tzv. „cafeteria“ dieta, vysokoenergetická strava, která imituje stravu západní lidské populace a je složená z vysokého obsahu tuků a jednoduchých sacharidů (sacharosa). Potkani krmení touto dietou jsou výrazně hyperfagičtí a velmi obézní. Dochází u nich k rozvoji hyperinsulinemie, hyperglykemie a steatóze jater (Johnson et al., 2016; Sampey et al., 2011).

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

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

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

Ve druhé části má tato práce specifikovat biologickou aktivitu lipidovaných analogů peptidu PrRP vzhledem k promiskuitní povaze přirozeného PrRP, který se s podobnou afinitou váže ke dvěma receptorům: GPR10 a NPPF2. Vzhledem k podobnosti receptoru GPR10 a Y5, receptoru pro NPY, sledovat afinitu přirozeného PrRP i jeho lipidovaných analogů k tomuto receptoru.

4. Srovnat afinitu lipidovaných analogů PrRP a přirozeného peptidu PrRP k buňkám exprimujícím spontánně GPR10 i NPPF2 nebo k buňkám s transfekovaným GPR10 či NPPF2 receptorem a dále testovat aktivaci GPR10 receptoru.
5. Otestovat afinitu přirozeného PrRP a jeho vybraných lipidovaných analogů PrRP na buňkách s transfekovaným Y5 receptorem.
6. Lipidované analogy PrRP s modifikovanými C-koncovými aminokyselinami otestovat v krátkodobém účinku na příjem potravy.
7. Na základě stanovení anorexigenních vlastností lipidovaných analogů PrRP po akutním podání určit dlouhodobý účinek těchto analogů na obezitu a s ní spojené metabolické odchylky u myší krmených vysokotukovou dietou.

4. MATERIÁL

Buněčné linie a membrány	
PC12	ATCC, Manassas, Virginia, USA
RC-4B/C	ATCC, Manassas, Virginia, USA
CHO-K1 s transfekovaným GPR10	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
K1732	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
U2OS s transfekovaným Y5	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
K1782	
Buněčné membrány z CHO-K1 s transfekovaným NPFF2	

Chemikálie a materiál	
Aminokyseliny	Iris Biotech, Marktredwitz, Německo
CART 61-102	Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dánsko
DMEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Fetální hovězí sérum (FBS)	Biochrom AG, Berlín, Německo
Filtry GF/C	Whatman, Maidstone, Velká Británie
Fyziologický roztok	Infusia, Hořátev, ČR
Geneticin (G418)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
L-glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Hovězí sérový albumin (BSA)	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Hygromycin B	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
iodo-GEN™	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
Koňské sérum (HS)	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
Kozí sérum	VectorLab, Burlingame, CA, USA

McCoy's 5A medium	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
Na ¹²⁵ I	Izotop, Budapešť, Maďarsko
PACAP38	Polypeptide Laboratories, Strasbourg, Francie
Fosfátový pufr (PBS)	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
Penicilin/streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Permout zalévací médium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PVDF-Immobilon membrána	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Standard Dual color	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Standard All blue	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
Triton X-100	Koch-Light Lab. Ltd., Colnbrook, Berks, Anglie
Zeocin	Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA
24-jamkové destičky	Nunc, Roskilde, Dánsko
96-jamkové destičky	Nunclon, Schoeller Pharma, Praha, Česká republika

ostatní materiál a chemikálie v p.a. kvalitě použité k vypracování disertační práce z:

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Fluka, Buchs, Švýcarsko

PENTA, Chrudim, ČR

LACHEMA, Brno, ČR

Kity

RIA kit pro stanovení insulinu

Linco Research, St. Charles, MI, USA

ELISA kit pro stanovení leptinu

Merck Millipore, Darmstadt, Germany

Kit pro stanovení triglyceridů

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Primární protilátky**c-Fos #2250****c-Jun #9165****Fosfo-CREB #9196****CREB #9104****Fosfo-MAPK (Erk1/2) #9106****MAPK (Erk1/2) #9107****Fosfo-p38 MAPK #4511****p-38 MAPK #9212****Fosfo-SAPK/JNK #4668****SAPK/JNK #9258**

všechny primární protilátky
Cell Signalling Technology, Danvers, MA,
USA

Sekundární protilátky**Proti myší peroxidázový konjugát**

#7076

Proti králičí peroxidázový konjugát

#7074

**Biotinylovaná kozí protilátka proti
králičí IgG**

Cell Signalling Technology, Danvers, MA,
USA

VectorStain Elite ABC, Vector Lab,
Burlingame, CA, USA

Přístroje a programy

ABI PRISM 7500

Biohazardní box EuroFlow EF/S4

Brandelův přístroj

CCD kamera Chemi Doc™

CO₂ inkubátor MCO 18AIC

Digitální kamera AxioCam ERc 5s

Gamma čítač Wizard 1470

Glukometr Glucocard

Hmotnostní spektrometr Q-TOF micro

Kapalinový chromatograf

Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Clean Air, Woerden, Nizozemí

Biochemical and Development laboratories,

Gaithersburg, MD, USA

Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Sanyo, Osaka, Japonsko

Carl Zeiss, Oberkochen, Německo

Thermo Fisher Scientific Inc. Brand,

Waltham, MA, USA

Arkray, Kyoto, Japonsko

Waters, Milford, MA, USA

Waters, Milford, MA, USA

Kryostat CM1950

Mini-Protean 3

Software AxioVision 4.7.

Software GraphPad Prism 5

Software Image Lab™

Software Statistica 6.0

Spektrometr Infinite M1000

Světelný mikroskop Axio Scope.A1

Leica Microsystem GmbH, Německo

Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Carl Zeiss, Oberkochen, Německo

GraphPad Software, Inc., San Diego, CA,

USA

Bio-Rad, Hercules, CA, USA

StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA

Tecan Group Ltd. Männedorf, Švýcarsko

Carl Zeiss, Oberkochen, Německo

5. METODY

5.1 Syntéza peptidů a jodace

Potkaní peptid CART 61-102 byl obdržen jako dar od firmy Novo Nordisk. Lidský PYY a prasečí NPY byly zakoupeny u firmy PolyPeptide group (Limhamn, Švédsko). Sekvence jsou uvedeny v tabulce 1.

Většina peptidů (tabulka 1) byla syntetizována na ÚOCHB v laboratoři peptidové syntézy Ing. Blechovou. Syntéza analogu peptidu CART, Nle⁶⁷ CART 61-102, analogu CART se dvěma S-S můstky [Ala^{68,86}] CART 61-102, stabilního analogu NPFF – 1DMe, potkaního a lidského PrRP31 a potkaního PrRP20 a analogů PrRP probíhala dle (Maletinska et al., 2012; Maletinska et al., 2013). Lipidizace analogů PrRP byla prováděna jako poslední krok (Maletinska et al., 2012). Peptidy byly dále přečištěny a identifikovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a hmotnostní spektrometrie Q-TOF micro dle (Maletinska et al., 2012).

Peptidy byly značeny pomocí Na¹²⁵I a jodace peptidu CART 61-102 byla prováděna na Tyr⁶², lidského a potkaního PrRP31 na Tyr²⁰, 1DMe na D-Tyr¹ a lidského PYY na Tyr¹ pomocí činidla IODO-GENTM dle pokynů výrobce (Maletinska et al., 2012). Specifická aktivita všech peptidů značených ¹²⁵I byla přibližně 2000 Ci/mmol.

Tabulka 1: Sekvence peptidů

Název	Sekvence
CART 61-102	<p>61 68 74 86 88 94 101</p> <p>KYGQVPMCDAGEQCAVRKGGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL</p>
Nle⁶⁷ CART 61-102	<p>61 67 68 74 86 88 94 101</p> <p>KYGQVP Nle CDAGEQCAVRKGGARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL</p>
[Ala^{68,86}] CART 61-102	<p>61 68 74 86 88 94 101</p> <p>KYGQVPMADAGEQCAVRKGGARIGKLADCPRGTSCNSFLLKCL</p>
1 DMe	DYL(N-Me)FQPQRF-NH ₂
lidský PYY	YPIKPEAPGEDASPEELNRYASYSLRHLYLNLVTRQRY-NH ₂
vepřový NPY	YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYNLITRQRY-NH ₂
lidský hPrRP31	S RTHRHS M EIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH ₂
potkaní rPrRP31	S RAHQHS M ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
Nle-PrRP31	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
myr-PrRP31	(N-my ^r)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
palm-PrRP31	(N-palm)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
K¹¹palm-hPrRP31	SRTHRHSMEIK (N-palm) TPDINPAWYASRGIRPVGRF- NH ₂
analog 1	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR 1-Nal-NH ₂
analog 2	(N-my ^r)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR 1-Nal-NH ₂
analog 3	(N-palm)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR 1-Nal-NH ₂
analog 4	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheCl ₂ -NH ₂
analog 5	(N-my ^r)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheCl ₂ -NH ₂
analog 6	(N-palm)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheCl ₂ -NH ₂
analog 7	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheNO ₂ -NH ₂
analog 8	(N-my ^r)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheNO ₂ -NH ₂
analog 9	(N-palm)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheNO ₂ -NH ₂
analog 10	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheF ₅ -NH ₂
analog 11	(N-palm)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheF ₅ -NH ₂
analog 12	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR Tyr-NH ₂
analog 13	(N-palm)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR Tyr-NH ₂

Název	Sekvence
lidský hPrRP20	TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH ₂
potkaní rPrRP20	TPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
myr-PrRP20	(N-myristoyl)TPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
analog a	TPDINPAWYTGR Sar IRPVGRF-NH ₂
analog b	(N-myristoyl)TPDINPAWYTGR Sar IRPVGRF-NH ₂
analog c	TPDINPAWY N-Me-Ala SRGIRPVGRF-NH ₂
analog d	(N-myristoyl)TPDINPAWY N-Me-Ala SRGIRPVGRF-NH ₂
analog e	TPDINPAWYTGRGARPFGRF-NH ₂
analog f	(N-myristoyl)TPDINPAWYTGRGARPFGRF-NH ₂
analog g	TPDINPAWYASRPFRPVGRF-NH ₂
analog h	(N-myristoyl)TPDINPAWYASRPFRPVGRF-NH ₂

Zkratky: *norleucin (Nle)*, *naftylalanin (1-Nal)*, *dichlorofenylalanin (PheCl₂)*, *nitrofenylalanin (PheNO₂)*; *pentafluorofenylalanin (PheF₅)*, *palmitoyl (palm)*, *myristoyl (myr)*, *sarkosin (sar)*, *N-methylalanin (N-Me-Ala)*

5.2 Kultivace buněčných linií

Buněčná linie PC12 byla pěstována v 1640 RPMI médiu obohaceném 10 % tepelně inaktivovaného koňského séra (HS) a 5 % tepelně inaktivovaného fetálního hovězího séra (FBS) (složení viz tabulka 2).

Buněčná linie RC-4B/C byla pěstována v DMEM médiu s 10 % FBS a epidermálním růstovým faktorem (EGF) o koncentraci 2,5 ng/ml dle (Maletinska et al., 2013).

Buněčná linie CHO-K1 s transfekovaným lidským GPR10 byla pěstována dle pokynů výrobce v DMEM médiu s 10 % dialyzovaného FBS a dalšími složkami (tabulka 2).

Buněčná linie U2OS s transfekovaným lidským Y5 receptorem byla pěstována dle pokynů výrobce v McCoy's médiu s 10 % dialyzovaného FBS a dalšími složkami (složení viz tabulka 2).

Do všech médií byl přidán glutamin o finální koncentraci 2 mM a 1 % penicilin/streptomycin. Buňky byly udržovány v exponenciální fázi růstu a pasážovány dle potřeby.

Tabulka 2: Složení kultivačních medií pro jednotlivé buněčné linie

složky	PC12	RC-4B/C	CHO-K1 s GPR10	U2OS s Y5
RPMI 1640	X			
DMEM		X	X	
McCoy's 5A Medium				X
HS	10 %			
FBS	5 %	10 %	10 % dialyzované	10 % dialyzované
L-glutamin	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
penicilin/streptomycin	1 %	1 %	1 %	1 %
EGF		2,5 ng/ml		
HEPES (pH 7,3)			25 mM	25 mM
NEAA			0,1 mM	0,1 mM
pyruvát sodný				1 mM
geneticin (G418)			500 µg/ml	100 µg/ml
Zeocin			100 µg/ml	200 µg/ml
hygromycin B				50 µg/ml

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

5.3.1 Kompetitivní a saturační vazebné experimenty

Saturační a kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny dle dříve optimalizovaných podmínek (Maletínská et al., 2007). Buňky PC12 byly pěstovány na 24-jamkových destičkách potažených PEI a inkubovány s 0,5 – 5 nM ¹²⁵I-CART 61-102 ve vazebném pufru (20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5,5 mM glukosa, 1 mg/ml BSA a 0,1 mg/ml hovězí pankreatický trypsinový inhibitor (BPTI, bovine pancreatic trypsin inhibitor) 30 min při 37°C. Nespecifická vazba byla určena pomocí CART 61-102 10⁻⁵ M.

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny s peptidem CART 61-102 a s analogy peptidu CART, Nle⁶⁷ CART 61-102 a [Ala^{68,86}] CART 61-102, v koncentracích

10^{-12} – 10^{-4} a s $0,1$ nM ^{125}I -CART 61-102 ve stejných podmínkách jako u saturačních experimentů. Nespecifická vazba byla určena pomocí CART 61-102 10^{-6} M.

Po inkubaci byly buňky třikrát promyty pro saturační vazebné experimenty a jedenkrát pro kompetitivní vazebné experimenty a solubilizovány v $0,1$ M NaOH. Radioaktivita byla určena pomocí gamma-čítače Wizard 1470. Experimenty byly prováděny v duplikátech nejméně třikrát.

5.3.2 Stanovení signalizačních drah pomocí imunoblotu

Buňky PC12 byly pěstovány na 24-jamkových destičkách potažených PEI po dobu tří dnů do hustoty 200000 buněk/jamku. Kultivační medium bylo vyměněno za bezsérové 20 hod před pokusem. V každé jamce byly buňky inkubovány se samotnými látkami CART 61-102, Nle⁶⁷ CART 61-102 o finální koncentraci 10^{-6} M, nebo NGF 50 ng/ml, v kombinaci s inhibitory SP600125 (inhibitor c-Jun N-koncové kinasy, JNK), SB203580 (inhibitor p38) či U0126 (inhibitor Erk1/2) o koncentraci 10^{-5} M či se samotnými inhibitory po dobu 10 nebo 60 min 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.

Buňky byly na ledu třikrát promyty ledovým fosfátovým pufrém (PBS, phosphate buffer saline, pH 7,4 155 mM NaCl, 2,97 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 1,06 mM KH_2PO_4) a solubilizovány lyzačním pufrém (62,5 mM Tris-HCl o pH 6,8, 2 % SDS, 10 % glycerol, 0,01 % bromfenolová modř, 5 % merkaptoetanol, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4). Experiment byl prováděn v duplikátech nejméně ve třech nezávislých pokusech a vzorky uchovávány při -20°C .

Vzorky byly naneseny na 4/12% SDS polyakrylamidový gel a elektroforéza byla prováděna na přístroji Mini-Protean 3 při 100 V po dobu 10 min a poté při 190 V po dobu 50 min. Proteiny byly dále přeneseny z gelu na polyvinyliden difluoridovou (PVDF) membránu. Přenos proteinů probíhal v blotovacím pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20 % methanol) při konstantním napětí 30 V při 4°C přes noc.

Membrány byly blokovány 1 hod při 25°C v 5% netučném sušeném mléce v pufru TBS (Tris-buffered saline, 20 mM Tris-HCl o pH 7,6, 136 mM NaCl) s 0,1% Tween-20 a s inhibitory fosfatas 5 mM Na_3VO_4 a 50 mM NaF. Poté byly inkubovány 1 hod při 25°C s příslušnou primární protilátkou: fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) myší monoklonální protilátka (mAb), p44/42 MAPK (Erk1/2) myší mAb, fosfo-CREB (Ser133) (1B6) myší mAb, CREB (86B10) myší mAb, fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) králičí

mAb, SAPK/JNK králičí mAb, c-Jun králičí mAb, fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) králičí mAb, p38 MAPK králičí mAb či c-Fos králičí mAb, v ředění 1:1000 či s myší mAb nebo aktin králičí mAb v ředění 1:2000. Po promytí byly membrány inkubovány 1 hod při 25°C s myší nebo králičí sekundární protilátkou značenou peroxidázou, naředěnou 1:2000. Na promyté membrány bylo aplikováno činidlo SuperSignal West Femto a byla detekována chemiluminiscence pomocí Chemi Doc™ System.

Intenzita proužků byla kvantifikována programem Image Lab™ Software a normalizována pomocí aktinu. Byly určeny poměry mezi fosforylovaným a celkovým proteinem.

5.3.3 Imunohistochemické stanovení aktivace c-Jun po ICV podání

5.3.3.1 Zpracování tkání

Pokus probíhal na myších samcích kmene C57BL/6 (Charles Rivers Laboratories, Sulzfeld, Německo), kteří byli chováni při 23°C a denním cyklu 12 hod světla a 12 hod tmy (světlo od 6:00). Myši měly volný přístup k vodě a standardní dietě St-1 (Mlýn Kocanda, Jesenice, Česká republika). Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.) a protokol experimentu byl schválen resortní komisí Akademie věd České republiky pro ochranu zvířat. Ve 12 týdnech byla myším v anestezii voperována kanyla do třetí mozkové komory (2 mm předozadně od Bregmy, 3 mm vertikálně) podle (Maletínská et al., 2007). Zvířata byla následně rozdělena do samostatných klecí a ponechána v klidu pro zotavení se z operace s volným přístupem k vodě a stravě.

Ráno v den pokusu byl myším, které přes noc hladověly, ICV podán fyziologický roztok, CART 61-102 v dávce 0,1 µg/myš či 1 µg/myš nebo analog Nle⁶⁷ CART 61-102 v dávce 1 µg/myš (skupina myší n = 5). Další zpracování tkání a imunohistochemie bylo prováděno PharmDr. Zdenkem Pirníkem, PhD. Zvířatům byla 90 min po ICV injekci podána anestezie pentobarbitalem (IP 50 mg/kg). Myši byly transkardiálně perfundovány 0,1 M fosfátovým pufrům (PB, pH 7,4) s 4% paraformaldehydem. Odebrané mozky byly dofixovány ve stejném roztoku ve 4°C přes noc a potom 48 hod v 20% sacharóze v 0,1 M PB. Umístění ICV kanyl bylo ověřeno při nakrájení mozků na koronální řezy o tloušťce 30 µm při -22°C na kryostatu CM1950. Řezy byly uchovány v PB (4°C).

5.3.3.2 Imunohistochemie

Řezy byly promyty studeným PB a inkubovány s 3% H₂O₂ po dobu 40 min při 25°C. Poté byly promyté PB a inkubovány s c-Jun králičí mAb, naředěnou 1:400 v 0,1 M PB s 4% kozím sérem, 0,5% Tritonem X-100 a 0,1% azidem sodným po 48 hod při 4°C.

Po promytí PB byly řezy inkubovány 90 min při 25°C s biotinylovanou kozí protilátkou proti králičímu IgG v ředění 1:500. Řezy byly dále promyty PB a inkubovány s avidin-biotinovým komplexem označeným křenovou peroxidázou v ředění 1:250 po dobu 90 min při 25°C.

Vizualizace c-Jun imunopozitivních neuronů byla uskutečněna pomocí 0,0266% 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochloridu (DAB) rozpuštěném v 0,05 M roztoku octanu sodného (SAB, pH 6) a s 0,0006% H₂O₂ a 2,5% (NH₄)₂Ni(SO₄)₂ · 6H₂O v čase 7 min. DAB způsobuje černé zbarvení ve sledovaném jádře. Na závěr byly řezy promyty 0,05 M SAB, nataženy na sklíčko v roztoku 0,0125 M SAB s obsahem 0,1% želatiny, usušeny a následně překryty Permount zalévacím médiem.

5.3.4 Příjem potravy po ICV podání peptidu CART a jeho analogů

Pokus probíhal na myších samcích kmene C57BL/6 stejně jako v kapitole 5.3.3. V 8:00 ráno v den pokusu byl přes noc hladovým myším, ICV podán fyziologický roztok, peptid CART 61-102, resp. Nle⁶⁷ CART 61-102 v dávce 1 µg/myš nebo analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 v dávce 1 a 5 µg/myš (n = 5). Látky byly podávány v objemu 5 µl/myš a příjem potravy byl sledován po dobu 5 hod.

5.4 Metody týkající se PrRP a jeho lipidovaných analogů

5.4.1 Kompetitivní vazebné experimenty na buněčné linii RC-4B/C

Pro kompetitivní vazebné experimenty byly buňky RC-4B/C nasazeny na 24-jamkové destičky potažené polylysinem dle metody optimalizované dříve (Maletinska et al., 2013). Buňky byly inkubovány s 0,1 nM ¹²⁵I-rPrRP31 a s peptidy o koncentraci 10⁻¹¹ – 10⁻⁵ M 60 min při 25°C. Nеспецифická vazba byla určena pomocí 10⁻⁵ M rPrRP31. Experimenty byly prováděny v duplikátech a minimálně ve třech nezávislých pokusech.

5.4.2 Kompetitivní vazebné experimenty na buněčných membránách s NPFF2 receptorem

Vazebné experimenty na membránách izolovaných z CHO-K1 buněk s lidským NPFF2 receptorem byly prováděny dle pokynů výrobce. Membrány byly inkubovány 2 hod při 25°C s peptidy o koncentraci 10^{-11} – 10^{-5} M a s 0,1 nM ^{125}I -1DMe (Maletinska et al., 2013). Nеспецифická vazba byla určena pomocí 10^{-5} M 1DMe.

5.4.3 Kompetitivní vazebné experimenty na buněčné linii CHO-K1 s transfekovaným receptorem GPR10

Buňky CHO-K1 s transfekovaným lidským GPR10 byly na vazebné experimenty nasazeny na 24-jamkové destičky potažené PEI v hustotě 3000 buněk/jamku. Buňky byly pěstovány do finálního počtu 90000 buněk/jamku. Buňky byly inkubovány ve vazebném pufru (25 mM HEPES pH 7,4, 120 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0,5% BSA, 2 g/l glukosa) s 0,03 nM ^{125}I -hPrRP31 a s peptidy o koncentraci 10^{-11} – 10^{-5} M 60 min při 25°C. Nеспецифická vazba byla určena pomocí 10^{-5} M hPrRP31.

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

Buňky U2OS s transfekovaným lidským Y5 byly na vazebné experimenty nasazeny na 24-jamkové destičky potažené PEI v hustotě 40000 buněk/jamku. Buňky byly ponechány růst po dobu tří dní do finálního počtu 120000 buněk/jamku.

Buňky byly inkubovány ve vazebném pufru (25 mM HEPES pH 7,4, 120 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 4,7 mM KCl, 1 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0,5% BSA, 2 g/l glukosa) s 0,05 – 2 nM ^{125}I -PYY 2 hod při 25°C pro saturační vazebné experimenty. Nеспецифická vazba byla určena pomocí PYY 10^{-6} M.

Buňky byly inkubovány ve vazebném pufru s 0,1 nM ^{125}I -PYY a s peptidy o koncentraci 10^{-11} – 10^{-5} M 2 hod při 25°C pro kompetitivní experimenty. Nеспецифická vazba byla určena pomocí 10^{-5} M PYY.

5.4.5 Fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET, fluorescence resonance energy transfer) s beta-laktamázovým referenčním genem na buněčné linii CHO-K1 s receptorem GPR10

Buňky CHO-K1 s transfekovaným lidským GPR10 byly nasazeny 20 hod před pokusem na 96-jamkové destičky v hustotě 40000 buněk/jamku se 128 µl média (DMEM,

10% dialyzované FBS, 0,1 nM NEAA, 25 mM HEPES, 1% penicilin/streptomycin, 2 mM L-glutamin. Experiment byl prováděn dle pokynů výrobce Thermo Fisher Scientific. Buňky byly inkubovány s peptidy o koncentraci 10^{-12} – 10^{-7} M 5 hod při 37°C/5% CO₂. Poté byl přidán fluorescenční substrát a buňky byly inkubovány 2 hod při 25°C v temnu. Fluorescence jednotlivých jamek byla měřena fluorescenčním spektrofotometrem Tecan Infinite M1000 při 405 nm excitačního spektra a 460 nm a 530 nm emisního spektra.

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

Myší samci C57BL/6 byli chováni v podmínkách viz kapitola 5.3.3 do věku 3. měsíců. V den pokusu byly myši hladové 17 hod a měly volný přístup k vodě. Myším byl SC podán fyziologický roztok nebo analogy PrRP31 v dávce 5 mg/kg rozpuštěné ve fyziologickém roztoku. Patnáct minut po injekci byla myším podána zvážená peleta a byl odečítán příjem potravy po 30 min po dobu 6 hod. Počet zvířat na skupinu byl 5-6 jedinců.

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

Myším samcům C57BL/6 byla od 8. týdne věku podávána HF dieta složená ze 40% St-1 diety, 34% Sunaru, 25% vepřového sádla a 1% kukuřičného škrobu. Příjem potravy a hmotnost byl sledován jedenkrát týdně od 9. týdne do 18. týdne věku. Jedinci, kteří vykazovali rezistenci vůči této dietě, byli z experimentu vyřazeni (5% z celkového počtu myší na HF dietě).

Ve věku 19 týdnů byly myši rozřazeny do skupin po 10 jedincích a umístěny do individuálních klecí s volným přístupem k vodě a HF dietě. Myším byl dvakrát denně (v 8:00 a 17:00) po dobu 14 dnů injikován SC fyziologický roztok, nebo lipidovaný analog myr-PrRP20, palm-PrRP31 či analog 6 s PheCl₂³¹ rozpuštěné ve fyziologickém roztoku v dávce 5 mg/kg.

V průběhu pokusu byl každý den monitorován příjem potravy a myším byla měřena tělesná hmotnost.

Po 14 dnech ráno na konci experimentu byla 17 hod hladová zvířata usmrcena metodou cervikální dislokace. Myším byla odebrána krev pro přípravu plasmy (EDTA 1,3 mg/ml krve) a tkáně – tuková (tuk podkožní – SCAT, vnitrobřišní – IPAT a hnědá tuková tkáň – BAT) a jaterní pro určení dalších metabolických parametrů. Tkáně byly zváženy

a zmraženy v tekutém dusíku a do zpracování uchovávány při -70°C . Plasmy byly v alikvotech uchovávány při -20°C .

5.4.7.1 Stanovení biochemických parametrů v plasmě

Myším DIO samcům byly glukometrem Glucocard měřeny hladiny glukosy. Dále byla měřena hladina insulinu v plasmě pomocí kitu na radioimunologickou analýzu (RIA). Plasmatická hladina leptinu byla stanovena pomocí kitu na enzymovou imunoanalýzu (ELISA). Hladina triglyceridů byla měřena kvantitativní enzymatickou reakcí. Všechna stanovení byla prováděna dle doporučeného protokolu výrobců.

5.4.7.2 Stanovení exprese mRNA v tukové tkáni a játrech

Tuková a jaterní tkáň byla zpracována dle (Maletinska et al., 2011a) pomocí přístroje ABI PRISM 7500. V játrech byla stanovena exprese acetyl-CoA karboxylasy 1 (ACACA), syntasy mastných kyselin (FASN) a proteinu vázající sterolový regulační element (SREBP). V IPAT a SCAT byla stanovena exprese ACACA, FASN, proteinu vázající mastné kyseliny (FABP-4), leptinu a lipoproteinové lipasy (LPL). V BAT byla měřena exprese UCP-1.

Pro kompenzaci různého množství RNA použitého v reakci a pro korekci účinnosti reverzní transkripce a PCR bylo použito β_2 -mikroglobulinu (B2M), jako interního standardu.

Expresy mRNA byly stanoveny na 3. interní klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v laboratoři molekulární diabetologie a obezitologie ve spolupráci s RNDr. Zdenou Lacinovou a Miloslavou Čechovou.

5.5 Statistické vyhodnocení

5.5.1 Vyhodnocení vazebných experimentů

Saturační i kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny podle principů Motulského a Neubiga (Motulsky and Neubig, 2002). Vazebné křivky byly vyhodnoceny programem GraphPad Prism pomocí modelu pro vazbu k jednomu vazebnému místu a metodou nelineární regrese.

V rovnovážném stavu se komplex ligand-receptor utváří se stejnou rychlostí, jako zaniká. Rovnovážná disociační konstanta (K_d) je vyjádřena koncentrací ligandu, při které ligand obsadí polovinu všech receptorů [mol/l].

$$K_d = \frac{[\text{ligand}] \times [\text{receptor}]}{[\text{ligand-receptor}]}$$

Čím nižší je hodnota K_d , tím nižší koncentrace ligandu je potřebná k obsazení receptoru a tím vyšší je tedy afinita ligandu k receptoru.

Hodnotu K_d lze určit ze saturačních vazebných experimentů spolu s celkovým počtem receptorů (B_{\max}) [počet vazebných míst/buňku].

Z kompetitivních vazebných křivek lze určit hodnotu poloviční inhibiční koncentrace IC_{50} , při které je ligand navázán na 50 % všech receptorů. Z hodnoty IC_{50} je určena inhibiční konstanta (K_i), která vyjadřuje koncentraci neznačeného ligandu, navázaného na polovinu vazebných míst bez přítomnosti radioligandu nebo jiného kompetitoru. Hodnotu K_i lze spočítat dosazením IC_{50} do rovnice Chenga a Prusoffa (Cheng and Prusoff, 1973).

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

Pro určení hodnot K_i byly použity hodnoty K_d ze saturačních vazebných experimentů prováděných na buněčné linii RC-4B/C (Maixnerova et al., 2011), CHO-K1 s exprimovaným GPR10 a k membránám s NPFF2 (tabulka 3) (Maletinska et al., 2013).

Tabulka 3: Hodnoty K_d ze saturačních vazebných experimentů

	RC-4B/C $^{125}\text{I-rPrRP31}$	lidský GPR10 $^{125}\text{I-hPrRP31}$	lidský NPFF2 $^{125}\text{I-1DMe}$
K_d [nM]	4,21 ± 0,66	1,06 ± 0,36	0,72 ± 0,12

Získané hodnoty byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny jako průměrná hodnota ± střední chyba průměru (SEM).

5.5.2 Signalizace na buněčné linii PC12

Získaná data z buněčných signalizací na buněčné linii PC12 byla statisticky zpracována pro zjištění směrodatnosti rozdílů mezi skupinami pomocí programu GraphPad Prism a jsou uvedena jako průměrná hodnota ± SEM a statistika byla prováděna t-testem. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud $p < 0,05$.

5.5.3 Vyhodnocení imunohistochemického stanovení c-Jun

Data získaná z imunohistochemických experimentů byla vyhodnocena statistickým programem Statistica 6.0 software, jednocestnou analýzou rozptylu, po které následoval Tukeyho test a uvedena jako průměrná hodnota \pm SEM. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud $p < 0,05$. Počet c-Jun imuno pozitivních buněk byl vyhodnocený unilaterálně v každém jádře zvlášť (NTS od Bregmy -7,48 mm až -7,32 mm, PVN od Bregmy -0,7 mm až -0,94 mm, ARC od Bregmy -1,58 mm až -1,94 mm, VMH a DMN od Bregmy -1,46 mm až -1,82 mm podle atlasu myšího mozku (Franklin and Paxinos, 1997). Reprezentativní obrázky řezů a rovněž i kvantitativní zpracování bylo provedeno pomocí světelného mikroskopu Axio Scope.A1 a digitální kamerou v programu AxioVision 4.7.

5.5.4 Vyhodnocení signalizačních experimentů na CHO-K1 s transfekovaným receptorem GPR10

Data ze signalizačních fluorescenčních experimentů na CHO-K1 s transfekovaným GPR10 byla vyhodnocena pomocí GraphPad Prism. Hodnoty 50% maximálního účinku (EC_{50}) byly určeny nelineární regresí jako logaritmus koncentrace agonisty versus odpověď.

5.5.5 Vyhodnocení experimentů *in vivo* u hladových myší

Krátkodobý příjem potravy po ICV podání peptidu CART 61-102 a jeho analogů i po SC podání lipidovaných analogů PrRP na hladových myších byl vyhodnocen pomocí jednocestné analýzy rozptylu, po které následoval Dunnettův test. Pro statistické vyhodnocení byla použita data z času největšího účinku peptidů – 45 min po podání látky a data z času na konci pokusu. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud $p < 0,05$.

5.5.6 Statistické vyhodnocení dat z dlouhodobého experimentu na DIO myších

Příjem potravy a tělesná hmotnost z dlouhodobého pokusu na DIO myších byl vyhodnocen statistickým programem GraphPad Prism pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (two-way ANOVA), po které následoval Bonferroniho test. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud $p < 0,05$.

Data ze stanovení metabolických parametrů a exprese mRNA jsou uvedena jako průměrná hodnota \pm SEM. Data byla vyhodnocena jednocestnou analýzou rozptylu, po které následoval Dunnettův test.

6. VÝSLEDKY

6.1 Peptid CART

Výsledky týkající se peptidu CART byly uveřejněny v časopise Brain Research (příloha č. 1): Nagelová V., Pirník Z., Železná B. a Maletínská L., CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript) peptide specific binding sites in PC12 cells have characteristics of CART peptide receptors, 2014, 1547: 16-24. doi: 10.1016/j.brainres.2013.12.024 (Nagelova et al., 2014).

Výsledky týkající se analogů peptidu CART publikovány v časopise Peptides (příloha č. 2): Blechová M., Nagelová V., Žáková L., Demianová Z., Železná B., Maletínská L., New analogs of the CART peptide with anorexigenic potency: the importance of individual disulfide bridges, 2013, 39: 138-44. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.033 (Blechová et al., 2013).

6.1.1 Specifická vazba peptidu CART na buněčné linii PC12

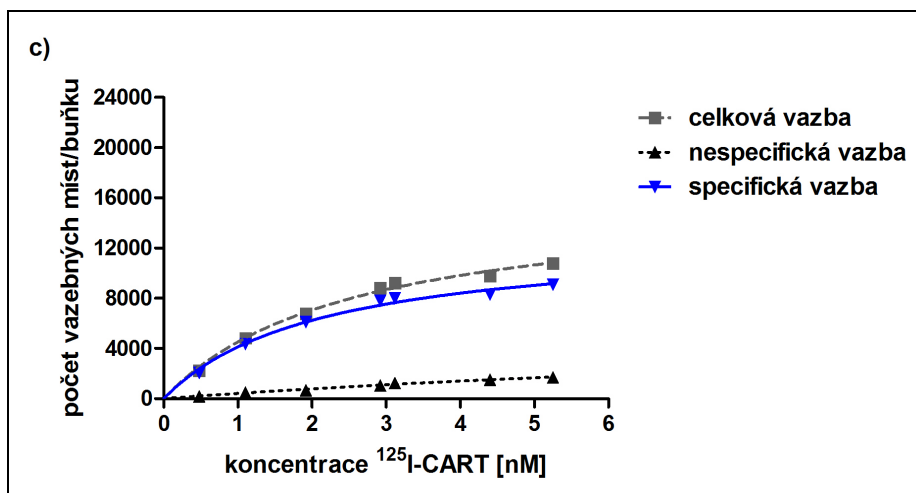
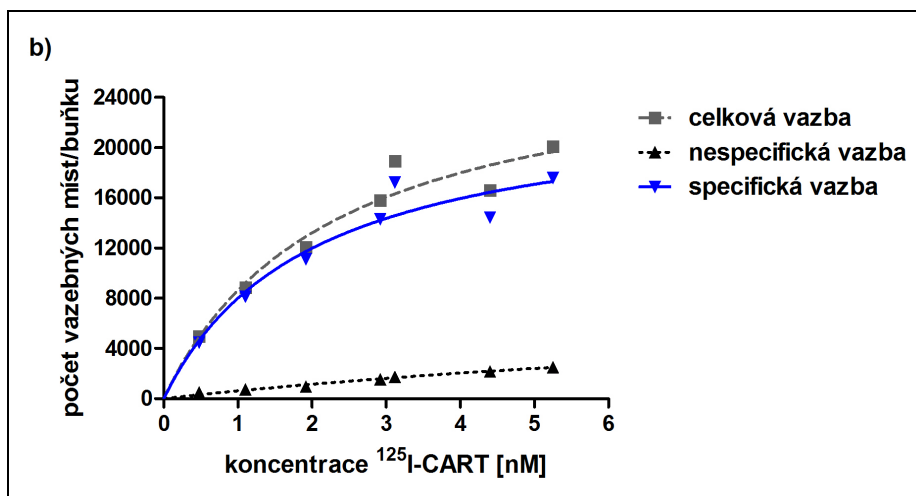
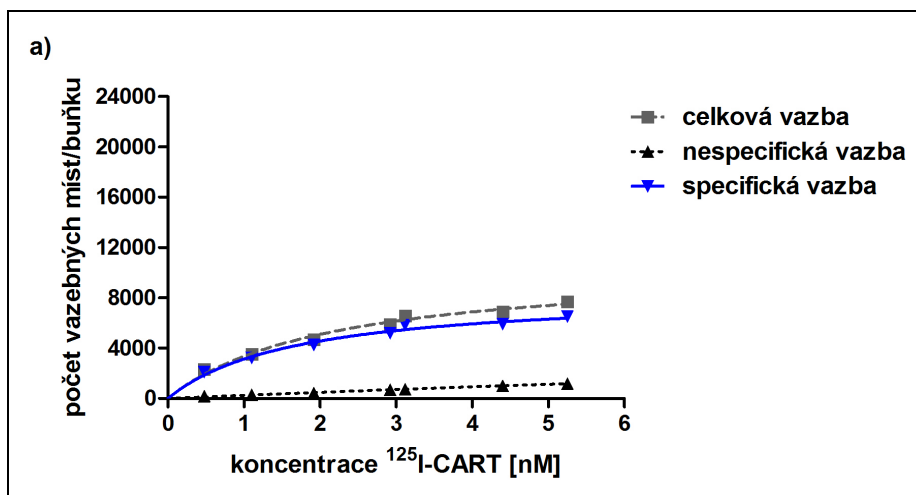
Saturační vazba ^{125}I -CART 61-102 na buněčnou linii PC12 a z ní vypočtená K_d a B_{\max} byly publikovány viz příloha č. 1 (Nagelova et al., 2014).

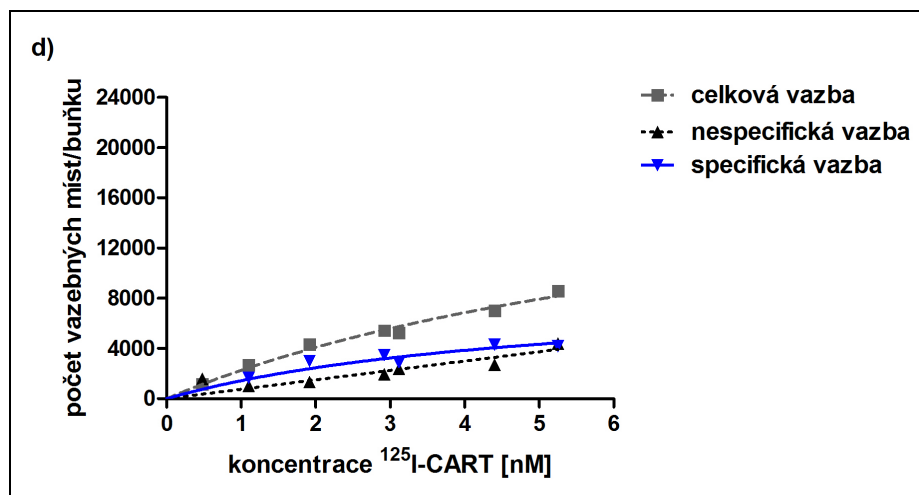
Saturační vazebné experimenty byly rovněž použity ke stanovení afinity ^{125}I -CART 61-102 a počtu vazebných míst v buňkách PC12 diferencovaných pomocí NGF, nebo hypofyzárním peptidem aktivující adenylátcyklázu (PACAP) na neuronový fenotyp či dexametasonem (DEX) na chromafinní buňky.

Na nediferencovaných buňkách PC12 byla určena disociační konstanta K_d $2,36 \pm 1,28$ nM a B_{\max} 3601 ± 592 vazebných míst/buňku (obrázek 10 a), což jsou hodnoty srovnatelné s předchozími výsledky (Maletínská et al., 2007).

U buněk diferencovaných pomocí NGF v neuronový fenotyp bylo možné vzniklé neurony a axony mikroskopicky identifikovat. B_{\max} se pro peptid CART po diferenciaci výrazně zvýšil na 11248 ± 930 vazebných míst/buňku a K_d $2,09 \pm 0,66$ nM (obrázek 10 b). Rovněž i buňky diferencované pomocí PACAP vykazovaly vyšší počet vazebných míst B_{\max} 8853 ± 386 vazebných míst/buňku než u nediferencovaných PC12 a K_d $2,02 \pm 0,22$ nM (obrázek 10 c). U buněk diferencovaných pomocí NGF či PACAP byla afinita peptidu CART k vazebným místům a jejich počet velmi podobné.

Buňky PC12 diferencované dexametasonem se změnilly na chromafinní fenotyp. Jejich tvar odpovídal nediferencovaným PC12, ale měly nižší hustotu. Kvůli vysoké nespecifické vazbě, vyšší než 50 % celkové vazby ^{125}I -CART 61-102 nebylo možné stanovit hodnotu K_d (obrázek 10 d). Počet vazebných míst byl u takto diferencovaných buněk velmi nízký.





Obrázek 10: Saturační vazebné experimenty na buněčné linii PC12

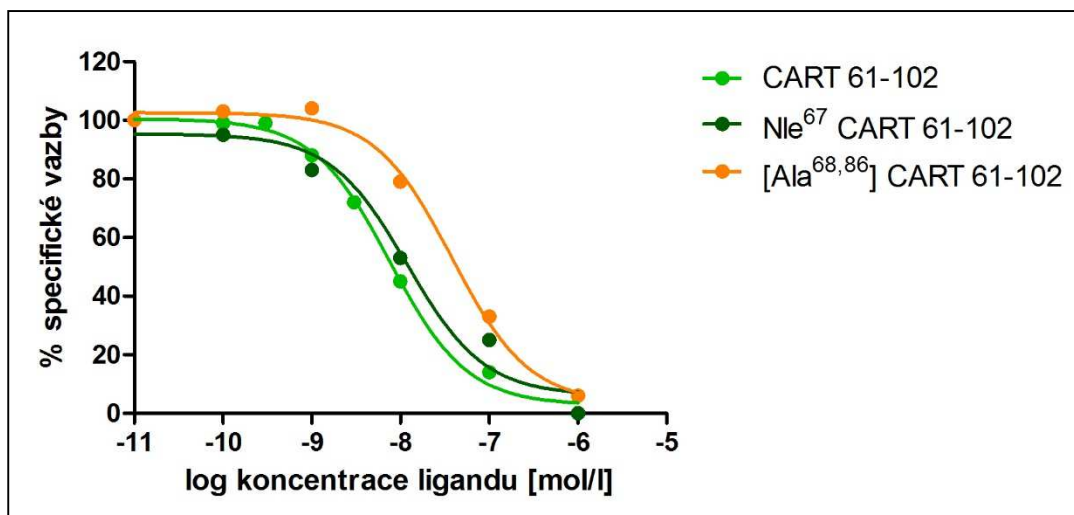
Experimenty byly prováděny na buňkách PC12 **a)** nediferencovaných, **b)** diferencovaných pomocí NGF, **c)** diferencovaných pomocí PACAP, **d)** diferencovaných pomocí DEX. Buňky byly inkubovány 30 min při 37°C se zvyšující se koncentrací $^{125}\text{I-CART}$ 61-102. Nespecifická vazba byla určena v přítomnosti peptidu CART 61-102 10^{-5} M. Specifická vazba byla určena odečtením nespecifické vazby z celkové vazby. V grafu jsou vyneseny reprezentativní saturační vazebné křivky.

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

Kompetitivní vazebné experimenty na nediferencované buněčné linii PC12 byly publikovány viz příloha č. 2 (Blechová et al., 2013).

V naší studii byla zkoumána důležitost jednotlivých disulfidových můstků. Pomocí výměny původního cysteinu za alanin byly syntetizovány analogy peptidu CART 61-102 obsahující jeden nebo dva disulfidové můstky. Analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 se dvěma disulfidovými můstky v pozici 74-94 a 88-101 vykazoval vysokou afinitu k buňkám PC12. Rovněž byl syntetizován stabilní analog Nle⁶⁷ CART 61-102, který měl v pozici 67 methionin vyměněn za norleucin.

Analog Nle⁶⁷ CART 61-102 se vázal s vysokou afinitou, kdy hodnota K_i byla v nanomolární oblasti $3,98 \pm 2,10 \times 10^{-9}$ M, stejně jako u peptidu CART 61-102, kdy K_i byla $7,78 \pm 3,38 \times 10^{-9}$ M (obrázek 11). Analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 se rovněž vázal na buňky PC12 s vysokou afinitou s hodnotou K_i $3,95 \pm 1,77 \times 10^{-8}$ M (obrázek 11). Hodnota K_d $0,48 \pm 0,16$ nM a B_{\max} 2228 ± 529 vazebných míst/buňku byla určena z předchozí studie (Maletínská et al., 2007).

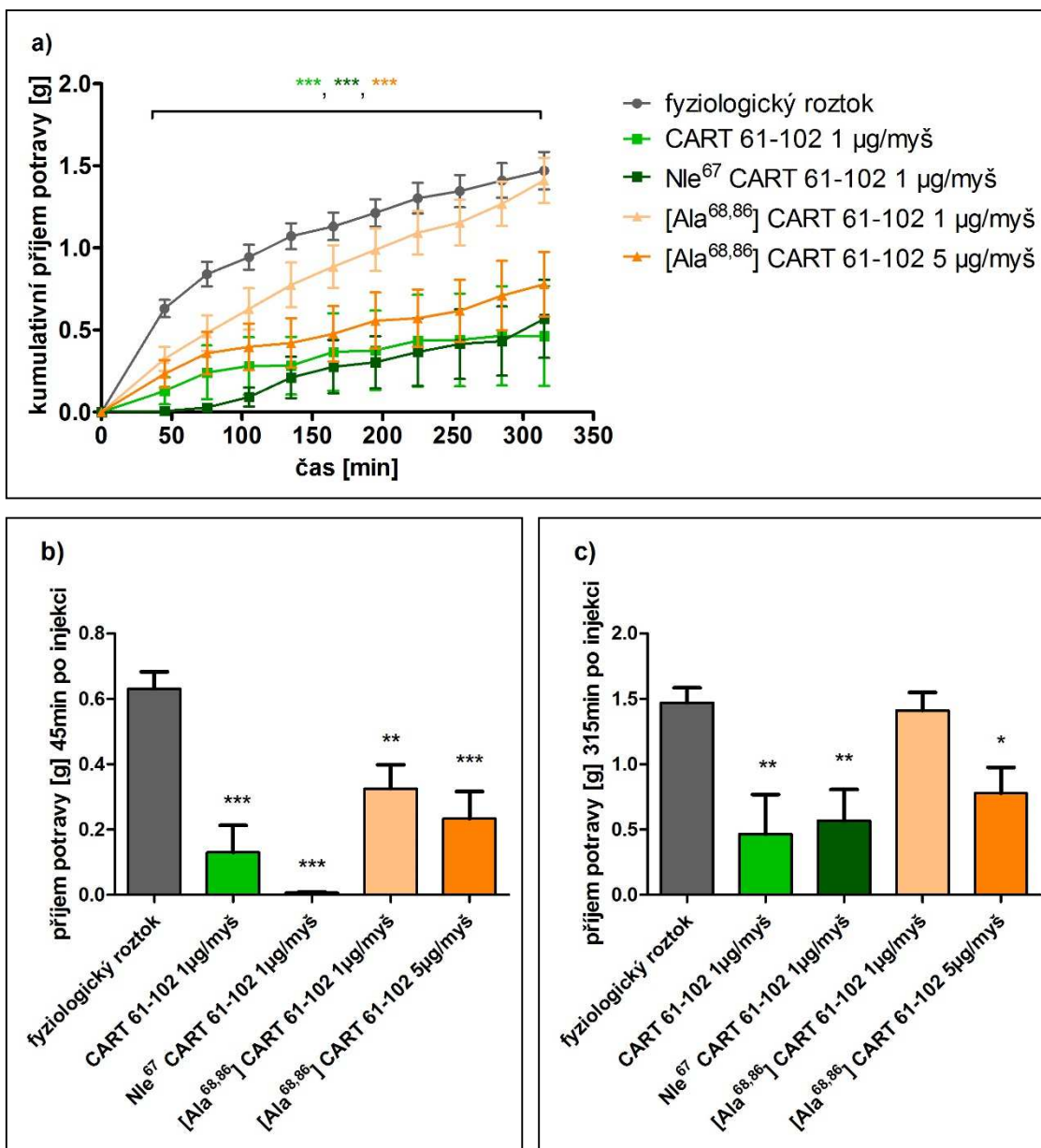


Obrázek 11: Kompetitivní vazebné experimenty na buněčné linii PC12

Experimenty byly prováděny na nediferencovaných buňkách PC12, které byly inkubovány 30 min při 37°C s peptidy o zvyšující se koncentraci a 0,1 nM ¹²⁵I-CART 61-102. Pokusy byly prováděny v duplikátech nejméně třikrát. Graf znázorňuje reprezentativní vazebné křivky.

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

Výsledky z příjmu potravy byly publikovány viz příloha č. 2 (Blechová et al., 2013). Příjem potravy byl měřen na hladových samcích myší a po ICV podání peptidu CART 61-102 resp. Nle⁶⁷ CART 61-102 do třetí mozkové komory v dávce 1 µg/myš došlo k významnému snížení příjmu potravy oproti kontrolní skupině, které byl podán fyziologický roztok (obrázek 12 a – c). Snížení příjmu potravy po podání analogu [Ala^{68,86}] CART 61-102 v dávce 1 µg/myš nebylo tak výrazné, ovšem v čase největšího účinku 45 min došlo rovněž k signifikantnímu snížení příjmu potravy. Analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 v dávce 5 µg/myš významně snížil příjem potravy ve srovnání s kontrolní skupinou, a jeho účinek byl srovnatelný s peptidem CART 61-102 resp. Nle⁶⁷ CART 61-102 (obrázek 12 a – c).



Obrázek 12: Příjem potravy po ICV podání peptidu CART a jeho analogů u hladových myší

Látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku v dávce 1 resp. 5 µg/myš a podány ICV do třetí mozkové komory. Příjem potravy byl měřen po dobu 5 hod, ve skupině $n = 6$.

a) kumulativní příjem potravy po podání peptidu CART 61-102, Nle⁶⁷ CART 61-102 a [Ala^{68,86}] CART 61-102. Příjem potravy **b)** ve 45 min a **c)** 315 min po ICV podání. Grafy znázorňují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých pokusů. Signifikance je * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oproti kontrole, injikované fyziologickým roztokem. Data byla analyzována jednocestnou analýzou rozptylu, po které následoval Dunnettův test.

6.1.4 Signalizace peptidu CART v buňkách PC12

Výsledky ze signalizačních experimentů byly publikovány viz příloha č. 1 (Nagelova et al., 2014).

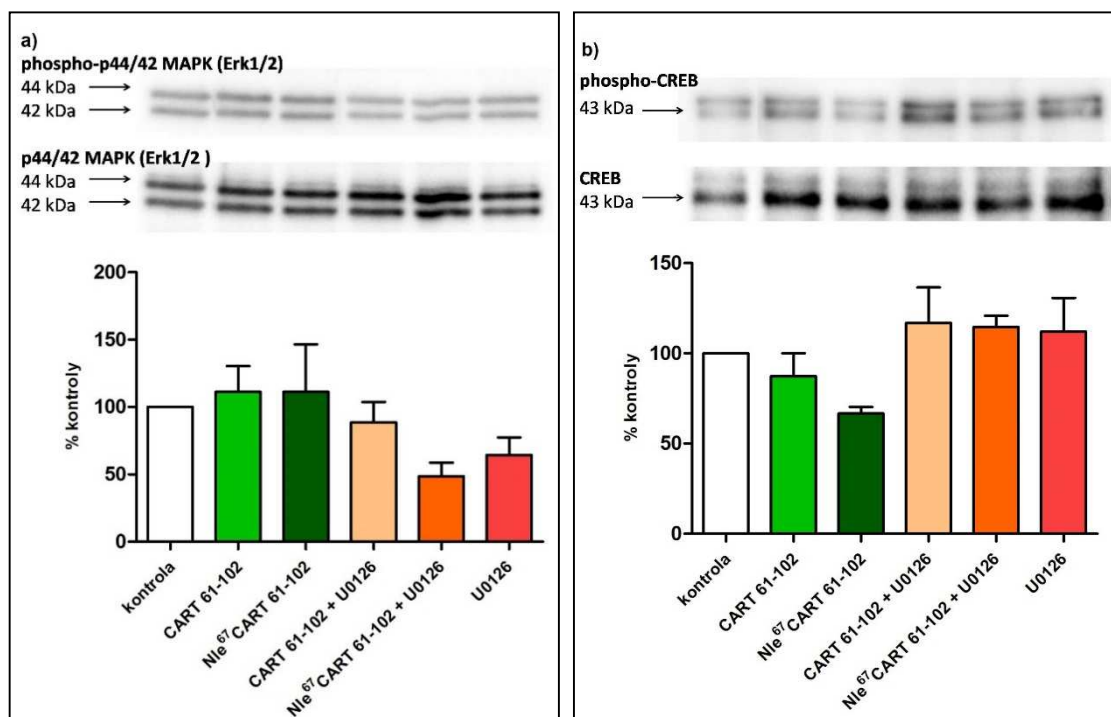
Po 10 minutové inkubaci s peptidem CART 61-102 a s analogem Nle⁶⁷ CART 61-102 nebyla pozorována fosforylace dráhy Erk1/2 či CREB (obrázek 13 a, b). Pro tuto dráhu byl použit selektivní inhibitor U0126, který fosforylaci Erk1/2 snižoval, avšak toto snížení nebylo statisticky významné.

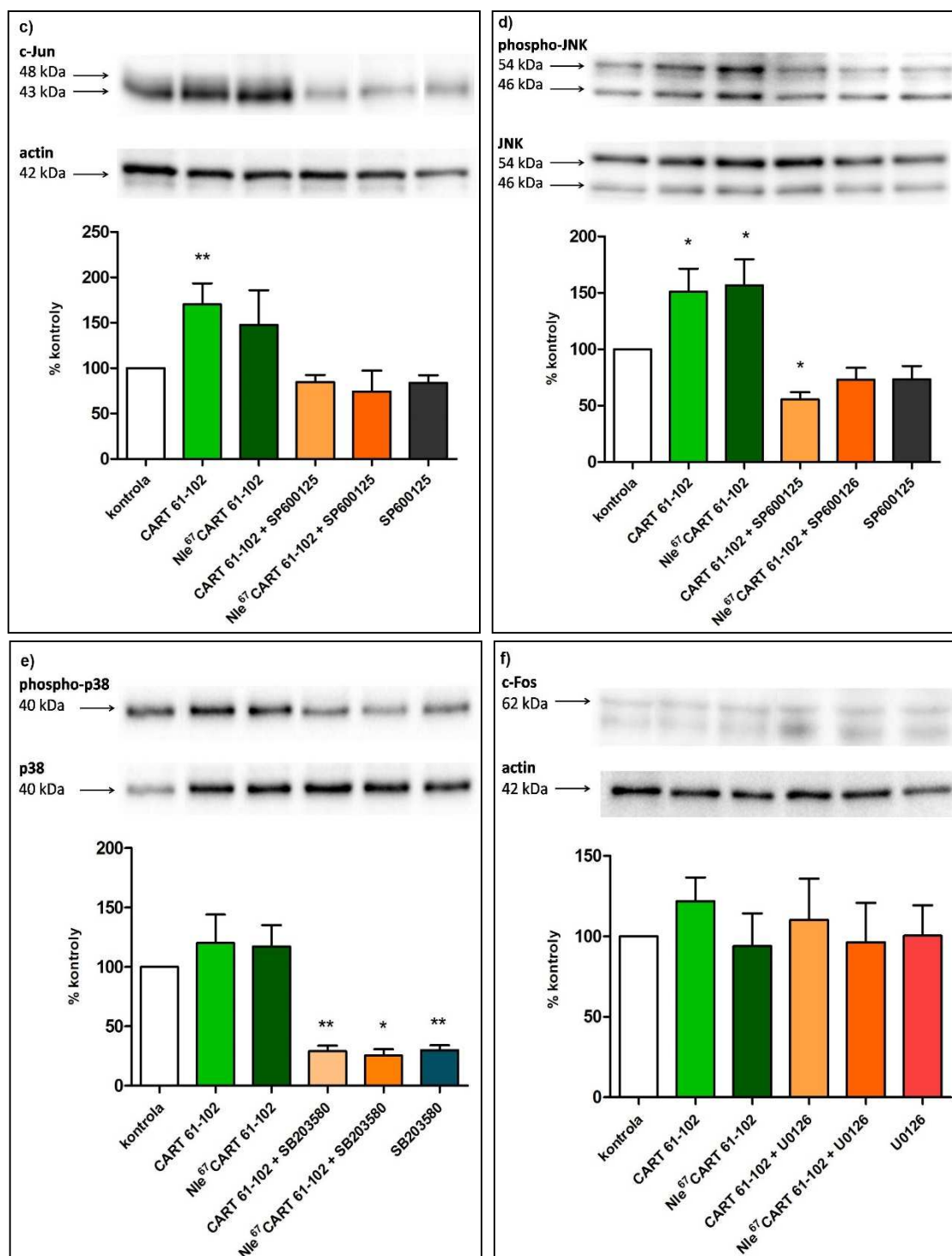
U další zkoumané signalizační dráhy SAPK/JNK došlo k výraznému zvýšení proteinu c-Jun po 60 minutové inkubaci s peptidem CART 61-102 (obrázek 13 c). Tento účinek byl blokován selektivním inhibitorem této dráhy, SP600125. K nesignifikantnímu zvýšení c-Jun došlo i po stimulaci analogem Nle⁶⁷ CART 61-102.

Fosforylace JNK, která předchází aktivaci c-Jun, byla signifikantně zvýšená po 10 minutové inkubaci s CART 61-102 i s analogem Nle⁶⁷ CART 61-102 (obrázek 13 d). Oba tyto účinky byly rovněž blokovány inhibitorem SP600125.

CART 61-102 a Nle⁶⁷ CART 61-102 po 10 minutové inkubaci nesignifikantně zvýšil fosforylaci dráhy p38. Pro tuto signalizační dráhu byl použit jako selektivní inhibitor SB203580, který fosforylaci snižoval (obrázek 13 e).

Žádný účinek po 60 minutové inkubaci s peptidem CART 61-102 a Nle⁶⁷ CART 61-102 nebyl pozorován na zvýšení c-Fos (obrázek 13 f).





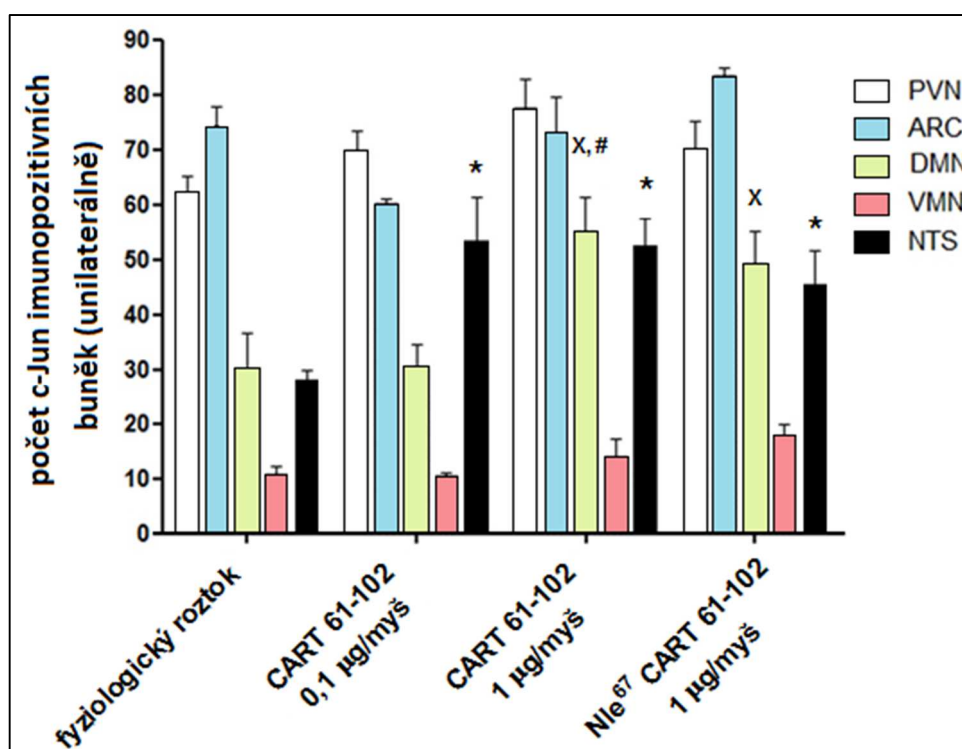
Obrázek 13: Přehled aktivace signalizačních drah a) MAPK/Erk1/2, b) CREB, c) c-Jun, d) JNK, e) p38, f) c-Fos

Buňky byly inkubovány s peptidem CART 61-102, analogem Nle⁶⁷ CART 61-102 a s kombinacemi s příslušnými inhibitory po dobu 10 a 60 min při 37°C. Data jsou uvedena jako průměry ± SEM. Signifikance je * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ oproti kontrole - buňkám inkubovaným za stejných podmínek, pouze s médiem. Data byla analyzována jednocestnou analýzou rozptylu, po které následoval Dunnettův test.

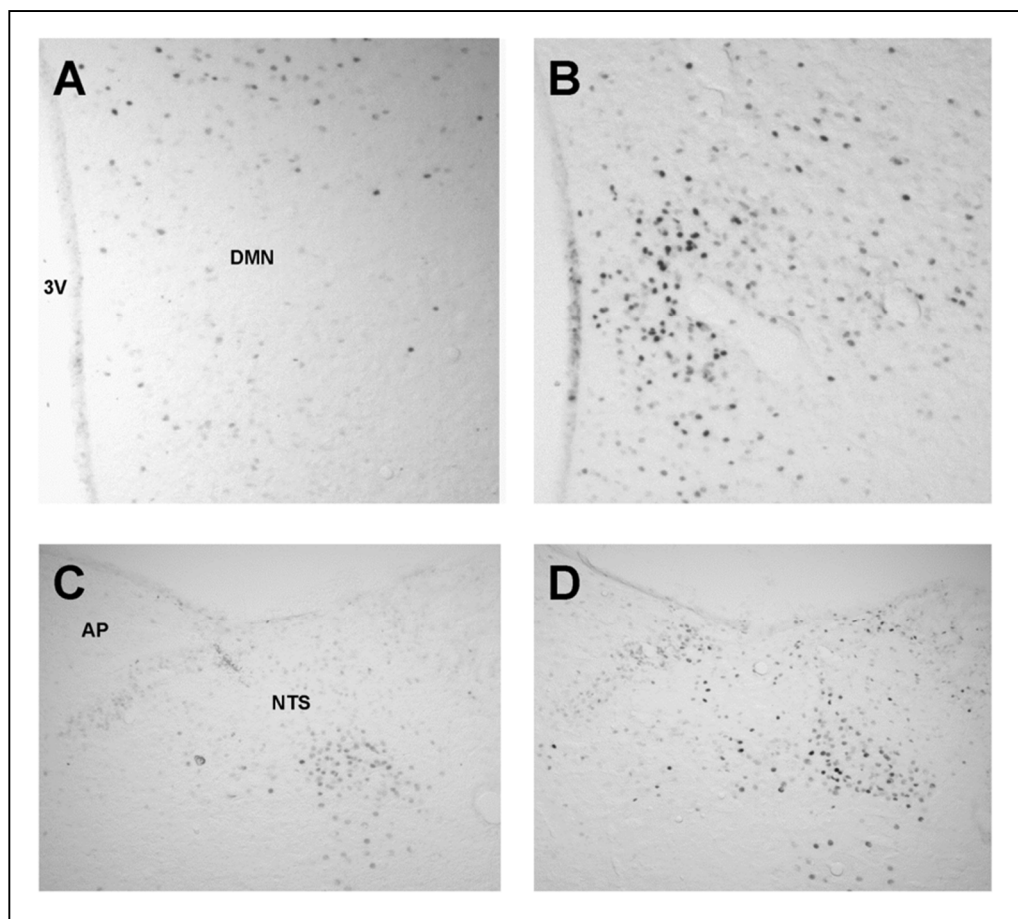
6.1.5 Imunohistochemické stanovení aktivity c-Jun u hladových myší

Výsledky z imunohistochemického stanovení aktivity c-Jun byly publikovány viz příloha č. 1 (Nagelova et al., 2014).

Po ICV podání peptidu CART 61-102 resp. Nle⁶⁷ CART 61-102 došlo k výraznému zvýšení počtu c-Jun imunopozitivních buněk v DMN a NTS oproti kontrolní skupině, které byl podáván fyziologický roztok (obrázek 14). V DMN byl účinek peptidu CART 61-102 dávkově závislý a ovlivňoval buňky ve všech jeho třech podoblastech. V NTS se c-Jun pozitivní buňky po podání peptidu CART 61-102 nacházely především v jeho ventromediální oblasti (obrázek 15). Aktivita buněk v hypothalamických oblastech (ARC, PVN, VMN) nebyla ovlivněna ICV podáním peptidu CART 61-102 resp. Nle⁶⁷ CART 61-102 (obrázek 15). Kontrolní barvení řezů při vynechání primární, resp. sekundární protilátky bylo negativní.



Obrázek 14: Aktivace c-Jun v mozkových jádrech zapojených v regulaci příjmu potravy. Efekt po 90 min po ICV podání fyziologického roztoku, CART 61-102 v dávce 0,1 µg/myš a 1 µg/myš resp. analogu Nle⁶⁷ CART 61-102 v dávce 1 µg/myš hladovým myším ($n = 5$) na c-Jun aktivaci buněk v paraventriculárním jádře (PVN), nucleu arcuatu (ARC), dorsomediálním jádře (DMN), ventromediálním jádře (VMN) a v nucleu tractu solitarii (NTS). *^X $p < 0,05$ vs. fyziologický roztok v různých jádrech (DMN a NTS), # $p < 0,05$ vs. CART 61-102 0,1 µg/myš.



Obrázek 15: Aktivace c-Jun v buňkách DMN a NTS

Aktivace c-Jun pozitivních buněk 90 min po ICV podání peptidu CART 61-102 v dávce 1 $\mu\text{g}/\text{myš}$ (B, D) v porovnání s kontrolní skupinou injikovanou fyziologickým roztokem (A, C). Obrázek A, B zachycuje DMN a C, D zachycuje NTS. Reprezentativní obrázky řezů. Zkratky: třetí mozková komora (3V), area postrema (AP), dorsomediální jádro (DMN), nucleus tractus solitarii (NTS).

6.2 Studium lipidovaných analogů PrRP

Výsledky týkající se lipidovaných analogů PrRP byly publikovány v časopise *Journal of Physiology and Pharmacology* (viz příloha č. 3): Pražienková V., Tichá A., Blechová M., Špolcová A., Železná B., Maletínská L., Pharmacological characterization of lipidized analogs of prolactin-releasing peptide with a modified c-terminal aromatic ring, 2016, 121-128 (Pražienkova et al., 2016).

Výsledky z dlouhodobých experimentů na DIO myších byly publikovány v časopise *International Journal of Obesity* (viz příloha č. 4): Maletínská L., Nagelová V., Tichá A., Zemenová J., Pirník Z., Holubová M., Špolcová A., Mikulášková B., Blechová M., Sýkora D., Lacinová Z., Haluzík M., Železná B., Kuneš J., Novel lipidized analogs of prolactin-releasing peptide have prolonged half-lives and exert anti-obesity effects after peripheral administration, 2015, 986-93. doi: 10.1038/ijo.2015.28 (Maletinska et al., 2015).

6.2.1 Syntéza lipidovaných analogů PrRP31 a PrRP20

Sekvence přirozeného PrRP31 a jeho analogů jsou uvedeny v tabulce 1. Čistota peptidů byla určena pomocí HPLC a byla vyšší než 95%. Myristová a palmitová kyselina byla u lipidovaných analogů připojena na N-konec řetězce syntézou na pevné fázi. Nestabilní methionin v pozici 8, náchylný k oxidaci, byl nahrazen stabilnějším norleucinem. Tato substituce neovlivňuje biologickou aktivitu analogů (Maixnerova et al., 2011).

Pro další stabilizaci peptidové části byl fenylalanin v pozici 31 nahrazen naftylalaninem (1-Nal³¹) u analogů 1 – 3, dichlorofenylalaninem (PheCl₂³¹) u analogů 7 – 9, pentafluorofenylalaninem (PheF₅³¹) u analogu 10 a 11 nebo tyrosinem (Tyr³¹) u analogu 12 a 13 dle (Maletinska et al., 2011b).

U syntetizovaných analogů PrRP20 byly prováděny výměny aminokyselin v C-koncové části (číslování odvozeno z lidského/potkaního fragmentu PrRP19-31 Trp¹⁹ -Tyr²⁰ -Ala/Thr²¹ -Ser/Gly²² -Arg²³ -Gly²⁴ -Ile²⁵ -Arg²⁶ -Pro²⁷ -Val²⁸ -Gly²⁹ -Arg³⁰ -Phe³¹ -NH₂) dle (Boyle et al., 2005). Glycin v pozici 24 byl nahrazen sarkosinem u analogů a, b (Sar²⁴). Analogy e a f obsahovaly Ala²⁵ a Phe²⁸. Analogy c, d, g, h měly strukturu odvozenou od lidského PrRP20. U analogu c a d byly výměny v Ser²² a v pozici 21 N-methylalanin (N-Me-Ala²¹). U analogů g, h došlo k nahrazení za Pro²⁴ a Phe²⁵.

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

Vazebné experimenty byly prováděny na buněčné linii RC-4B/C, CHO-K1 s transfekovaným lidským GPR10 a buněčných membránách z CHO-K1 buněk s transfekovaným lidským NPFF2. Potkaní rPrRP31, analog s norleucinem Nle-PrRP31 i lipidované analogy PrRP31 se vážaly s K_i v nanomolární oblasti (tabulka 4). Inhibiční konstanta K_i stabilního analogu NPFF – 1DMe z kompetitivních vazebných experimentů na membránách s lidským NPFF2 činila 1,8 ± 0,54 nM. Lipidované analogy PrRP31 s mastnou kyselinou vykazovaly vyšší afinitu u buněčné linie RC-4B/C i na buněčných membránách s lidským NPFF2 než u analogů bez mastné kyseliny. Rovněž i u buněčné linie

s exprimovaným GPR10 byla afinita lipidovaných analogů vyšší oproti přirozenému rPrRP31. Analogy 5 a 6 (s PheCl₂³¹) s myristovou nebo palmitovou kyselinou či palmitoylovaný analog 9 (s PheNO₂³¹) vykazoval velmi vysokou afinitu ke GPR10 a NPFF2. U palmitoylovaného analogu 3 (1-Nal³¹) a analogu 11 (PheF₅³¹) byla pak afinita k lidskému NPFF2 o řád vyšší než afinita rPrRP31 a byla řádově srovnatelná se stabilním analogem 1DMe. Stejný trend vykazovaly i lipidované analogy PrRP20 s myristovou kyselinou, které měly v sekvencích různé záměny v aminokyselinách navržené dle studie Boyle a kol. (Boyle et al., 2005).

Tabulka 4: Charakterizace lipidovaných analogů PrRP31a PrRP20 pomocí vazebných experimentů

Název	potkaní RC-4B/C ¹²⁵ I-rPrRP31 K _i [nM]	lidský GPR10 ¹²⁵ I-hPrRP31 K _i [nM]	lidský NPFF ₂ ¹²⁵ I-1DMe K _i [nM]
potkaní rPrRP31	2,39 ± 0,11	3,91 ± 0,21	57,1 ± 15,5
Nle-PrRP31	1,28 ± 0,20	1,87 ± 0,42	49,6 ± 3,4
myr-PrRP31	0,69 ± 0,09	0,69 ± 0,09	1,59 ± 0,32
palm-PrRP31	0,51 ± 0,15	2,94 ± 0,33	0,91 ± 0,31
K¹¹palm-hPrRP31	4,76 ± 1,96	6,20 ± 0,76	5,59 ± 1,33
analog 1	83,3 ± 2,60	33,6 ± 15,6	24,3 ± 3,82
analog 2	3,95 ± 1,22	1,30 ± 0,21	NT
analog 3	0,85 ± 0,15	3,82 ± 0,37	0,41 ± 0,06
analog 4	3,83 ± 0,94	1,73 ± 0,35	14,0 ± 3,18
analog 5	0,60 ± 0,22	0,92 ± 0,32	3,08 ± 0,01
analog 6	1,32 ± 0,29	1,02 ± 0,40	1,93 ± 0,53
analog 7	19,9 ± 5,96	4,66 ± 0,85	352 ± 0,03
analog 8	0,71 ± 0,12	0,53 ± 0,17	NT
analog 9	0,58 ± 0,10	0,74 ± 0,27	11,8 ± 2,94
analog 10	12,8 ± 2,22	8,36 ± 1,17	13,8 ± 0,02
analog 11	0,51 ± 0,08	1,86 ± 0,52	0,24 ± 0,05
analog 12	3,23 ± 0,15	1,97 ± 0,08	NT
analog 13	0,22 ± 0,01	1,53 ± 0,38	317 ± 140
potkaní rPrRP20	2,62 ± 0,31	4,4 ± 0,77	21,8 ± 9,91
myr-PrRP20	1,44 ± 0,34	4,21 ± 0,24	8,23 ± 1,97
analog a	4,20 ± 0,37	4,39 ± 1,45	NT
analog b	0,32 ± 0,07	3,04 ± 0,36	NT
analog c	49,4 ± 9,35	8,48 ± 2,16	NT
analog d	0,46 ± 0,05	2,04 ± 0,75	NT
analog e	655 ± 164	284 ± 47,6	NT
analog f	7,21 ± 0,71	8,24 ± 3,09	NT
analog g	2,14 ± 0,53	1,69 ± 0,22	NT
analog h	0,84 ± 0,17	0,57 ± 0,26	NT

NT - netestováno

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

6.2.3 Afinita analogů PrRP31 k Y5 receptoru transfekovaném v buněčné linii U2OS

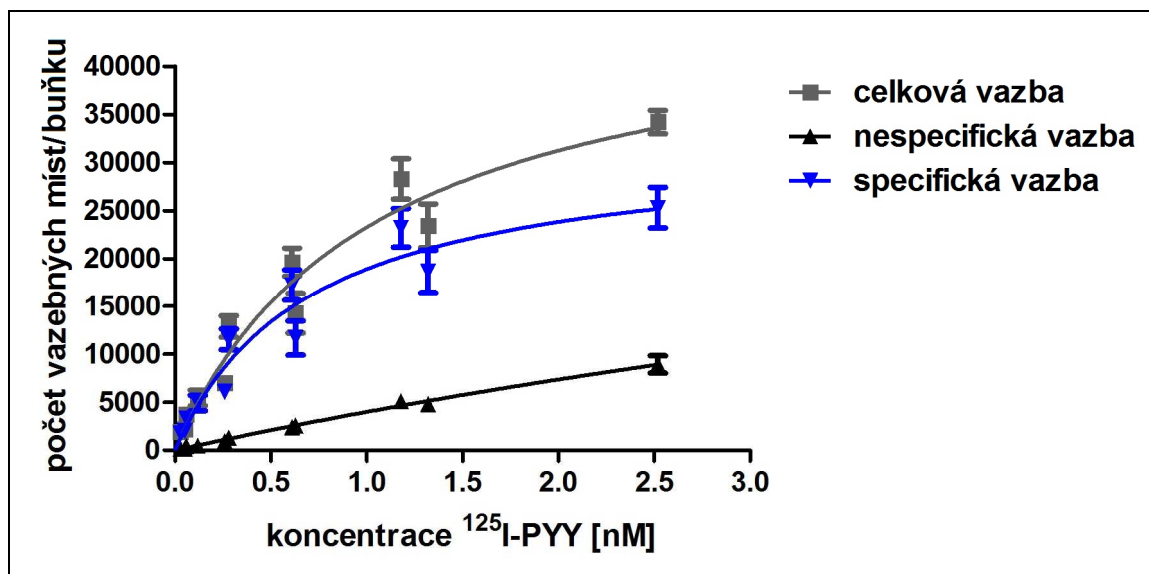
Pro zjištění optimálních podmínek pro vazebné experimenty byla porovnávána celková a nespecifická vazba, která by měla za optimálních podmínek představovat maximálně 15% celkové vazby.

Jako optimální byla stanovena doba inkubace 120 min, kdy se tato doba rovněž shodovala s informacemi z literatury. V kompetitivních pokusech byly buňky U2OS pěstovány ve 24-jamkových destičkách z různého počtu (40, 100 a 150 tisíc buněk/jamku). V den pokusu byla finální hustota buněk přibližně 120, 150 a 300 tisíc buněk/jamku. Byl zvolen optimální počet buněk při nalévání 40000 buněk/jamku, protože vyšší počet buněk už výrazně nezlepšil poměr nespecifické a celkové vazby (tabulka 5).

Tabulka 5: Celková a nespecifická vazba při různých počtech buněk

počet nalitých buněk/jamku	celková vazba [cpm]	nespecifická vazba [cpm]	nespecifická/celková vazba [%]
40000	1895 ± 21	231 ± 2,1	12
100000	5186 ± 560	725 ± 40	14
150000	4660 ± 415	734 ± 68	16

Ze saturačních vazebných experimentů na buněčné linii U2OS s transfekovaným Y5 receptorem byla určena hodnota K_d $1,01 \pm 0,27$ nM a počet vazebných míst B_{max} 36770 ± 2590 vazebných míst/buňku. Byla použita zvyšující se koncentrace radioligandu ^{125}I -PYY ve finálních koncentracích 0,05 – 2 nM a pro zjištění nespecifické vazby byl použit neradioaktivní PYY ve finální koncentraci 10^{-6} M. Saturační vazebná křivka je uvedena na obrázku 16.



Obrázek 16: Saturační vazebné experimenty na buněčné linii U2OS s transfekovaným Y5 receptorem

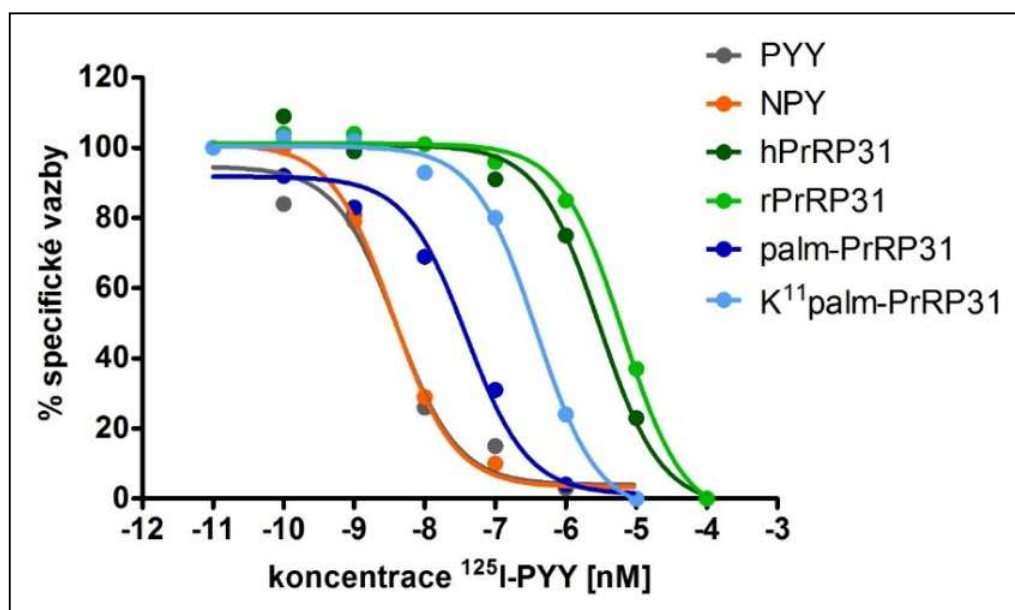
Saturační vazebné experimenty na U2OS buňkách, které byly inkubovány 120 min při 25°C se zvyšující se koncentrací $^{125}\text{I-PYY}$. Nespecifická vazba byla určena v přítomnosti PYY 10^{-6} M. Hodnota K_d byla $1,01 \pm 0,27$ nM a B_{max} 36770 ± 2590 vazebných míst/buňku.

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny dle podmínek popsanych v kapitole 5.4.4., kdy byly buňky inkubovány s peptidy o zvyšující se finální koncentraci v rozmezí 10^{-11} – 10^{-4} M a s 0,1 nM $^{125}\text{I-PYY}$. Přírodní ligandy PYY a NPY se vázaly na receptor Y5 s vysokou afinitou, kdy se K_i pohybovaly v nanomolární oblasti (tabulka 6, obrázek 17). Hodnota K_i přírodního PrRP31 a PrRP20 byla v řádu 10^{-6} M (tabulka 6, obrázek 17). U testovaných vybraných lipidovaných analogů palm-PrRP31 a $\text{K}^{11}\text{palm-hPrRP31}$ byla afinita k Y5 receptoru vyšší a hodnoty K_i se pohybovaly v řádu 10^{-7} – 10^{-8} M (tabulka 6, obrázek 17).

Tabulka 6: Afinita přirozeného PrRP31 a lipidovaných analogů PrRP31 k Y5 receptoru

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

Hodnota K_i byla vypočítána ze změřených hodnot IC₅₀ z Cheng-Prusoffovy rovnice. Data byla měřena v duplikátech v nejméně třech nezávislých experimentech a jsou uvedena jako průměr ± SEM. Koncentrace radioligandu ¹²⁵I-PYY byla 0,1 nM a nespecifická vazba byla určena pomocí neznačeného PYY 10⁻⁵ M.

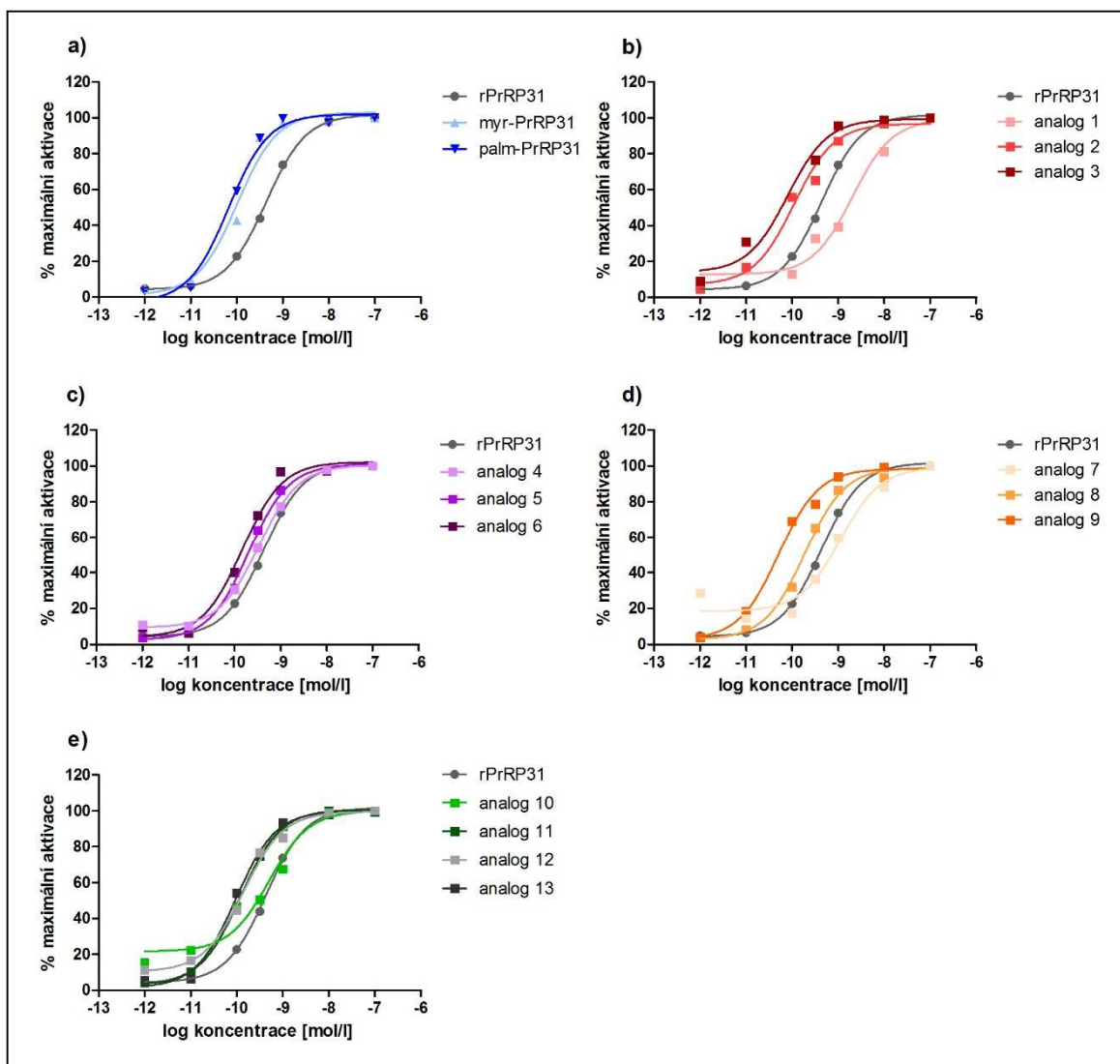


Obrázek 17: Reprezentativní kompetitivní vazebné křivky na buněčné linii U2OS s transfekovaným Y5 receptorem

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny na buňkách s transfekovaným Y5 receptorem, které byly inkubovány 120 min při 25°C. Koncentrace radioligandu ¹²⁵I-PYY byla 0,1 nM a nespecifická vazba byla určena pomocí neznačeného PYY 10⁻⁵ M. Pokusy byly prováděny v duplikátech nejméně třikrát. Graf znázorňuje reprezentativní vazebné křivky.

6.2.4 Aktivace beta-laktamázového reportérového genu

Přirozený PrRP31 a lipidované analogy PrRP31 aktivoval beta-laktamázový reportérový gen v CHO-K1 buňkách s transfekovaným GPR10 s efektivní koncentrací EC_{50} v subnanomolární oblasti (tabulka 7, obrázek 18 a – e). Analogy s mastnou kyselinou prokazovaly silnější agonistický účinek v porovnání s přirozeným PrRP31 či nelipidovanými analogy PrRP31.



Obrázek 18: Agonistický účinek lipidovaných analogů PrRP31.

Buňky byly inkubovány se zvyšující se koncentrací peptidů: **a)** rPrRP31, myr-PrRP31 a palm-PrRP31, **b)** analogy 2, 3 s $1-Nal^{31}$, **c)** analogy 5, 6 s $PheCl_2^{31}$, **d)** analogy 7, 8 s $PheNO_2^{31}$, **e)** analog 11 s $PheF_5^{31}$, analog 13 s Tyr^{31} . Reprezentativní křivky jsou vyneseny jako % maximální aktivace v závislosti na logaritmu koncentrace peptidů.

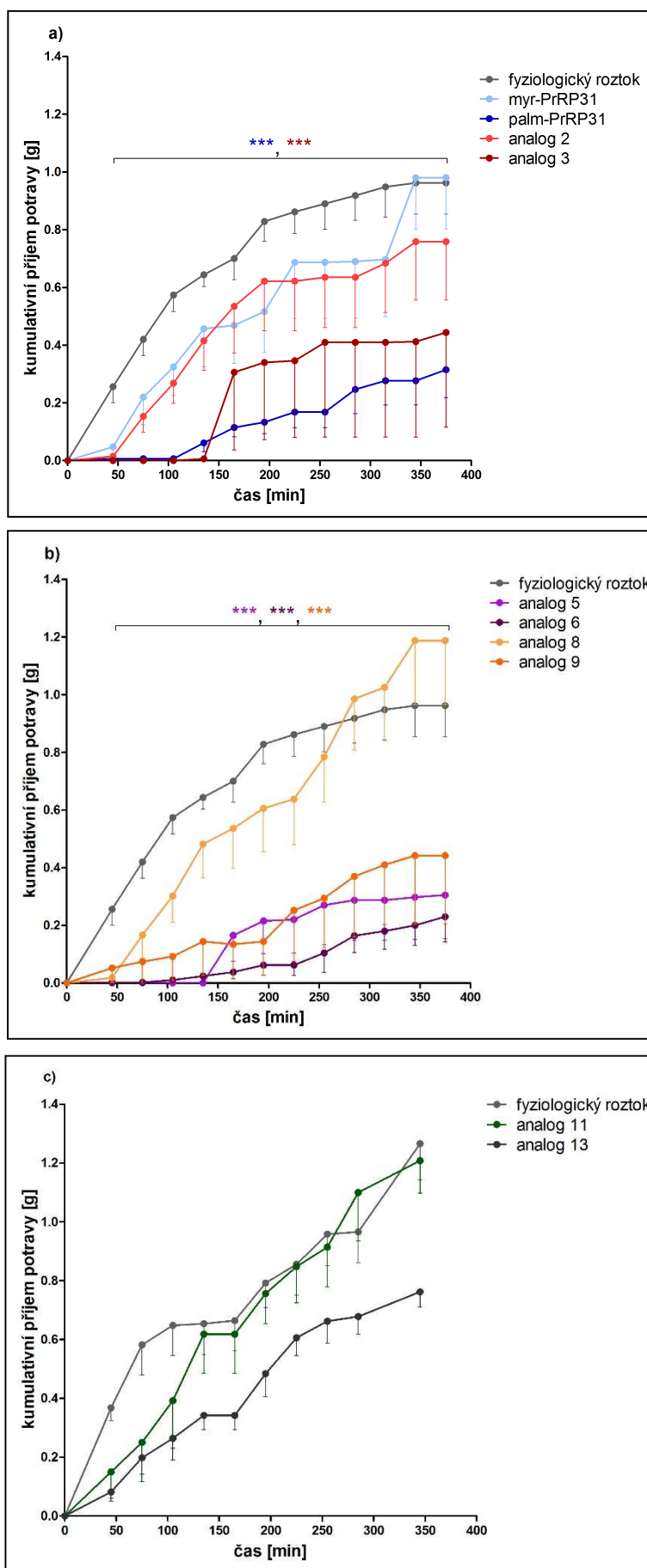
Tabulka 7: Biologické účinky analogů PrRP *in vitro* a *in vivo*

Analog	aktivace <i>bla</i> reportérového genu na CHO-K1 s transfekovaným GPR10 EC ₅₀ [pM]	příjem potravy na hladových myších (5mg/kg SC) [% kontroly] (45 min)
fyziologický roztok		100 ± 9,3
potkaní rPrRP31	359 ± 79	113 ± 10
Nle-PrRP31	NT	NT
myr-PrRP31	102 ± 12	9,5 ± 6,5
palm-PrRP31	70 ± 3	13,2 ± 6,2
analog 1	1681 ± 212	NT
analog 2	71 ± 21	4,9 ± 2,7
analog 3	37 ± 16	0,5 ± 0,3
analog 4	238 ± 57	NT
analog 5	232 ± 34	1,2 ± 0,6
analog 6	146 ± 16	0,7 ± 0,4
analog 7	940 ± 97	NT
analog 8	170 ± 11	4,9 ± 4,3
analog 9	37 ± 10	0,4 ± 0,3
analog 10	472 ± 47	NT
analog 11	120 ± 18	31,3 ± 13,6
analog 12	116 ± 15	NT
analog 13	85 ± 5	20,1 ± 5,7

Data z *in vitro* experimentů byla měřena v duplikátech v nejméně třech nezávislých experimentech. Příjem potravy na hladových myších byl vyhodnocen v čase největšího účinku (45 min), $n = 5$. Hodnoty jsou uvedeny jako % příjmu potravy kontrolní skupiny injikované fyziologickým roztokem. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. NT - netestováno

6.2.1 Účinek lipidovaných analogů PrRP v krátkodobém podávání u hladových myší

Data z krátkodobého příjmu potravy na hladových myších jsou vyjádřena v tabulce 7 a obrázku 19 a 20. Po SC podání přirozeného PrRP31 nedošlo k ovlivnění příjmu potravy. V souladu s daty získanými z *in vitro* experimentů, myristoylovaný a palmitoylovaný PrRP31 výrazně snížil příjem potravy. Palm-PrRP31 vykazoval silnější a dlouhodobější anorexigenní účinek než myr-PrRP31 (obrázek 19 a). Anorexigenní účinek a stejný trend vykazovaly rovněž analogy 2 a 3 s 1-Nal³¹ (obrázek 19 a) či analogy 8 a 9 s PheNO₂³¹ (obrázek 19 b). Analogy 11 a 13 snižovaly příjem potravy, ale jejich účinek byl slabší oproti jiným lipidovaným analogům (obrázek 19 c).



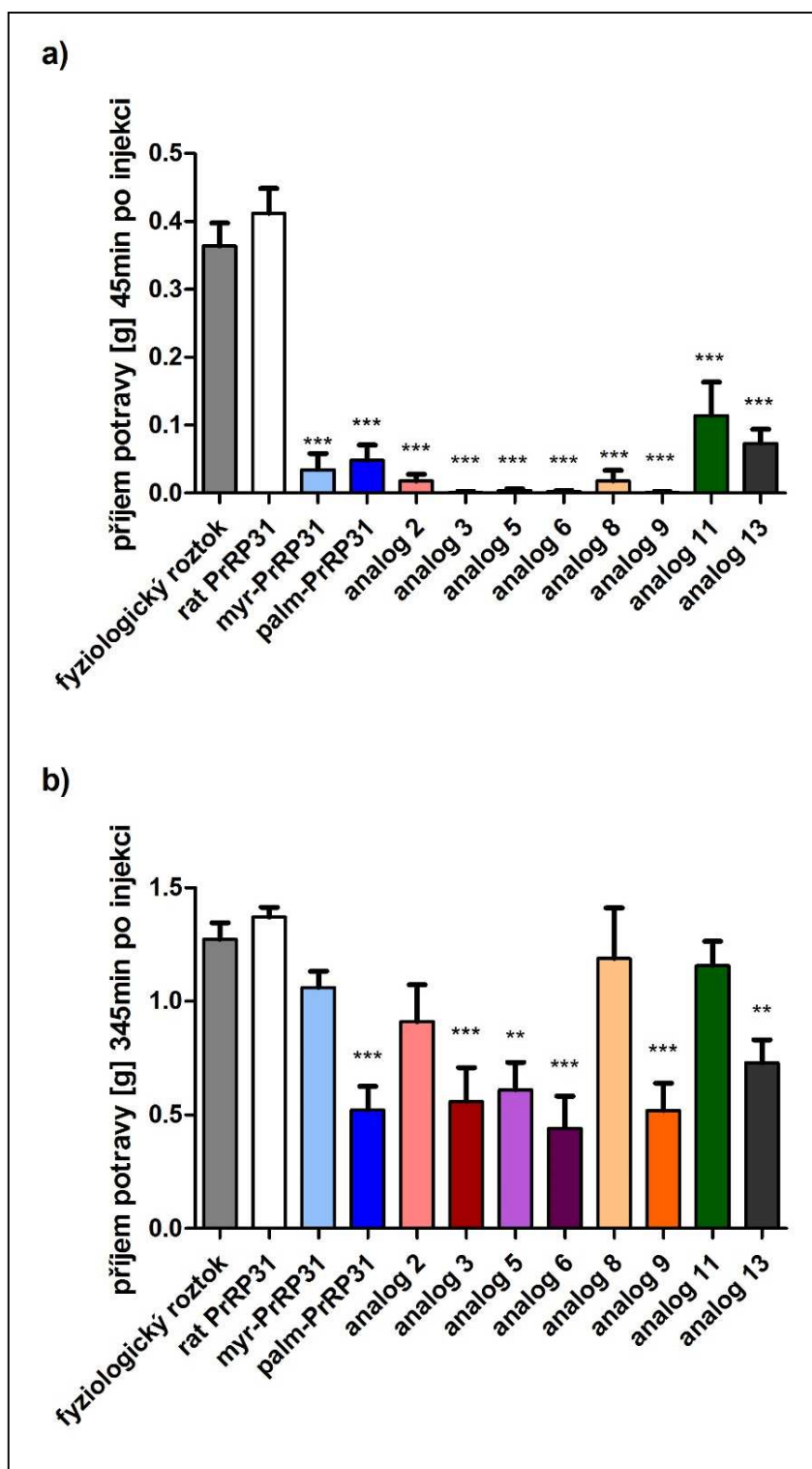
Obrázek 19: Akutní účinek na příjem potravy po podání lipidovaných analogů PrRP31

Látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a podány v dávce 5 mg/kg SC. Příjem potravy byl měřen po dobu 6 hod, ve skupině $n = 5 - 6$.

Kumulativní příjem potravy po podání

a) myr-PrRP31, palm-PrRP31 a analogu 2 a 3 s 1-Nal^{31} ,
b) analogu 5 a 6 s PheCl_2^{31} ,
 analogu 8 a 9 s PheNO_2^{31} ,
c) analogu 11 s PheF_5^{31} a analogu 13 s Tyr^{31} .

Grafy znázorňují reprezentativní výsledky ze tří nezávislých pokusů. Data byla analyzována jednocestnou analýzou rozptylu, po které následoval Dunnettův test. Signifikance je *** $p < 0,001$ oproti kontrole, injikované fyziologickým roztokem.



Obrázek 20: Příjem potravy v době maximálního účinku (45 min po injekci) a na konci pokusu (345 min po injekci)

Příjem potravy po SC podání lipidovaných analogů PrRP31 **a)** 45 min po injekci a **b)** 345 min po podání. Hodnoty znázorňují reprezentativní výsledky ze třech nezávislých pokusů. Signifikance je ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ oproti kontrole, injikované fyziologickým roztokem.

6.2.2 Účinky lipidovaných analogů PrRP v dlouhodobém podávání DIO myším

Pro dlouhodobé testování lipidovaných analogů PrRP byly použity látky, které v krátkodobých testech prokázaly výrazný vliv na snížení příjmu potravy. Po čtrnáctidenním podávání myristoylovaného PrRP20, palmitoylovaného PrRP31 a analogu 6 s PheCl₂³¹ v dávce 5 mg/kg došlo k signifikantnímu snížení příjmu potravy oproti kontrolní skupině, které byl po celou dobu podáván fyziologický roztok (obrázek 21 a). Palm-PrRP31 vykazoval silnější anorexigenní účinek.

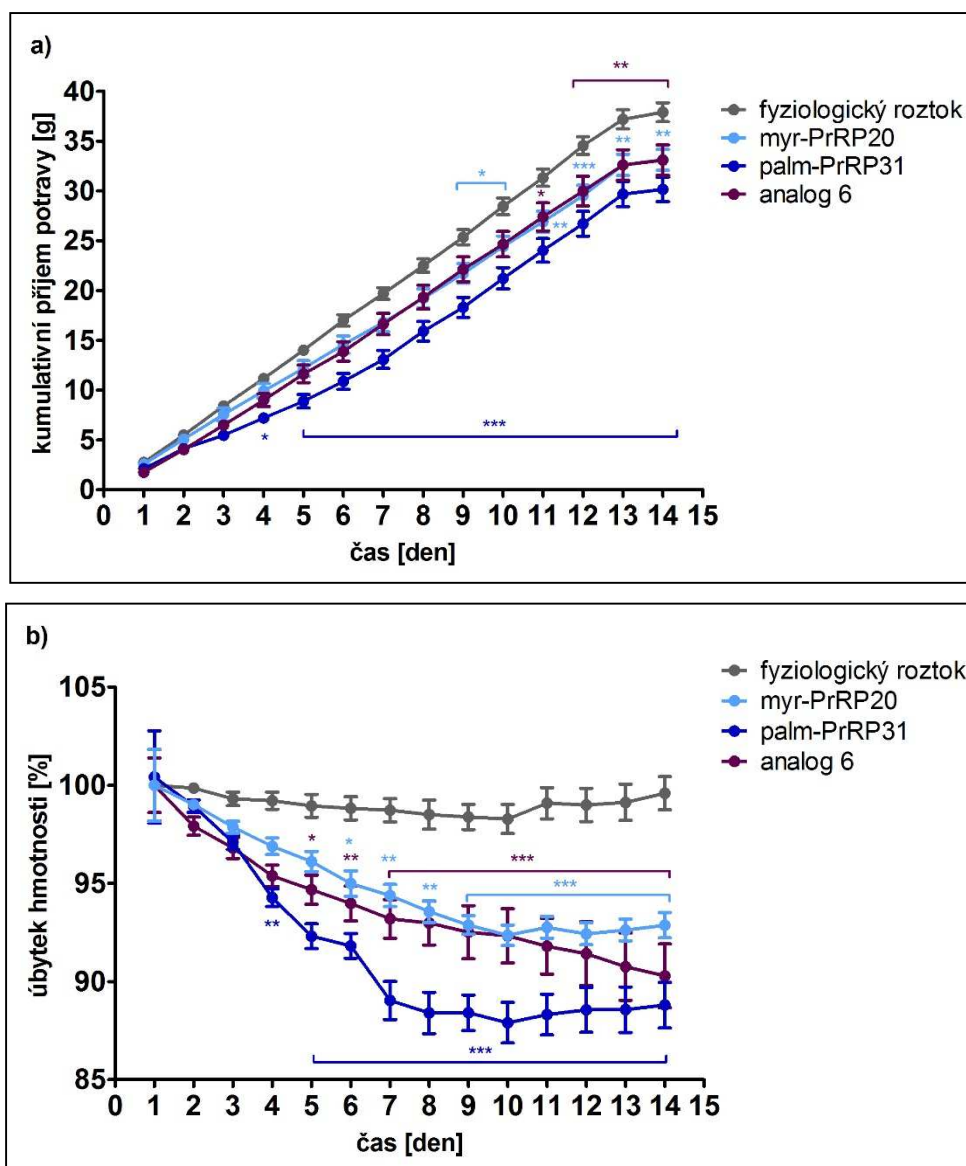
Všechny tři látky velmi výrazně snížily hmotnost u myši (obrázek 21 b). Úbytek průměrné tělesné hmotnosti po čtrnáctidenním podávání myr-PrRP20 byl o 7 %, po podávání analogu 6 o 10 % a po podávání palm-PrRP31 o 12 % původní hmotnosti. U kontrolní skupiny injikované fyziologickým roztokem nedošlo ke snížení tělesné hmotnosti.

Po SC podávání analogu palm-PrRP31 došlo k velmi výraznému snížení celkové hmotnosti tukové tkáně, způsobeného především výrazným snížením množství podkožního a perirenálního tuku. Snížení hmotnosti intraperitoneální tukové tkáně nebylo statisticky významné. Po SC podávání myr-PrRP20 a analogu 6 s PheCl₂³¹ nedošlo ke statisticky významnému snížení celkové tukové tkáně. Žádný ze tří analogů signifikantně nesnížil hmotnost jater (tabulka 8).

Tabulka 8: Hmotnosti tukové tkáně a jater po 14-denním SC podávání lipidovaných analogů PrRP u DIO myši

skupina	celková tělesná hmotnost [g]	celkový tuk / celková tělesná hmotnost [%]	SCAT / celková tělesná hmotnost [%]	IPAT / celková tělesná hmotnost [%]	perirenální tuk / celková tělesná hmotnost [%]	játra / celková tělesná hmotnost [%]
fyziologický roztok	47,6 ± 0,8	16,2 ± 0,4	8,1 ± 0,3	4,7 ± 0,3	2,9 ± 0,1	4,1 ± 0,2
myr-PrRP20	44,1 ± 0,8	15,3 ± 0,4	7,1 ± 0,20	5,1 ± 0,4	2,8 ± 0,1	3,6 ± 0,2
palm-PrRP31	41,4 ± 1,1	12,7 ± 0,7 ***	5,38 ± 0,49 ***	4,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2 ***	3,6 ± 0,1
analog 6	43,9 ± 1,1	14,9 ± 0,9	7,10 ± 0,48	4,5 ± 0,3	2,8 ± 0,3	3,6 ± 0,2

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, n = 10. Hmotnosti tkání jsou vztaženy na celkovou tělesnou hmotnost zvířete. Data byla analyzována pomocí jednocestné analýzy rozptylu, po které následoval Dunnettův test. Signifikance je *** p < 0,001 vs. kontrolní skupina injikovaná fyziologickým roztokem. SCAT – podkožní tuk, IPAT – vnitrobřišní tuk.



Obrázek 21: Příklad příjem potravy a tělesná hmotnost po 14-ti denním podávání lipidovaných analogů PrRP u DIO myši

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

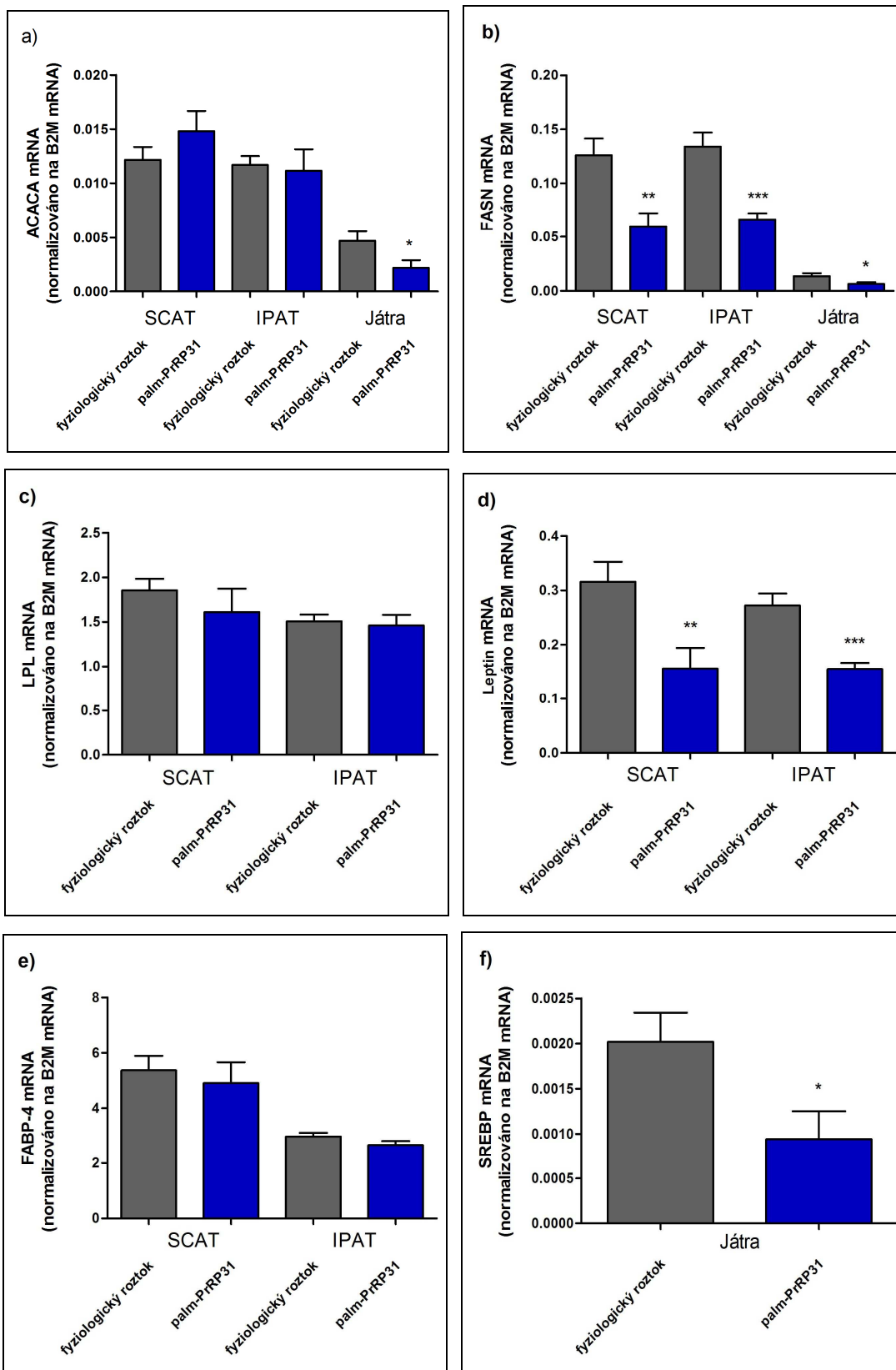
Dlouhodobé podávání myristoylovaného PrRP20 a palmitoylovaného PrRP31 výrazně snížilo hladiny leptinu v plasmě a toto snížení bylo úměrné ke snížené hmotnosti tukové tkáně. Hladina insulinu v plasmě byla signifikantně snižena po podávání palm-PrRP31. Hladiny glukosy a triglyceridů nebyly významně sníženy (tabulka 9).

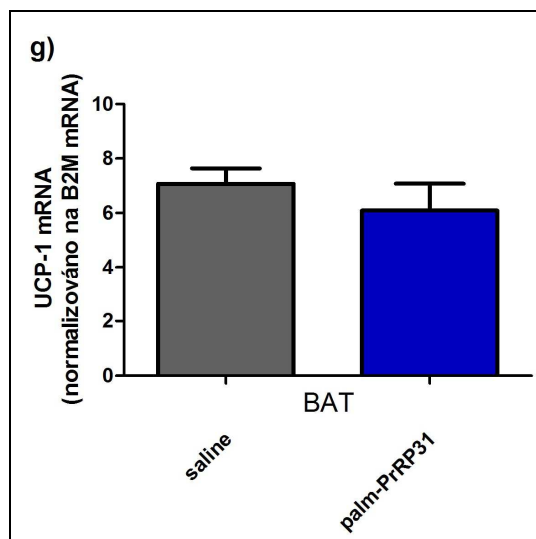
Tabulka 9: Metabolické parametry po 14-denním SC podávání lipidovaných analogů PrRP u hladových DIO myší

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

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

Čtrnáctidenní podávání palm-PrRP31 vedlo v játrech ke snížené expresi mRNA enzymů lipogeneze ACACA, FASN a transkripčního faktoru SREBP (obrázek 22 a, b, f). V podkožní tukové tkáni (SCAT) došlo ke snížení exprese mRNA FASN a leptinu (obrázek 22 b, d). Snížená exprese FASN a leptinu byla rovněž i v intraperitoneální tukové tkáni (IPAT) (obrázek 22 b, d). Palm-PrRP31 neměl vliv na hladiny ACACA u obou tukových tkání, neovlivňoval expresi lipoproteinové lipasy (LPL) ani expresi mRNA FABP-4 (obrázek 22 a, c, e). Exprese mRNA UCP-1 v hnědé tukové tkáni nebyla signifikantně ovlivněna (obrázek 22 g).





Obrázek 22: Expres mRNA pro markery metabolismu tuků v tukových tkáních (a – e) a v játrech (a, b, f) a pro marker termogeneze (g) v BAT

Expres **a)** ACACA v podkožní tukové tkáni, vnitrobřišní tukové tkáni a v játrech, **b)** FASN v podkožní tukové tkáni, vnitrobřišní tukové tkáni a v játrech, **c)** LPL v podkožní tukové tkáni a vnitrobřišní tukové tkáni, **d)** leptinu v podkožní tukové tkáni a vnitrobřišní tukové tkáni, **e)** FABP-4 v podkožní tukové tkáni a vnitrobřišní tukové tkáni, **f)** SREBP v játrech a **g)** UCP-1 v hnědé tukové tkáni.

7. DISKUSE

7.1 Peptid CART a jeho analogy

Peptid CART byl objeven v roce 1998 a přes všechny snahy o identifikaci není stále znám jeho receptor. V naší laboratoři byla nalezena specifická vazba peptidu CART k přirozeným feochromocytomovým buňkám PC12 a buňkám diferencovaným v neuronový fenotyp (Maletínská et al., 2007). Naše další studie *in vitro* na této buněčné linii a rovněž na ovlivnění příjmu potravy *in vivo* testovaly nové analogy peptidu CART a byl zkoumán nejen vztah mezi strukturou a aktivitou analogů, ale rovněž i signalizace peptidu CART do buňky, která by mohla přispět k charakterizaci vazebného místa (příloha č. 1).

7.1.1 Specifická vazba peptidu CART na buněčné linii PC12

Vazba peptidu CART k různým buněčným liniím byla dosud publikována pouze v několika pracích. Vicentic a kol. publikovali specifickou vazbu ^{125}I -CART 61-102 na myší hypofyzární buněčnou linii AtT20 (Vicentic et al., 2005), avšak tyto výsledky se v naší laboratoři nepodařilo reprodukovat. V naší předchozí studii (Maletínská et al., 2007) byla prokázána specifická vazba na buněčnou linii PC12. Buňky PC12 jsou schopny diferencovat se pomocí NGF či PACAP na neurony a pomocí glukokortikoidu dexametasonu na chromafinní buňky (Adler et al., 2006). Účinkem peptidu CART nedošlo k žádné morfoloické změně v buňkách PC12 (naše nepublikované výsledky).

Po diferenciaci PC12 na buňky nervové tkáně pomocí NGF a PACAP došlo k výraznému zvýšení počtu vazebných míst/buňku. Naopak po diferenciaci na chromafinní buňky byl počet vazebných míst tak nízký, že nebylo možné jeho určení. To znamená, že vazebná místa pro peptid CART se exprimují spíše v nervové tkáni a tumoru dřeně nadledvin, než v normálních chromafinních buňkách.

7.1.2 Význam jednotlivých disulfidových můstků peptidu CART pro jeho biologickou aktivitu

V naší další studii (příloha č. 2) byl testován význam disulfidových můstků, vytvořených mezi dvojicemi cysteinů (Blechová et al., 2013). Metodou tzv. Ala-scanu byly nahrazovány dvojice cysteinů za alaniny a peptidy byly syntetizovány metodou na pevné

fázi. Dále byl syntetizován analog Nle⁶⁷ CART 61-102, u kterého byl pro zvýšení stability methionin v pozici 67, který je náchylný k oxidaci, nahrazen za norleucin.

Pomocí kompetitivních vazebných experimentů na buněčné linii PC12 byla studována afinita peptidu CART 61-102 a jeho analogů Nle⁶⁷ CART 61-102 a [Ala^{68,86}] CART 61-102. Záměna aminokyseliny v analogu Nle⁶⁷ CART 61-102 neovlivnila schopnost analogů vázat se na buněčnou linii PC12. Afinita byla srovnatelná s přirozeným peptidem CART 61-102 a hodnoty K_i obou peptidů se pohybovaly v nanomolární oblasti. Z výše zmíněných dalších analogů pouze analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 obsahující dva disulfidové můstky v pozici 74-94 a 88-101 a alaniny v pozici 68, 86 místo třetího disulfidového můstku vykazoval afinitu k vazebným místům v buňkách PC12 s hodnotou K_i o řád nižší než u přirozeného peptidu CART a anorexigenní vlastnosti.

V *in vivo* testech sledujících příjem potravy po centrálním podání byly použity analogy peptidu CART, Nle⁶⁷ CART 61-102 a [Ala^{68,86}] CART 61-102 s vysokou afinitou k buněčné linii PC12 a přirozený peptid CART 61-102. Po ICV podání peptidu CART 61-102 hladovým myším v dávce 1 $\mu\text{g}/\text{myš}$ došlo k výraznému anorexigenímu účinku. Tato dávka je srovnatelná s předchozími studiemi (Bannon et al., 2001; Kristensen et al., 1998; Maletínská et al., 2007; Thim et al., 1998).

Analog Nle⁶⁷ CART 61-102 ve stejné dávce jako peptid CART 61-102 po ICV podání významně snižoval příjem potravy u hladových myší oproti kontrolní skupině injikované fyziologickým roztokem. U analogu [Ala^{68,86}] CART 61-102 byly použity dávky 1 a 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$, neboť ve vazebných experimentech vykazoval o řád nižší afinitu k PC12 buňkám. V čase největšího účinku při 45 min po podání látky významně snižoval příjem potravy v obou dávkách a anorexigenní účinek byl dávkově závislý.

Účinky obou analogů jsou srovnatelné s účinky přirozeného peptidu CART 61-102, ovšem pro analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 ve vyšší dávce. Peptidy vykazovaly výrazný dlouhodobý účinek, který byl patrný i na konci experimentu po 5 hodinách, což naznačuje vysokou stabilitu peptidů.

Pro zachování afinity k buněčné linii PC12 jsou nezbytné dva disulfidové můstky v pozici 74-94 a 88-101. Analog [Ala^{68,86}] CART 61-102 může být použit jako základ pro strukturně-aktivitní studie, neboť jeho syntéza je jednodušší oproti syntéze celého přirozeného peptidu.

7.1.3 Signalizace peptidu CART v buňkách PC12

Vzhledem k tomu, že stále nebyl nalezen receptor pro peptid CART, mnohé laboratoře se pokoušely o identifikaci jeho molekuly a signalizačních drah. V jedné z prvních studií bylo zjištěno, že peptid CART stimuluje fosforylaci Erk1/2 v hypofyzární buněčné linii AtT20 (Lakatos et al., 2005) a PC12 (Lin et al., 2011). Rovněž byla publikována fosforylace Erk1/2 a CREB zvýšená peptidem CART v buněčné insulinové linii INS-1 a izolovaných potkaních pankreatických ostrůvcích (Sathanoori et al., 2013). V naší laboratoři jsme nepozorovali aktivaci dráhy Erk1/2 a CREB peptidem CART, ani jeho analogem Nle⁶⁷ CART 61-102 v buňkách PC12 oproti práci (Lin et al., 2011). Buňky byly ve studii Lin a kol. diferencovány NGF a PACAP, které mohly v buňkách PC12 samy stimulovat Erk1/2. V naší studii rovněž nebyl pozorován žádný vliv peptidu CART na diferenciaci a proliferaci, které bývají důsledkem fosforylace Erk1/2 (naše nepublikované výsledky).

Kromě zmíněného Erk1/2 a CREB byly v buňkách PC12 sledovány různé signalizační dráhy, které by mohl peptid CART stimulovat (schéma 1). Byla studována aktivace c-Fos, c-Jun na úrovni proteinu a fosforylace JNK a p38. U buněk PC12 došlo k významné fosforylaci JNK a k následné aktivaci c-Jun po inkubaci s peptidem CART či jeho analogem Nle⁶⁷ CART 61-102. Tyto výsledky byly podpořeny použitím specifického inhibitoru JNK kinasy SP600125, který aktivaci c-Jun a fosforylaci JNK po podání peptidu CART blokoval. Ačkoliv může být aktivace c-Jun způsobena i fosforylací Erk1/2, předpokládáme, že efekt byl způsoben právě fosforylací JNK, neboť peptid CART fosforylaci Erk1/2 nestimuloval.

Peptid CART a Nle⁶⁷ CART 61-102 nevýznamně zvýšily fosforylaci p38, která byla výrazně blokována selektivním inhibitorem SB203580. Peptid CART a Nle⁶⁷ CART 61-102 neovlivnily aktivaci proteinu c-Fos.

Popsané výsledky vedou k závěru, že peptid CART i jeho analog Nle⁶⁷ CART 61-102 v buňkách PC12 aktivují dráhu JNK, která je primárně indukovaná protizánětlivými cytokiny a stresovými podmínkami (Chang and Karin, 2001). Ačkoliv bylo popsáno, že aktivace c-Jun vede k diferenciaci buněk PC12 (Leppa et al., 2001), nepozorovali jsme žádnou diferenciaci peptidem CART. V jiné studii bylo ukázáno, že diferenciaci buněk PC12 vyžaduje kooperaci c-Jun a c-Fos (Eriksson et al., 2007). Vzhledem k tomu, že v buňkách PC12 nedošlo k aktivaci c-Fos po stimulaci peptidem CART, předchází fakt by to mohl vysvětlovat.

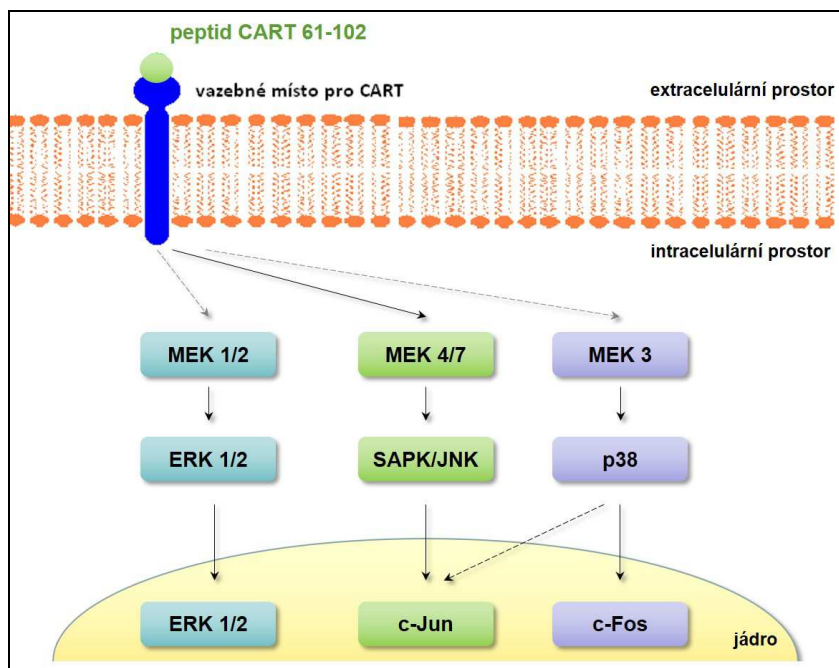


Schéma 1: Možné signalizační dráhy peptidu CART v buňkách PC12

7.1.4 Imunohistochemické stanovení aktivace c-Jun u hladových myší

V předchozích studiích byla publikována stimulace Fos neuronů po ICV podání peptidu CART v ARC, PVN, DMN a NTS (Maletínská et al., 2008; Vrang et al., 1999b). Protože z *in vitro* experimentů byla zjištěna stimulace jiného transkripčního faktoru, v *in vivo* experimentech byla testována aktivace c-Jun po ICV podání peptidu CART a Nle⁶⁷ CART 61-102 v oblastech mozku spojených s regulací příjmu potravy.

Mezi nejdůležitější hypothalamická jádra, ve kterých peptid CART ovlivňuje příjem potravy, patří ARC a PVN (Maletínská et al., 2008; Vrang et al., 1999a). Avšak u těchto jader nebyla pozorována aktivace c-Jun buněk peptidem CART.

Ve studii (Maletínská et al., 2008) bylo publikováno, že podání peptidu CART do třetí mozkové komory výrazně snížilo příjem potravy u přes noc hladových myší a stimulovalo Fos neurony v DMN. Na druhou stranu v jiné práci po podání peptidu CART přímo do DMN došlo k výraznému zvýšení příjmu potravy u potkanů (Hou et al., 2010). V této studii po podání peptidu CART došlo k významnému zvýšení počtu c-Jun imunopozitivních buněk v DMN a NTS. Tento fakt naznačuje zapojení peptidu CART do daleko komplexnějšího regulačního mechanismu v oblastech, které souvisejí s regulací příjmu potravy.

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

7.2 PrRP a jeho nové lipidované analogy

Ačkoliv mají neuropeptidy nízkou toxicitu a minimum vedlejších účinků, jejich klinický potenciál je limitován nízkou stabilitou a biodostupností ve fyziologických podmínkách. Rovněž anorexigenní neuropeptid PrRP je účinný pouze po centrálním podání do třetí mozkové komory a jeho centrální účinek po periferním podání je limitován průchodností přes BBB (schéma 2).

V naší laboratoři byly syntetizovány nové analogy PrRP s mastnou kyselinou připojenou přes amidovou vazbu (příloha č. 2 a 3). Jediným dosud známým přirozeným příkladem lipidovaného peptidového hormonu je ghrelin, který vzniká v žaludku a působí v hypothalamu. Tento peptid obsahuje kyselinu oktanovou připojenou přes esterovou vazbu na serin v pozici 3, která pravděpodobně umožňuje pasivní transport ghreluinu přes BBB (Pirnik et al., 2011). Novým syntetickým lipidovaným peptidem je analog GLP-1, liraglutid, který byl nejdříve využíván v léčbě diabetu mellitu 2. typu a nyní i k léčbě obezity a jeho stabilita v plasmě je zvýšena vazbou na sérový albumin (Gault et al., 2011).

Obecně se dá říci, že lipidizace peptidů zvyšuje jejich stabilitu v plasmě vazbou na albumin a umožňuje centrální účinek analogů po periferním podání a rovněž dochází ke zvýšení stability v plasmě těchto peptidů. Proto byly v naší laboratoři navrženy a testovány lipidované analogy PrRP s navázanou mastnou kyselinou o různé délce uhlíkového řetězce. Jako nejúčinnější se jeví analogy s myristovou či palmitovou kyselinou.

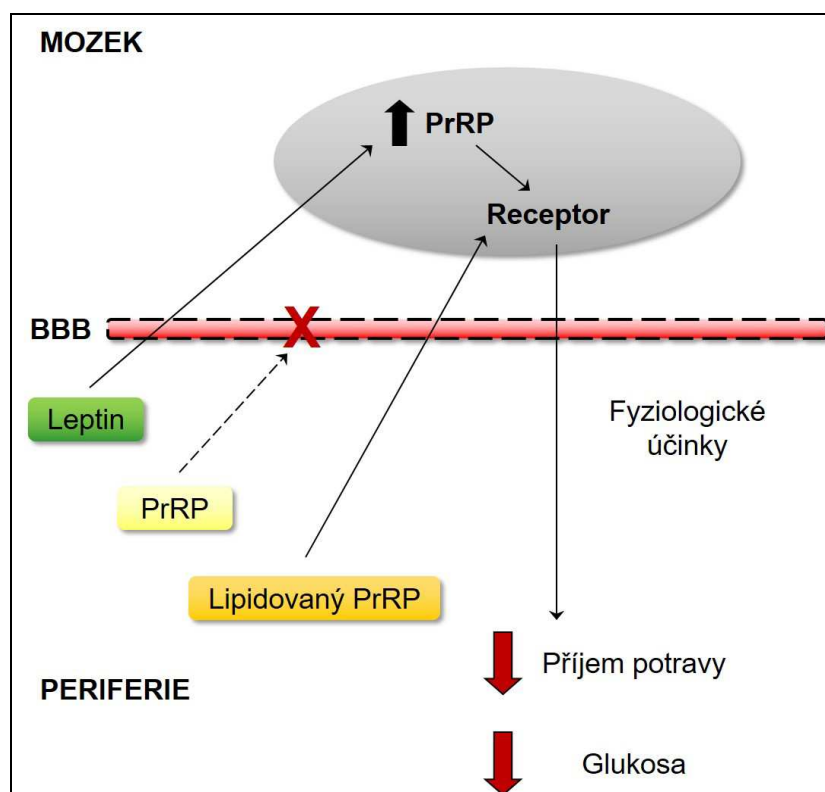


Schéma 2: Účinek lipidovaného vs. přirozeného PrRP po periferním podání

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

V předchozí naší studii (Maletinska et al., 2011b) jsme ověřili důležitost C-konce peptidového řetězce, který je pro PrRP20 i PrRP31 stejný a je zcela zásadní pro zachování biologické aktivity. Mastná kyselina o různé délce byla proto připojena na N-konec PrRP. Na PrRP20 byly připojeny mastné kyseliny o délce 8-14 uhlíků (kyselina oktanová, dekanová, dodekanová, myristová). Delší mastné kyseliny (kyselina palmitová a stearová) již výrazně negativně ovlivňovaly rozpustnost PrRP20. Na PrRP31 byly připojeny mastné kyseliny o délce 8-18 uhlíků. U PrRP31 s navázanou stearovou kyselinou byla limitním faktorem opět lipofilicita a rozpustnost peptidu, proto poté byly syntetizovány analogy s myristovou či palmitovou kyselinou. U analogu PrRP31, K¹¹palm-hPrRP31, byla mastná kyselina připojena na lysin v pozici 11. Tento analog vykazoval biologickou aktivitu srovnatelnou s palm-PrRP31.

Dále byly syntetizovány a ve studii použity lipidované analogy PrRP s myristovou nebo palmitovou kyselinou a s modifikací na C-konci podle naší předchozí studie (Maletinska et al., 2011b). V pozici 31 byl fenylalanin vyměněn za nekódové aminokyseliny 1-Nal, PheCl₂, PheF₅, PheNO₂ nebo za tyrosin. Tato výměna může zvyšovat biologickou aktivitu a stabilitu v důsledku větší odolnosti proti štěpení peptidasami.

Lipidované analogy PrRP s různou délkou řetězce mastné kyseliny mají zachovanou vysokou afinitu ke GPR10 receptoru s hodnotou K_i v nanomolární oblasti a k buněčné linii RC-4B/C, která endogenně exprimuje GPR10 a NPFF2 receptory. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky z předchozích studií, kdy byly ve vazebných experimentech testovány lidský a potkaní PrRP20 a PrRP31 s hodnotami K_i v nanomolární oblasti (Langmead et al., 2000). V *in vitro* experimentech byl dále potvrzen agonistický účinek lipidovaných analogů na GPR10 receptor. Přirozený PrRP31 i analogy s myristovou či palmitovou kyselinou byly prokázány jako agonisté GPR10. Lipidované analogy měly dokonce nižší EC_{50} (tedy vyšší účinek na aktivitu) než přirozený peptid.

Při vazebných experimentech na buněčné membrány s receptorem NPFF2 vykazovaly lipidované analogy vyšší afinitu ve srovnání s přirozeným PrRP20 či PrRP31 a to s K_i 10^{-9} M, což je hodnota srovnatelná se stabilním ligandem NPFF2 receptoru, 1DMe (Engstrom et al., 2003; Maletinska et al., 2013). Tento fakt naznačuje, že NPFF2 hraje důležitou roli v centrálním působení lipidovaných analogů PrRP.

Dalším testovaným receptorem ve vazebných studiích byl lidský receptor Y5 transfekovaný v buňkách U2OS. Vazba k Y5 receptoru přirozeného PrRP31 byla nízká a K_i stanovená kompetitivní vazbou se 125 I-PYY byla 10^{-6} M. Ovšem u vybraných testovaných analogů, palm-PrRP31 a K^{11} palm-hPrRP31, došlo k řádovému zvýšení vazebné afinity k receptoru Y5. Tento fakt může naznačovat, že Y5 receptor může hrát roli v účinku lipidovaných analogů PrRP a je potřeba další testování *in vivo* k prokázání účinku. Y5 receptor je zapojený do regulace příjmu potravy a přes tento receptor působí NPY, PYY či PP (Cabrele et al., 2000; Gerald et al., 1996). Po podání NPY či selektivního agonisty receptoru Y5 dochází ke zvýšení příjmu potravy u myši i potkanů (Cabrele et al., 2000). Antagonisté Y5 receptoru naopak příjem potravy snižují (Criscione et al., 1998). Je potřeba provést další experimenty s lipidovanými analogy PrRP a prověřit, zda mohou mít potenciálně antagonistický účinek na Y5 receptor.

7.2.2 Účinek lipidovaných analogů PrRP v krátkodobém podávání hladovým myším

Již dříve bylo prokázáno, že PrRP je anorexigenní faktor a jeho mRNA je exprimována v oblastech důležitých pro regulaci energetické rovnováhy, jako je DMN, NTS či VLM (Lawrence et al., 2000). Mnoho studií dále potvrdilo, že PrRP po ICV podání do třetí mozkové komory snižuje příjem potravy a zvyšuje energetický výdej a tělesnou teplotu (Ellacott et al., 2002; Lawrence et al., 2000; Maixnerova et al., 2011). Ellacott a kol. zjistili,

že u potkanů dochází po třídním centrálním podávání PrRP ke snížení vnímavosti k anorexigenním účinkům (Ellacott et al., 2003).

Lipidované analogy PrRP byly testovány v krátkodobém příjmu potravy u hladových myší s cílem určit jejich působení po podání do periferie. Ačkoliv v *in vitro* experimentech byly změřeny velmi podobné afinity lipidovaných analogů PrRP20 a PrRP31 ke GPR10 a všechny analogy měly agonistický účinek, pouze analogy s myristovou, palmitovou a stearovou kyselinou výrazně a dlouhodobě snížily příjem potravy u hladových myší. Z těchto výsledků vyplývá, že především analogy s myristovou či palmitovou kyselinou mají velký potenciál na snížení příjmu potravy po periferním podání. V krátkodobém příjmu potravy prokázaly silný anorexigenní účinek také analogy s modifikací na C-koncovém fenylyalaninu, a to především palmitoylovaný analog s 1-Nal³¹, myristoylovaný a palmitoylovaný analog s PheCl₂³¹ a palmitoylovaný PheNO₂³¹.

7.2.3 Účinek lipidovaných analogů PrRP v dlouhodobém podávání DIO myším

U krátkodobě nejúčinnějších analogů palm-PrRP31, myr-PrRP20 a analogu 6 s palm-PheCl₂³¹ byl dále testován dlouhodobý opakovaný účinek na příjem potravy a tělesnou hmotnost po periferním podání u myší s DIO. Chronické dvoutýdenní podávání lipidovaných analogů nevedlo k toleranci a anorexigenní účinek byl zachován po celou dobu experimentu.

Tělesná hmotnost u myší s DIO byla signifikantně snížena u všech skupin. Tělesná hmotnost u kontrolní skupiny na konci pokusu nebyla snížena a tato skutečnost naznačuje, že DIO myši nebyly po dobu experimentu stresovány častou manipulací či injekčním podáváním látek.

K nejvýraznějšímu snížení celkové hmotnosti tuku (zejména podkožního a perireálního) došlo ve skupině, které byl podáván palm-PrRP31. Úbytek tukové tkáně byl provázen výrazným snížením hladiny leptinu v plasmě, i jeho exprese v podkožní a intraperitoneální tukové tkáni. Snížené byly i hladiny mRNA pro FASN v podkožní a viscerální tukové tkáni.

U jater došlo po podávání všech tří látek pouze k mírnému, nesignifikantnímu snížení jejich hmotnosti. V játrech však byla snížena exprese mRNA lipogenetických enzymů ACACA a FASN a jejich transkripčního faktoru SREB, což naznačuje snížení *de novo* lipogeneze vlivem negativní energetické bilance způsobené sníženým příjmem potravy.

Po podávání analogu myr-PrRP20 a analogu 6 s palm-PheCl₂³¹ nedošlo k výraznému snížení hladiny krevní glukosy a insulinu v plasmě a ani hladiny triglyceridů nebyly signifikantně změněné. Palm-PrRP31 naopak snížil hladinu insulinu v plasmě.

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

8. ZÁVĚR

Studie týkající se peptidu CART a jeho analogů přispívá k objasnění vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou. Pomocí experimentů prováděných na buněčné linii PC12, obsahující vazebná místa pro peptid CART, jsme testovali vazebnou afinitu a možnou signalizační dráhu. Nejúčinnější analog peptidu CART byl rovněž testován v imunohistochemických experimentech a na příjem potravy po ICV podání hladovým myším.

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

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

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

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

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

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adler, E.M., Gough, N.R., Blundon, J.A., 2006. Differentiation of PC12 cells. *Sci STKE*. 2006, tr9.
- Arora, S., Anubhuti, 2006. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides*. 40, 375-401.
- Bagdade, J.D., Bierman, E.L., Porte, D., Jr., 1967. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest*. 46, 1549-57.
- Balland, E., Cowley, M.A., 2015. New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Front Neuroendocrinol*. 39, 59-65.
- Balthasar, N., et al., 2004. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron*. 42, 983-91.
- Banks, W.A., et al., 1996. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 17, 305-11.
- Bannon, A.W., et al., 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, 1021-6.
- Bechtold, D.A., Luckman, S.M., 2006. Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice. *Endocrinology*. 147, 4723-9.
- Bellmann-Sickert, K., Beck-Sickinger, A.G., 2010. Peptide drugs to target G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 31, 434-41.
- Bjursell, M., et al., 2007. GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 363, 633-8.
- Blechová, M., et al., 2013. New analogs of the CART peptide with anorexigenic potency: the importance of individual disulfide bridges. *Peptides*. 39, 138-44.
- Boyle, R.G., et al., 2005. Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide. *J Pept Sci*. 11, 161-5.
- Brasnjevic, I., et al., 2009. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Prog Neurobiol*. 87, 212-51.
- Briggs, D.I., Andrews, Z.B., 2011. Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. *Neuroendocrinology*. 93, 48-57.
- Broadwell, R.D., Brightman, M.W., 1976. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol*. 166, 257-83.
- Broberger, C., et al., 1999. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat vagus nerve: A putative mediator of cholecystokinin-induced satiety. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 13506-11.
- Bruning, J.C., et al., 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 289, 2122-5.
- Cabrele, C., et al., 2000. The first selective agonist for the neuropeptide YY5 receptor increases food intake in rats. *J Biol Chem*. 275, 36043-8.
- Clark, J.T., et al., 1984. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*. 115, 427-9.
- Cone, R.D., 2005. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*. 8, 571-8.
- Corp, E.S., et al., 1986. Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett*. 70, 17-22.

- Couceyro, P.R., Koylu, E.O., Kuhar, M.J., 1997. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat.* 12, 229-41.
- Criscione, L., et al., 1998. Food intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. *J Clin Invest.* 102, 2136-45.
- Dallvechia-Adams, S., Kuhar, M.J., Smith, Y., 2002. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide projections in the ventral midbrain: colocalization with gamma-aminobutyric acid, melanin-concentrating hormone, dynorphin, and synaptic interactions with dopamine neurons. *J Comp Neurol.* 448, 360-72.
- Dey, A., et al., 2003. Biological processing of the cocaine and amphetamine-regulated transcript precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3. *J Biol Chem.* 278, 15007-14.
- Dodd, G.T., Luckman, S.M., 2013. Physiological Roles of GPR10 and PrRP Signaling. *Front Endocrinol (Lausanne).* 4, 20-28.
- Douglass, J., McKinzie, A.A., Couceyro, P., 1995. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci.* 15, 2471-81.
- Dylag, T., et al., 2006. The activity of CART peptide fragments. *Peptides.* 27, 1926-33.
- Ekblad, E., 2006. CART in the enteric nervous system. *Peptides.* 27, 2024-30.
- Elias, C.F., et al., 1998. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* 21, 1375-85.
- Ellacott, K.L., et al., 2002. PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight. *Endocrinology.* 143, 368-74.
- Ellacott, K.L., et al., 2003. Repeated administration of the anorectic factor prolactin-releasing peptide leads to tolerance to its effects on energy homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285, R1005-10.
- Elshourbagy, N.A., et al., 2000. Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J Biol Chem.* 275, 25965-71.
- Engstrom, M., et al., 2003. Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 305, 825-32.
- Eriksson, M., Taskinen, M., Leppa, S., 2007. Mitogen activated protein kinase-dependent activation of c-Jun and c-Fos is required for neuronal differentiation but not for growth and stress response in PC12 cells. *J Cell Physiol.* 210, 538-48.
- Ernsberger, P., Koletsky, R.J., Friedman, J.E., 1999. Molecular pathology in the obese spontaneous hypertensive Koletsky rat: a model of syndrome X. *Ann N Y Acad Sci.* 892, 272-88.
- Fekete, C., et al., 2000. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci.* 20, 9224-34.
- Fekete, C., Lechan, R.M., 2006. Neuroendocrine implications for the association between cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART) and hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Peptides.* 27, 2012-8.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Vol., Academic Press.
- Fujii, R., et al., 1999. Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor. *Regul Pept.* 83, 1-10.
- Fujiwara, K., et al., 2005. Identification of the prolactin-releasing peptide-producing cell in the rat adrenal gland. *Regul Pept.* 126, 97-102.

- Fukusumi, S., Fujii, R., Hinuma, S., 2006. Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides*. 27, 1073-86.
- Gault, V.A., et al., 2011. Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with Type 2 diabetes and obesity. *Clin Sci (Lond)*. 121, 107-17.
- Gerald, C., et al., 1996. A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature*. 382, 168-71.
- Gozen, O., et al., 2007. Sex differences in the regulation of cocaine and amphetamine-regulated transcript expression in hypothalamic nuclei of rats by forced swim stress. *Synapse*. 61, 561-8.
- Gu, W., et al., 2004. The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice. *J Mol Neurosci*. 22, 93-103.
- Harrold, J.A., et al., 2012. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*. 63, 3-17.
- Havelund, S., et al., 2004. The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. *Pharm Res*. 21, 1498-504.
- Heal, D.J., Gosden, J., Smith, S.L., 2012. What is the prognosis for new centrally-acting anti-obesity drugs? *Neuropharmacology*. 63, 132-46.
- Hinuma, S., et al., 1998. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature*. 393, 272-6.
- Hinuma, S., et al., 2000. New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol*. 2, 703-8.
- Hou, J., et al., 2010. Orexigenic effect of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) after injection into hypothalamic nuclei in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 37, 989-95.
- Huszar, D., et al., 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 88, 131-41.
- Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410, 37-40.
- Cheng, Y., Prusoff, W.H., 1973. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*. 22, 3099-108.
- Johnson, A.R., et al., 2016. Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose. *Biochem Biophys Res Commun*. 545-550.
- Joly-Amado, A., et al., 2014. The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 28, 725-37.
- Jones, D.C., Kuhar, M.J., 2008. CART receptor binding in primary cell cultures of the rat nucleus accumbens. *Synapse*. 62, 122-7.
- Kava, R., Greenwood, M.R.C., Johnson, P.R., 1990. Zucker (fa/fa) Rat. *ILAR Journal*. 32, 4-8.
- Keller-Wood, M., 2015. Hypothalamic-Pituitary--Adrenal Axis-Feedback Control. *Compr Physiol*. 5, 1161-82.
- Keller, P.A., et al., 2006. Characterization and localization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) binding sites. *Peptides*. 27, 1328-34.
- Kim, J.D., Leyva, S., Diano, S., 2014. Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Front Physiol*. 5, 480-486.
- Kojima, M., et al., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 402, 656-60.
- Kojima, M., Kangawa, K., 2005. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 85, 495-522.
- Kong, W.M., et al., 2003. A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J*. 17, 1688-90.

- Kopecky, J., et al., 1996. Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am J Physiol.* 270, E768-75.
- Koylu, E.O., et al., 1998. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol.* 391, 115-32.
- Kristensen, P., et al., 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature.* 393, 72-6.
- Lagerstrom, M.C., et al., 2005. Origin of the prolactin-releasing hormone (PRLH) receptors: evidence of coevolution between PRLH and a redundant neuropeptide Y receptor during vertebrate evolution. *Genomics.* 85, 688-703.
- Lakatos, A., et al., 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, P.D., et al., 1998. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse.* 29, 293-8.
- Langmead, C.J., et al., 2000. Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor. *Br J Pharmacol.* 131, 683-8.
- Larsen, P.J., et al., 2000. Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res.* 8, 590-6.
- Lau, J., Shi, Y.C., Herzog, H., 2016. Temperature dependence of the control of energy homeostasis requires CART signaling. *Neuropeptides.*
- Lawrence, C.B., et al., 2000. Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat Neurosci.* 3, 645-6.
- Lawrence, C.B., Ellacott, K.L., Luckman, S.M., 2002. PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology.* 143, 360-7.
- Leibel, R.L., 2008. Molecular physiology of weight regulation in mice and humans. *Int J Obes (Lond).* 32 Suppl 7, S98-108.
- Leibowitz, S.F., Hammer, N.J., Chang, K., 1981. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol Behav.* 27, 1031-40.
- Leppa, S., et al., 2001. Complex functions of AP-1 transcription factors in differentiation and survival of PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 21, 4369-78.
- Licinio, J., et al., 2004. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 4531-6.
- Lin, Y., Hall, R.A., Kuhar, M.J., 2011. CART peptide stimulation of G protein-mediated signaling in differentiated PC12 cells: identification of PACAP 6-38 as a CART receptor antagonist. *Neuropeptides.* 45, 351-8.
- Lutz, T.A., Woods, S.C., 2012. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol.* Chapter 5.61, 1-22.
- Maixnerova, J., et al., 2011. Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor. *Peptides.* 32, 811-7.
- Maixnerová, J., et al., 2007. Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. *Peptides.* 28, 1945-53.
- Malavolta, L., Cabral, F.R., 2011. Peptides: important tools for the treatment of central nervous system disorders. *Neuropeptides.* 45, 309-16.
- Maletinska, L., et al., 2011a. The Peptidic GHS-R antagonist [D-Lys(3)]GHRP-6 markedly improves adiposity and related metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 343, 55-62.

- Maletinska, L., et al., 2011b. Biological properties of prolactin-releasing peptide analogs with a modified aromatic ring of a C-terminal phenylalanine amide. *Peptides*. 32, 1887-92.
- Maletinska, L., et al., 2012. Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J Pharmacol Exp Ther*. 340, 781-6.
- Maletinska, L., et al., 2013. Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPPF receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration. *Brain Res*. 1498, 33-40.
- Maletinska, L., et al., 2015. Novel lipidized analogs of prolactin-releasing peptide have prolonged half-lives and exert anti-obesity effects after peripheral administration. *Int J Obes (Lond)*. 39, 986-93.
- Maletínská, L., et al., 2007. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol*. 559, 109-14.
- Maletínská, L., et al., 2008. Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci*. 9, 101.
- Maniscalco, J.W., Rinaman, L., 2013. Overnight food deprivation markedly attenuates hindbrain noradrenergic, glucagon-like peptide-1, and hypothalamic neural responses to exogenous cholecystokinin in male rats. *Physiol Behav*. 121, 35-42.
- Marchese, A., et al., 1995. Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics*. 29, 335-44.
- Maruyama, M., et al., 1999. Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain. *Endocrinology*. 140, 2326-33.
- Matsumoto, H., et al., 1999. Stimulation of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 259, 321-4.
- Matsumoto, H., et al., 2000. Stimulation of corticotropin-releasing hormone-mediated adrenocorticotropin secretion by central administration of prolactin-releasing peptide in rats. *Neurosci Lett*. 285, 234-8.
- Minami, S., et al., 1999. Cellular localization of prolactin-releasing peptide messenger RNA in the rat brain. *Neurosci Lett*. 266, 73-5.
- Morton, G.J., et al., 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 443, 289-95.
- Motulsky, H., Neubig, R., 2002. Analyzing radioligand binding data. *Curr Protoc Neurosci*. Chapter 7.5, 1-55.
- Munzberg, H., 2010. Leptin-signaling pathways and leptin resistance. *Forum Nutr*. 63, 123-32.
- Murase, T., et al., 1996. Neuropeptide FF reduces food intake in rats. *Peptides*. 17, 353-4.
- Nagelova, V., et al., 2014. CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide specific binding sites in PC12 cells have characteristics of CART peptide receptors. *Brain Res*. 1547, 16-24.
- O'Brien, P.D., Sakowski, S.A., Feldman, E.L., 2014. Mouse models of diabetic neuropathy. *ILAR J*. 54, 259-72.
- O'Rahilly, S., 2009. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature*. 462, 307-14.
- Ollmann, M.M., et al., 1997. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*. 278, 135-8.
- Onaka, T., Takayanagi, Y., Leng, G., 2010. Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide. *Trends Endocrinol Metab*. 21, 287-93.

- Panula, P., Aarnisalo, A.A., Wasowicz, K., 1996. Neuropeptide FF, a mammalian neuropeptide with multiple functions. *Progress in Neurobiology*. 48, 461-87.
- Pirnik, Z., et al., 2010. Effect of anorexigenic peptides, cholecystokinin (CCK) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide, on the activity of neurons in hypothalamic structures of C57Bl/6 mice involved in the food intake regulation. *Peptides*. 31, 139-44.
- Pirnik, Z., et al., 2011. Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice. *Neurochem Int*. 59, 889-95.
- Prazienkova, V., et al., 2016. Pharmacological characterization of lipidized analogs of prolactin-releasing peptide with a modified C- terminal aromatic ring. *J Physiol Pharmacol*. 67, 121-8.
- Quillet, R., et al., 2016. RF-amide neuropeptides and their receptors in Mammals: Pharmacological properties, drug development and main physiological functions. *Pharmacol Ther*. 160, 84-132.
- Rogge, G., et al., 2008. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci*. 9, 747-58.
- Roland, B.L., et al., 1999. Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology*. 140, 5736-45.
- Sahu, A., 2003. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol*. 24, 225-53.
- Salinas, A., Wilde, J.D., Maldve, R.E., 2006. Ethanol enhancement of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA and peptide expression in the nucleus accumbens. *J Neurochem*. 97, 408-15.
- Sampey, B.P., et al., 2011. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 19, 1109-17.
- Samson, W.K., Resch, Z.T., Murphy, T.C., 2000. A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation. *Brain Res*. 858, 19-25.
- Samson, W.K., et al., 2003. Prolactin-releasing peptide and its homolog RFRP-1 act in hypothalamus but not in anterior pituitary gland to stimulate stress hormone secretion. *Endocrine*. 20, 59-66.
- Sarkar, S., et al., 2004. Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*. 999, 181-92.
- Sathanoori, R., et al., 2013. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) protects beta cells against glucotoxicity and increases cell proliferation. *J Biol Chem*. 288, 3208-18.
- Schwartz, M.W., et al., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 404, 661-71.
- Smith, S.M., et al., 2004. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism. *Endocrinology*. 145, 5202-9.
- Smith, Y., et al., 1997. Ultrastructural localization of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides in the nucleus accumbens of monkeys. *Synapse*. 27, 90-4.
- Sohn, J.W., 2015. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep*. 48, 229-33.

- Spiess, J., Villarreal, J., Vale, W., 1981. Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. *Biochemistry*. 20, 1982-8.
- Spuch, C., et al., 2007. Prolactin-releasing Peptide (PrRP) increases prolactin responses to TRH in vitro and in vivo. *Endocrine*. 31, 119-24.
- Stanley, S.A., et al., 2001. Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. *Brain Res*. 893, 186-94.
- Sun, Y., Ahmed, S., Smith, R.G., 2003. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol*. 23, 7973-81.
- Surwit, R.S., et al., 1988. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*. 37, 1163-7.
- Suzuki, K., Jayasena, C.N., Bloom, S.R., 2012. Obesity and appetite control. *Experimental Diabetes Research*. 2012, 1-19.
- Tachibana, T., et al., 2004. Effect of central administration of prolactin-releasing peptide on feeding in chicks. *Physiol Behav*. 80, 713-9.
- Takayanagi, Y., et al., 2008. Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents. *J Clin Invest*. 118, 4014-24.
- Takayanagi, Y., Onaka, T., 2010. Roles of prolactin-releasing peptide and RFamide related peptides in the control of stress and food intake. *FEBS J*. 277, 4998-5005.
- Tang, W.X., et al., 2003. Molecular profiling of midbrain dopamine regions in cocaine overdose victims. *J Neurochem*. 85, 911-24.
- Thim, L., et al., 1998. Purification and characterisation of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast. *FEBS Lett*. 428, 263-8.
- Thim, L., et al., 1999. Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 2722-7.
- Tsigos, C., et al., 2008. Management of obesity in adults: European clinical practice guidelines. *Obes Facts*. 1, 106-16.
- Van Heek, M., et al., 1997. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest*. 99, 385-90.
- Vergoni, A.V., et al., 2002. Effect of repeated administration of prolactin releasing peptide on feeding behavior in rats. *Brain Res*. 955, 207-13.
- Vicentic, A., Lakatos, A., Kuhar, M.J., 2005. CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells. *Eur J Pharmacol*. 528, 188-9.
- Vrang, N., et al., 1999a. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine-amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci*. 19, RC5.
- Vrang, N., et al., 1999b. Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res*. 818, 499-509.
- Wang, J., et al., 2013. Neuropeptide Y loses its orexigenic effect in rats with lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocr Res*. 38, 8-14.
- Welch, S.K., et al., 1995. Sequence and tissue distribution of a candidate G-coupled receptor cloned from rat hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun*. 209, 606-13.
- WHO, 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 894, i-xii, 1-253.
- Woods, S.C., D'Alessio, D.A., 2008. Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab*. 93, S37-50.
- Yang, S.C., Shieh, K.R., Li, H.Y., 2005. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the nucleus accumbens participates in the regulation of feeding behavior in rats. *Neuroscience*. 133, 841-51.

- Yasui, Y., et al., 2001. Expression of prolactin-releasing peptide in human placenta and decidua. *Endocr J.* 48, 397-401.
- Yeo, G.S., et al., 1998. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet.* 20, 111-2.
- Yermolaieva, O., et al., 2001. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 21, 7474-80.
- Yu, J.H., Kim, M.S., 2012. Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab J.* 36, 391-8.
- Zhang, L., Bijker, M.S., Herzog, H., 2011. The neuropeptide Y system: pathophysiological and therapeutic implications in obesity and cancer. *Pharmacol Ther.* 131, 91-113.
- Zhang, Y., et al., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372, 425-32.
- Zigman, J.M., et al., 2005. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 115, 3564-72.

SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Publikace týkající se tématu disertační práce:

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

Další publikace týkající se jiných témat:

1. Mikulášková B., Zemenová J., Pirník Z., Pražienková V., Bednářová L., Železná B., Maletínská L., Kuneš J., Effect of palmitoylated prolactin-releasing peptide on food intake and neural activation after different routes of peripheral administration in rats, *Peptides*, 2016, 75: 109-17. doi: 10.1016/j.peptides.2015.11.005. **IF = 2,618**
2. Špolcová A., Mikulášková B., Holubová M., Nagelová V., Pirník Z., Zemenová J., Haluzík M., Železná B., Galas MC., Maletínská L., Anorexigenic lipopeptides ameliorate central insulin signaling and attenuate tau phosphorylation in hippocampi of

- mice with monosodium glutamate-induced obesity, *J Alzheimers Dis*, 2015, 45(3): 823-35. doi: 10.3233/JAD-143150. **IF = 4,151**
3. Vaněčková I., Maletínská L., Behuliak M., Nagelová V., Zicha J., Kuneš J., Obesity-related hypertension: possible pathophysiological mechanisms, *J Endocrinol*, 2014, 223(3): R63-78. doi: 10.1530/JOE-14-0368. Review. **IF = 3,718**
 4. Holubová M., Nagelová V., Lacinová Z., Haluzík M., Sýkora D., Moulin A., Blayo AL., Fehrentz JA., Martinez J., Stofkova A., Jurčovičová J., Zelezná B., Maletínská L., Triazole GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002 attenuate food intake, body weight, and adipose tissue mass in mice, *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 393(1-2): 120-8. doi: 10.1016/j.mce.2014.06.003. **IF = 4,405**
 5. Spolcová A., Holubová M., Mikulášková B., Nagelová V., Stofková A., Lacinová Z., Jurčovičová J., Haluzík M., Maletínská L., Zelezná B., Changes in FGF21 serum concentrations and liver mRNA expression in an experimental model of complete lipodystrophy and insulin-resistant diabetes, *Physiol Res*, 2014, 63(4): 483-90. **IF = 1,293**
 6. Maletínská L., Tichá A., Nagelová V., Spolcová A., Blechová M., Elbert T., Zelezná B., Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPPF receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration, *Brain Res*, 2013, 1498:33-40. doi: 10.1016/j.brainres.2012.12.037. **IF = 2,843**

Patenty:

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

PŘÍLOHY

Příloha 1:

Nagelová V., Pirník Z., Železná B. a Maletínská L., CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides specific binding sites in PC12 cells have characteristics of CART peptide receptors, *Brain Research*, 2014, 1547: 16-24. doi: 10.1016/j.brainres.2013.12.024

Příloha 2:

Blechová M., Nagelová V., Záková L., Demianová Z., Zelezná B., Maletínská L., New analogs of the CART peptide with anorexigenic potency: the importance of individual disulfide bridges, *Peptides*, 2013, 39: 138-44. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.033

Příloha 3:

Prazienkova V., Ticha A., Blechova M., Spolcova A., Zelezna B., Maletinska L., Pharmacological characterization of lipidized analogs of prolactin-releasing peptide with a modified c-terminal aromatic ring, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2016, 121-128

Příloha 4:

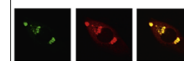
Maletínská L., Nagelová V., Tichá A., Zemenová J., Pirník Z., Holubová M., Špolcová A., Mikulášková B., Blechová M., Sýkora D., Lacinová Z., Haluzík M., Železná B. a Kuneš J., Novel lipidized analogs of prolactin-releasing peptide have prolonged half-lives and exert anti-obesity effects after peripheral administration, *International Journal of Obesity*, 2015, 986-93. doi: 10.1038/ijo.2015.28

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide specific binding sites in PC12 cells have characteristics of CART peptide receptors



Veronika Nagelová^a, Zdeno Pirník^{b,c}, Blanka Železná^a, Lenka Maletínská^{a,*}

^aInstitute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nam. 2, 166 10 Prague, Czech Republic

^bLaboratory of Functional Neuromorphology, Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Vlarska str. 3, 833 06 Bratislava, Slovak Republic

^cDepartment of Human and Clinical Pharmacology, University of Veterinary Medicine, Komenskeho 73, 041 81 Kosice, Slovak Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 19 December 2013

Available online 27 December 2013

Keywords:

CART peptide

PC12 cell

Differentiation

Binding

Signaling

c-Jun

ABSTRACT

CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide is a neuropeptide with a powerful central anorexigenic effect. Specific CART peptide binding sites, most likely CART peptide receptors, have been found in PC12 cells. This study further characterizes the CART peptide binding sites in PC12 cells.

After differentiation to a neuronal phenotype with nerve growth factor, the number of CART peptide binding sites in PC12 cells tripled. Following dexamethasone treatment, which transforms PC12 cells into chromaffin-like cells, the number of CART peptide binding sites substantially decreased. CART peptide did not affect the differentiation or acetylcholinesterase activity of PC12 cells, indicating that CART peptide does not participate in differentiation or neuronal activity.

CART peptide increased the phosphorylation of SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun-amino-terminal kinase) and subsequent c-Jun protein expression. These effects were reversed by SP600125, a specific JNK-kinase inhibitor. CART peptide did not significantly affect ERK (extracellular signal-regulated kinase), CREB (cAMP responsive element binding protein), or p38 phosphorylation and c-Fos protein expression. Central administration of CART peptide into mice also resulted in increased c-Jun positive cells in dorsomedial hypothalamic nucleus and nucleus of the solitary tract, areas involved in food intake regulation.

Activation of c-Jun by CART peptide might indicate a possible role of CART peptide in managing stress conditions rather than a role in cell proliferation or differentiation as well as the more complex and/or specific regulation ways by transcription factors in some nuclei involved in food intake regulation. The characteristics of stress that CART peptide potentially mediates should be further studied.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Corresponding author. Fax: +420 220183571.

E-mail address: maletin@uochb.cas.cz (L. Maletínská).

1. Introduction

CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) was discovered as a gene transcript found to be induced by cocaine or amphetamine (Douglass and Daoud, 1996) and was linked then to a peptide earlier isolated from the ovine hypothalamus (Spiess et al., 1981). Subsequently, CART (55-102) and CART (62-102) peptides were shown to exhibit equivalent biological activities (Maixnerová et al., 2007; Thim et al., 1998). Kristensen et al. (1998) demonstrated that CART expression in the hypothalamus was induced by leptin, CART peptide shows anorexigenic effects under both fasting and normal conditions, and can inhibit the orexigenic effect of neuropeptide Y (NPY).

Even the structure and effects of CART peptides have already been known for 15 years, the receptor has not yet been identified. There are only several suggestions of the existence of a CART peptide receptor: the neuropeptide-like characteristics of CART peptide, its specific binding to cell membranes and whole cells (Maletínská et al., 2007), and its effects on intracellular signaling (Rogge et al., 2008). Within the brain, CART peptides are expressed exclusively in neurons, suggesting that CART peptides are neuropeptides; therefore, receptors for CART likely exist (Couceyro et al., 1997). Additionally, the CART pro-peptide co-localizes with pro-hormone convertases that activate neuropeptide precursors (Thim et al., 1999).

With respect to CART peptide binding, radiolabeled ^{125}I CART (61-102) binding to AtT20 pituitary cells has been reported; however, data on non-specific binding were not provided (Vicentic et al., 2005). Our laboratory has demonstrated the specific binding of ^{125}I CART (61-102) with a low non-specific binding in pheochromocytoma PC12 cells, both in their native state and after differentiation to a neuronal phenotype (Maletínská et al., 2007). Specific binding of ^{125}I CART (61-102) in the nucleus accumbens was reported to be inhibited by the GTP analog Gpp(NH)p, thus suggesting the involvement of a G-protein coupled receptor (Jones and Kuhar, 2008).

Several intracellular effects of CART peptides have been reported. In primary hippocampal cells, CART peptide was found to reduce depolarization-induced Ca^{2+} influx through the inhibition of voltage-gated Ca^{2+} channels. However, in PC12 cells, CART peptide did not affect the Ca^{2+} signal, although voltage-gated Ca^{2+} channels are present in PC12 cells (Yermolaieva et al., 2001). Furthermore, CART peptide was reported to activate mitogen-activated protein kinase 42/44 (MAPK 42/44, Erk 1/2) in both pituitary AtT20 cells (Lakatos et al., 2005) and PC12 cells (Lin et al., 2011), and it was suggested that CART peptide acts through $G_{i/o}$ type receptors.

This study is based on our previous results on the specific binding of CART peptide to PC12 cells (Maletínská et al., 2007) and aims to further characterize the putative CART peptide receptor by the density of CART peptide binding sites in PC12 cells following differentiation either to a neuronal or a chromaffin phenotype, by the acetylcholinesterase activity in response to CART peptide, and by the potential activation of several intracellular signaling pathways. Activation of c-Jun was also followed in vivo after CART peptide intracerebroventricular (ICV) administration in mouse brain areas involved in food intake regulation by immunohistochemistry.

2. Results

2.1. Saturation binding to PC12 cells

In native pheochromocytoma PC12 cells and in those differentiated to neuronal and chromaffin phenotypes, saturation specific binding was measured to compare the binding affinity of CART peptide and the density of CART peptide binding sites in the different cell phenotypes.

Similarly as in our previous study (Maletínská et al., 2007), the saturable, specific binding of ^{125}I -CART (61-102) to native non-differentiated plated PC12 cells exhibited a K_d of 2.36 ± 1.28 nM and a B_{\max} of 3601 ± 592 binding sites/cell. Non-specific binding comprised approximately 36% of the total binding. Non-linear regression analysis showed one binding site (see Table 1, Fig. 1a).

In PC12 cells differentiated by nerve growth factor (NGF) to the neuronal phenotype (Greene and Tischler, 1976), fully developed structures of neurons and axons were clearly visible using a phase contrast microscope (not shown). The saturation binding of ^{125}I -CART (61-102) to the cells differentiated with NGF gave a K_d of 2.09 ± 0.66 nM and a B_{\max} of 11248 ± 930 binding sites/cell. Approximately 14% of the total binding was non-specific (see Table 1, Fig. 1b). For PC12 cells differentiated to a neuronal phenotype using PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide), CART peptide binding sites exhibited a K_d of 2.02 ± 0.22 and a B_{\max} of 8853 ± 386 binding sites/cell (see Table 1, Fig. 1c). Treatment with a combination of NGF and PACAP also resulted in a neuronal phenotype with a K_d value and a binding site density similar to those measured after NGF treatment (not shown). PC12 cells differentiated to neuronal phenotypes either with NGF or PACAP had CART peptide binding sites with a very similar affinity and density.

Dexamethasone (Dex) was used to differentiate PC12 cells to chromaffin cells which have a shape similar to non-differentiated cells but a lower cell density (not shown). As more than 50% of the total ^{125}I -CART (61-102) binding was non-specific, the K_d could not be determined. The density of the binding sites was very low (see Table 1, Fig. 1d).

Several days long treatment with CART peptide did not result in any sign of cell differentiation or proliferation in PC12.

2.2. Acetylcholinesterase activity

Acetylcholinesterase activity in PC12 cells was determined after 24 h of incubation with CART (61-102), using NGF as a positive

Table 1 – Saturation binding in PC12 cells.

PC12 cells	B_{\max} [binding sites/ cell]	K_d [nM]
Nondifferentiated	3601 ± 592	2.36 ± 1.28
Differentiated by NGF	11248 ± 930	2.09 ± 0.66
Differentiated by PACAP	8853 ± 386	2.02 ± 0.22
Differentiated by PACAP+NGF	14906 ± 679	1.85 ± 0.29
Differentiated by Dex	Low B_{\max}	

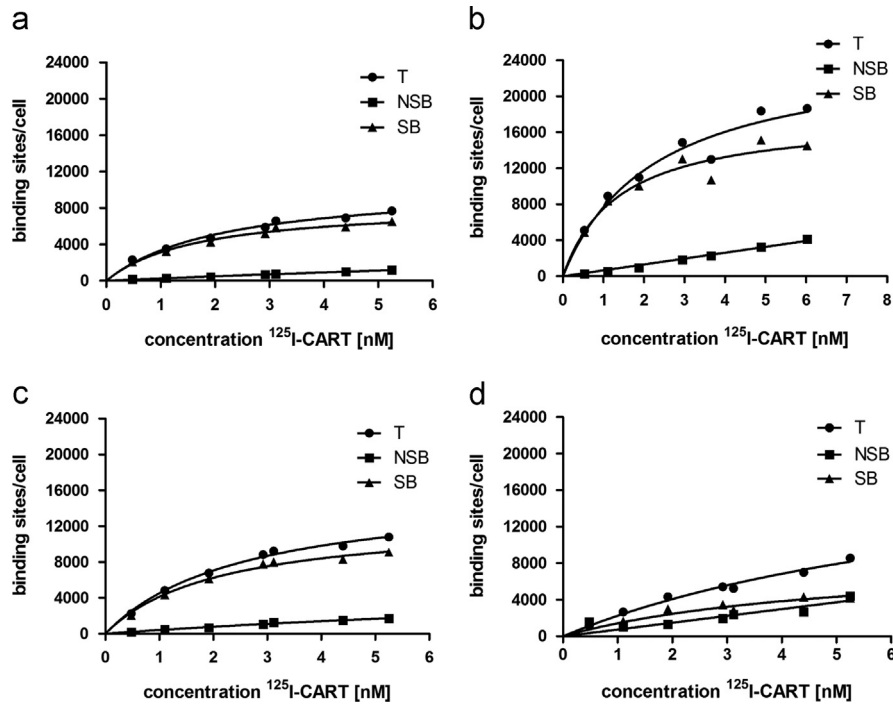


Fig. 1 – ^{125}I -CART (61-102) saturation binding to: (a) non-differentiated, (b) NGF-differentiated, (c) PACAP-differentiated, and (d) dexamethasone differentiated PC12 cells. The cells were incubated at 37 °C for 30 min with increasing amount of ^{125}I -CART (61-102) in the absence (total binding) or presence (nonspecific binding) of 10^{-5} M CART (61-102). Specific binding was calculated by subtracting the nonspecific from total binding. Binding curves were plotted using nonlinear regression. The figure is a representative example of three to six experiments carried out in duplicates.

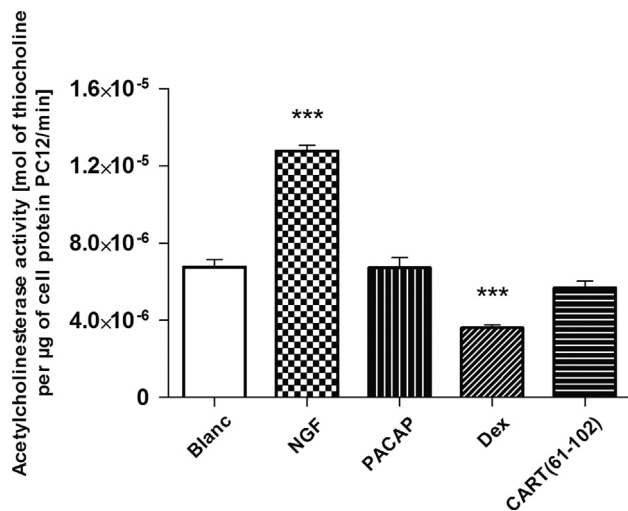


Fig. 2 – Acetylcholinesterase activity in PC12 cells was determined after 24 h of incubation with CART (61-102), using NGF as a positive control, as well as with PACAP and Dex. Acetylcholinesterase activity was measured as the increase in thiocholine released from acetylthiocholine. Statistically significant differences from the control are indicated (***) $P < 0.001$.

control, as well as with PACAP and Dex. Acetylcholinesterase activity was measured as the increase in thiocholine released from acetylthiocholine. As expected, acetylcholinesterase activity in PC12 cells was significantly increased after NGF treatment.

The activity of acetylcholinesterase was not significantly affected by CART (61-102) or PACAP but was significantly decreased after treatment with Dex (see Fig. 2).

2.3. Detection of signaling pathways induced by CART peptide

We were not able to reproduce the CART peptide-induced Erk1/2 phosphorylation reported by Lakatos et al. (2005) in AtT20 cells and by Lin et al. (2011) in PC12 cells (Fig. 3a). During a five-day incubation of PC12 cells with CART (61-102), we did not note any of the effects on cell proliferation or differentiation (not shown) that usually result from activation of Erk1/2. Similarly we did not observe activation of CREB (cAMP responsive element binding protein) after administration of both CART (61-102) or its analog Nle⁶⁷ CART (61-102) (Fig. 3b). Therefore, we tested the possible activation of two other signaling pathways, SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-Jun-amino-terminal kinase) and p38, which are often induced by stress conditions but do not result in cell proliferation and/or differentiation. The results of these experiments are shown in Fig. 3c–e.

After application of CART (61-102), c-Jun protein was significantly increased; this increase was inhibited by treatment with SP600125, a selective inhibitor of JNK phosphorylation. A slight but non-significant increase in c-Jun phosphorylation was also observed after application of the CART peptide analog Nle⁶⁷ CART (61-102); SP600125 inhibited this effect as well (Fig. 3c).

JNK phosphorylation, which precedes the activation of c-Jun, was significantly increased both by CART (61-102) and

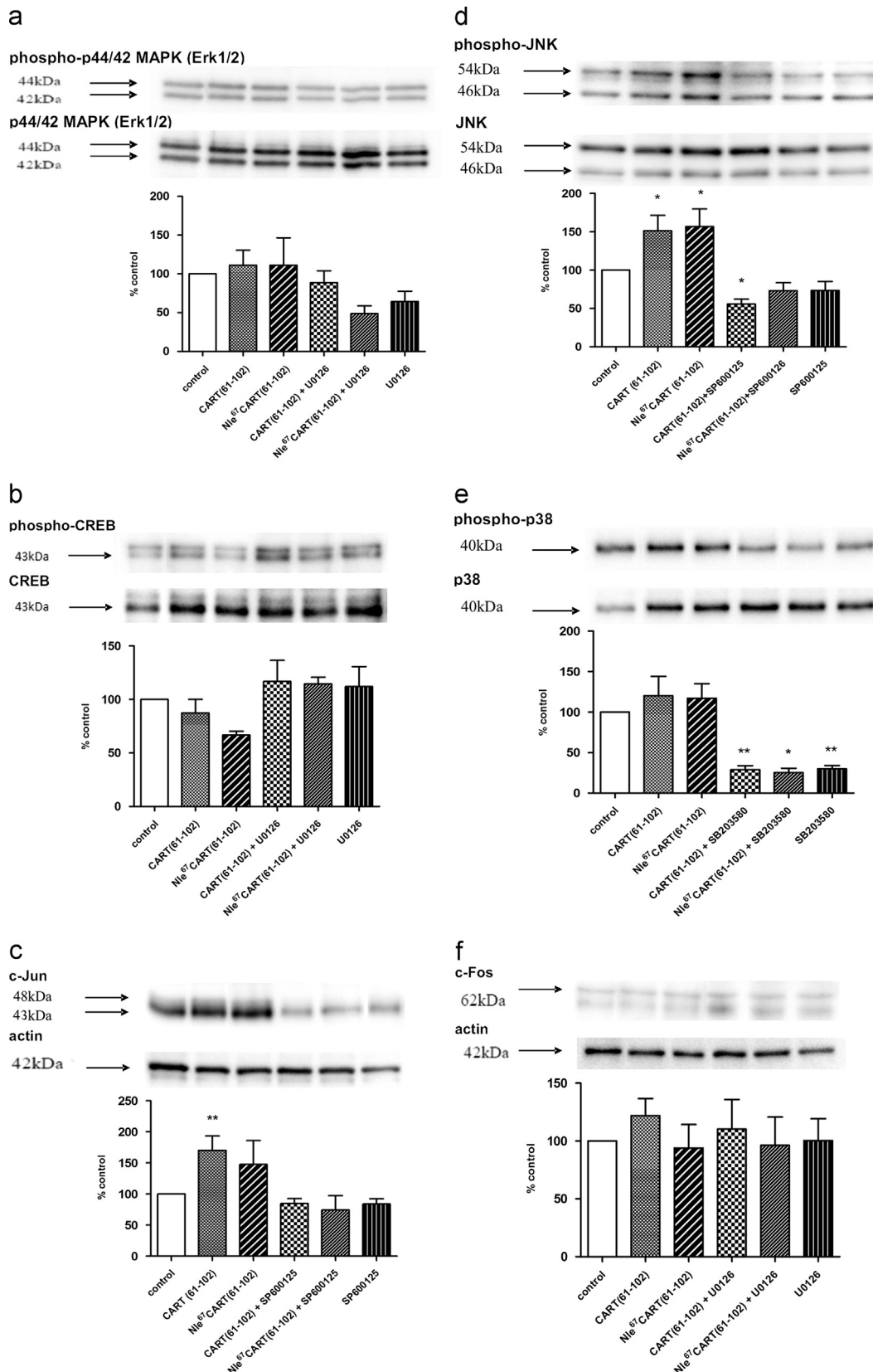


Fig. 3 – Characterization of CART (61-102)-induced phosphorylation of: (a) MAPK/Erk1/2, (b) CREB, (d) JNK, (e) p38, and expression of (c) c-Jun and (f) c-Fos. PC12 cells were grown and treated as described in experimental procedure and were stimulated with CART (61-102) analogs with or without the kinase inhibitors for 10 or 60 min at 37 °C as indicated. Subsequently, the cells were lysed, and phosphorylation was determined using immunoblotting. Detection using relevant total, unphosphorylated antibody or actin was performed to verify the total amount of protein. The data are shown as the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments performed in duplicate. The phosphorylation level in the control cells was standardized as 100%. Statistically significant differences from the control are indicated (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

Nle⁶⁷ CART (61-102); this effect was blocked by SP600125 (Fig. 3d). This demonstrates that CART peptide induced the activation of the JNK pathway.

A non-significant increase in the phosphorylation of p38 was found following administration of CART (61-102) and its analog Nle⁶⁷ CART (61-102). This increase was blocked by the selective p38 inhibitor SB203580 (Fig. 3e).

Finally, neither CART (61-102) nor Nle⁶⁷ CART (61-102) affected c-Fos protein expression in PC12 cells (Fig. 3f) despite previous reports from in vivo studies in the hypothalamus (Kristensen et al., 1998; Maletínská et al., 2008).

NGF served as a positive control when evaluating the increased phosphorylation of JNK, p38 or Erk1/2 or the increase in c-Fos or c-Jun protein (Fig. 3a–f) because NGF stimulates all of these pathways in PC12 cells (Eriksson et al., 2007).

2.4. c-Jun immunoreactivity in hypothalamic nuclei and nucleus tractus solitarii after CART peptide administration

The statistical analysis revealed significant effect of treatment on c-Jun cell activation in dorsomedial (DMN) ($F_{3,12}=4.9942$, $p=0.017832$) nuclei as well as in nucleus tractus solitarii (NTS) ($F_{3,12}=4.3693$, $p=0.026823$).

Post hoc test showed that central CART (61-102) peptide administration increased the number of c-Jun cells in DMN and NTS compared to saline treated animals (Fig. 4). In DMN the central effect of CART (61-102) peptide on c-Jun cells activation was dose dependent (Fig. 4) and CART (61-102) peptide diffusely influenced cells of ventral, diffuse and compact part of DMN (Fig. 5A and B). The c-Jun protein positive cells in NTS were distributed mainly in its

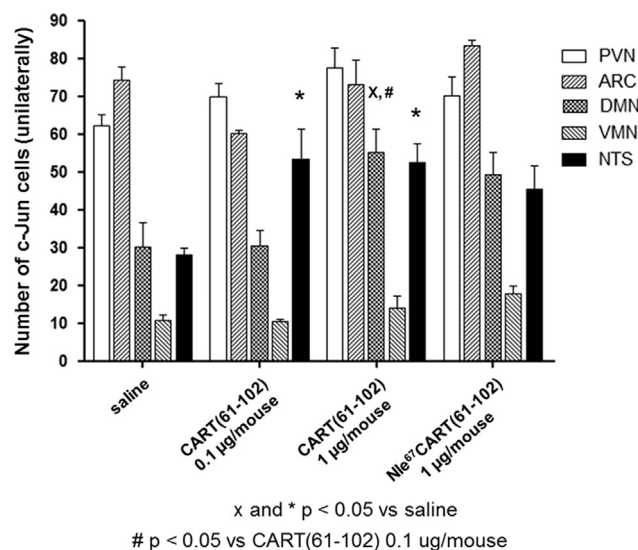


Fig. 4 – The effect of ICV applied saline (SAL), CART (61-102) peptide (0.1 and 1 µg per mouse) and Nle⁶⁷ CART (61-102) peptide (1 µg per mouse) on c-Jun cell activation of brain nuclei involved in food intake regulation in C57 mice ($n=5$ per group). ARC – arcuate nucleus, PVN – hypothalamic paraventricular nucleus, VMN – ventromedial hypothalamic nucleus, DMN – dorsomedial hypothalamic nucleus, NTS – nucleus of the solitary tract, * $p < 0.05$ vs SAL, # $p < 0.05$ vs. CART (61-102) peptide 0.1 µg.

ventromedial part after central application of CART (61-102) peptide (Fig. 5C and D). No effects of applied CART peptides on c-Jun cell activation were found in paraventricular nucleus (PVN), ARC or ventromedial nucleus (VMN) (Fig. 4).

3. Discussion

Over the past 15 years, a variety of biological actions have been attributed to CART peptides; however, the CART peptide receptor has not been identified. Despite previous reports detecting the specific binding of ¹²⁵I-CART (61-102) in AtT20 pituitary cells (Vicentic et al., 2005), we were unable to reproduce these results. In 2007, we found CART peptide specific binding sites in both native pheochromocytoma PC12 cells and those differentiated into a neuronal phenotype (Maletínská et al., 2007). Therefore, for these studies, we used PC12 cells to further characterize the CART peptide binding sites.

PC12 cells act similarly to immature neural crest cells that can be differentiated by NGF or PACAP to neurons or by glucocorticoids to chromaffin cells (Adler et al., 2006). In this study, application of CART peptide did not produce detectable changes in the PC12 cell morphology or cell number induced by CART peptide itself. However, following differentiation of PC12 cells to a neuronal phenotype by NGF or PACAP, the number of CART peptide binding sites was greatly increased. In contrast, following the differentiation of PC12 cells to chromaffin cells by Dex, the number of CART peptide binding sites in PC12 cells was so low that it was impossible to determine their density. This means that the presence of CART peptide binding sites is specific to neurons or tumor chromaffin cells rather than normal chromaffin cells.

In order to strengthen our results, experiments were performed also with a potent analog Nle⁶⁷ CART (61-102) characterized in our previous study (Blechová et al., 2013).

As mentioned previously, CART peptide did not affect PC12 cell morphology and also did not affect acetylcholinesterase activity. Only the NGF treatment increased acetylcholinesterase activity in PC12 cells, which means that NGF eliminated the response to acetylcholine and fully transformed the PC12 cells such that they exhibit neuron-like behavior.

With respect to CART peptide-induced intracellular signaling, two very different effects on Erk1/2 phosphorylation have previously been reported. CART peptide was shown to stimulate Erk1/2 phosphorylation in AtT20 pituitary cells by Lakatos et al. (2005) and by Lin et al. (2011) in PC12 cells. Moreover, activation of Erk1/2 and CREB in the INS-1 beta cell line and in isolated rat islets has been reported to be induced by CART peptide (Sathanoori et al., 2013). On the other hand, Sen et al. (2008) found that administration of CART peptide reverses follicle stimulating hormone-induced ERK1/2 and Akt signaling in granulosa cells. We did not observe any activation of ERK1/2 in PC12 cells by CART peptide as reported by Lin et al. (2011) or by its analog Nle⁶⁷ CART (61-102). Additionally, we did not register any effects of CART peptide on the differentiation and proliferation of PC12 cells that usually results from Erk1/2 phosphorylation.

In this study, we demonstrated the stimulation of JNK and subsequently c-Jun activation based on increase in the phosphorylation and the total protein, respectively. These

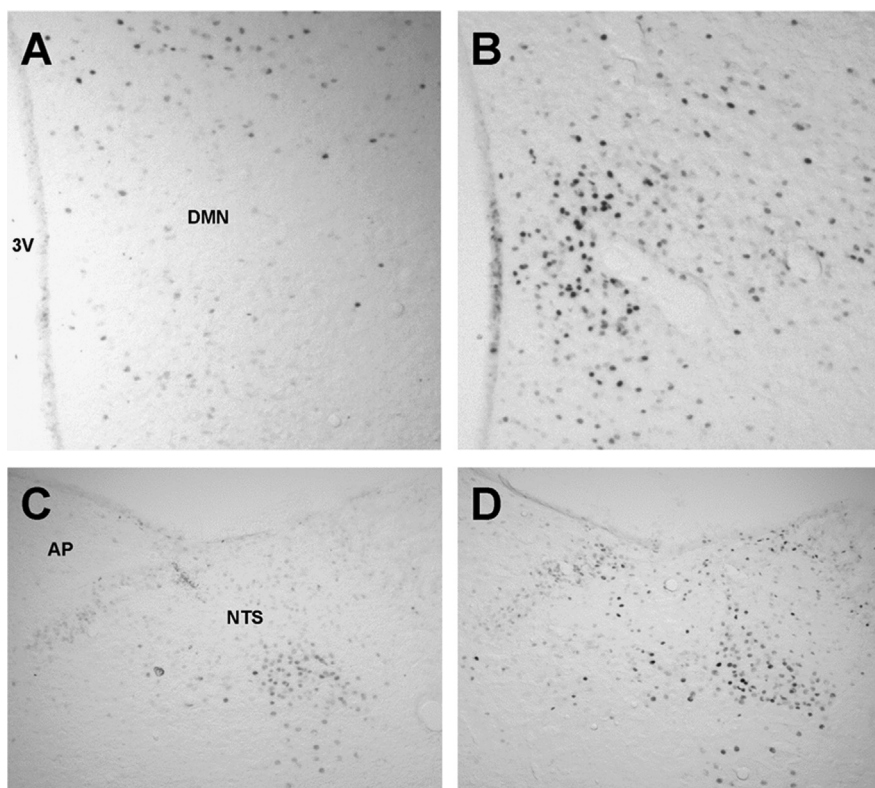


Fig. 5 – The effect of ICV applied saline (A and C) and CART (61-102) peptide in dose of 1 µg per mouse (B and D) on c-Jun cell activation of dorsomedial hypothalamic nucleus (A and B) and nucleus of the solitary tract (C and D) in C57 mice. 3V – 3rd brain ventricle, DMN – dorsomedial hypothalamic nucleus, AP – area postrema, NTS – nucleus of the solitary tract.

data were confirmed by blocking these effects with the specific JNK kinase inhibitor SP600125. These increases were due to c-Jun induction by JNK rather than by Erk1/2, another pathway that can activate c-Jun (Leppä et al., 2001). In the signaling study by Lin et al. (2011), the cells were differentiated by NGF or PACAP; thus, these peptides themselves could cause Erk1/2 stimulation.

CART peptide and Nle⁶⁷ CART (61-102) produced a non-significant increase in p38 phosphorylation that was reversed by SB203580, the specific inhibitor of p38 phosphorylation. CART peptide or Nle⁶⁷ CART (61-102) did not affect the protein expression of c-Fos, a component of the AP-1 transcription factor consisting of a dimer of Jun- or Fos- family proteins.

We can conclude that the CART peptide and its analog Nle⁶⁷ CART (61-102) in PC12 cells likely activates the JNK pathway, which is primarily induced by inflammatory cytokines and stress conditions (Chang and Karin, 2001). Although c-Jun activation has been described to result in the differentiation of PC12 cells (Leppä et al., 2001), we did not observe any differentiation following CART peptide. As it has been shown later that differentiation of PC12 cells requires the cooperation of c-Jun with c-Fos (Eriksson et al., 2007). As c-Fos was not stimulated by CART peptide in PC12 cells, this may explain these results.

It was well demonstrated that anorexigenic effect of ICV administered CART peptide was associated with Fos neurons stimulation in PVN, ARC, DMN and NTS (Maletínská et al., 2008; Vrang et al., 1999b). Because CART peptides were able to stimulate another transcription factor in in vitro part of our

study, we decided to evaluate in vivo effect of ICV CART peptide on the c-Jun cell activation in the brain nuclei involved in food intake regulation mentioned above.

ARC and PVN neurons belong to the major hypothalamic sources of CART peptides (Vrang et al., 1999a) and sites where CART peptide regulates food intake in mice (Maletínská et al., 2008; Yu et al., 2008) but we found no effect of applied CART peptides on c-Jun cell activation in this brain nuclei. Moreover, although c-Jun is also involved in food intake regulation through the ARC and PVN (Kim et al., 2005), the high levels of c-Jun expression observed in ARC already under basal conditions (Herdegen et al., 1995) as well as a multifunction physiological role of PVN involved also in stress condition (Imaki et al., 1996) may explain this discrepancy.

It was shown in our previous study that the injection of CART peptide into the third brain ventricle significantly attenuated food intake in overnight fasted mice and stimulated Fos neurons in DMN (Maletínská et al., 2008). On the other hand, the injection of CART peptide directly into DMN resulted in significantly increased feeding of fasted rats (Hou et al., 2010). Therefore, the significant effect of CART peptide on the c-Jun cell activation demonstrated in DMN and NTS in our in vivo part of the study may indicate more complex and/or specific regulation ways through the several transcription factors in these nuclei in processes of food intake regulation.

Recently, the antioxidant properties of CART peptides have been reported based on CART localization to mitochondria (Mao et al., 2012). A potent neuroprotective action of CART peptide was demonstrated in a Parkinson disease

mouse model (Mao et al., 2013). However, our binding experiments performed with intact cells and isolated cell membranes do not support mitochondrial localization of CART peptide receptor (Maletínská et al., 2007).

The activation of c-Jun by the action of CART peptide points to a possible role of CART peptide in managing stress conditions rather than in cell proliferation or differentiation. Further studies should address the characteristics of the stress that CART peptide could potentially mediate.

4. Experimental procedure

4.1. CART peptide analogs and iodination of CART(61-102)

CART (61-102) was a gift from Novo Nordisk (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark). Nle⁶⁷ CART (61-102) was synthesized as described previously (Blechová et al., 2013). CART(61-102) was iodinated at Tyr⁶² with Na^[125I] (MP Biomedicals, Illkirch, France) using IODO-GENTM (Pierce, Rockford, IL, USA) and purified as described previously (Maletínská et al., 2007). The specific activity of ¹²⁵I-CART (61-102) was approximately 2000 Ci/mmol.

4.2. Cell culture

The PC12 cell line was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA), grown on a polyethylene imine (PEI)-coated surface and maintained in exponential growth as described previously (Maletínská et al., 2007).

The cells were differentiated by supplementation with NGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 50 ng/ml), PACAP 38 (Polypeptide Laboratories, Strasbourg, France, 0.1 μM), or Dex (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 2.5 μM) on fresh media on days 1, 3, and 5 (Adler et al., 2006). On day 7, cells at a density of 5×10^5 cells/well were used in the binding experiment. The differentiation was determined microscopically, and the numbers of cells per well were counted before and after the experiment.

4.3. ¹²⁵I-CART (61-102) saturation binding to intact plated cells

Saturation binding experiments were performed according to Motulsky and Neubig (2002). The cells grown on PEI-coated 24-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were incubated with 0.5–5 nM ¹²⁵I-CART (61-102) in a total volume of 0.25 ml of binding buffer (20 mM HEPES buffer pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 1 mg/ml BSA, and 0.1 mg/ml basic pancreatic trypsin inhibitor) for 30 min at 37 °C, as previously optimized (Maletínská et al., 2007). Non-specific binding was determined using 10^{-5} M CART (61-102). After incubation, the cells were washed and then solubilized in 0.1 N NaOH. Bound radioactivity was determined by γ -counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). The total binding was 2–5% of the radioactivity added. Experiments were carried out at least three times.

4.4. Acetylcholinesterase activity

PC12 cells were grown on PEI-coated 6-well plates (IWAKI, Lennox Lab Supplies, Dublin, Ireland) at 7×10^5 cells/well and incubated 20 h in the serum-free medium and then in either serum-free medium or supplemented with the addition of 1 μM CART (61-102), 50 ng/ml NGF, 0.1 μM PACAP or 2.5 μM dexamethasone for 24 h. After washing with cold phosphate-buffered saline (PBS), the cell pellet was solubilized in 0.5 ml cold 10 mM Tris, pH 7.2, 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 and stored at –80 °C (Adler et al., 2006).

The cell lysate (200 μl) was mixed with 200 μl of phosphate buffer (0.1 M pH 8), 12.5 μl of 0.01 M 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) solution (DTNB, in 0.1 M phosphate, 0.02 M NaHCO₃, pH 7) and after 5 min, 2.5 μl of 0.08 M acetylthiocholine iodide in water was added. A substantially decreased mixture of 200 μl of the solubilization buffer and 200 μl of phosphate buffer pH 8 was used as a blank. After mixing, the absorbance of each sample at 412 nm was measured for 5 min. The experiments were performed in duplicates (Schwartz et al., 2007).

4.5. Testing of CART peptide-induced signaling pathways by immunoblotting

PC12 cells were grown on PEI-coated 24-well plates for 3 days to a density of 2×10^5 cells/well (Nunc, Roskilde, Denmark). Serum-free medium was applied 20 h before the experiment. The cells were incubated with 1 μM CART (61-102), 1 μM Nle⁶⁷ CART (61-102), or NGF (50 ng/ml) with or without the kinase inhibitors SP600125, SB203580 or U0126 (all 10^{-5} M, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 10 or 60 min at 37 °C.

After incubation, the cells were washed with cold PBS and lysed in sample buffer (62.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol with 5 mM sodium orthovanadate and 50 mM NaF) on ice.

For Western blotting, lysates of equal numbers of cells were subjected to electrophoresis using 4–12% SDS-PAGE gels. Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were used for protein transfer.

The membranes were blocked with 5% non-fat milk supplemented with 5 mM Na₃VO₄ and 50 mM NaF and then incubated with the appropriate primary antibody (c-Jun rabbit mAb, phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) rabbit mAb, SAPK/JNK rabbit mAb, phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) rabbit mAb, p38 MAPK rabbit mAb, or c-Fos rabbit mAb, all diluted 1:1000, or phospho-p44/42 MAPK [Thr202/Tyr204] mouse mAb, p44/42 MAPK mouse mAb, or actin rabbit mAb, all diluted 1:2000) at room temperature for 1 h.

Anti-mouse IgG HRP-linked antibody or anti-rabbit IgG HRP-linked antibody diluted 1:2000 was applied at room temperature for 1 h. All antibodies were purchased from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA. The membrane was developed with SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) following the manufacturer's instructions and detected with a ChemiDocTM XRS+ System with Image LabTM Software (Bio-rad, Hercules, CA, USA).

The relative density of the immunodetected bands was quantified using Image Lab software version 4.0.1. (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Band intensities were normalized using actin as an internal loading control and the ratios of the

intensity of the band corresponding to phosphorylated protein to the intensity of the band corresponding to total level of protein were calculated.

4.6. *c-Jun* immunohistochemistry

4.6.1. Tissue processing

All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and Czech Republic Law No. 246/1992 and were approved by the committee for experiments with laboratory animals of the Academy of Sciences of the Czech Republic. Inbred C57BL/mice (Anlab, Prague, Czech Republic) were housed at a temperature 23 °C under a daily cycle of 12 h light and dark (light from 6.00 a.m.) with free access to water and standard chow diet (St-1, Mlýn Kocanda, Jesenice, Czech Republic). At the age of 12 weeks, mice were implanted with cannulas into third ventricle (AP 2 mm, V 3 mm) as described previously (Maletínská et al., 2007). Animals were placed into separate cages and allowed to recover from the surgery for at least three days before being used in the experiment.

The *c-Jun* rabbit antibody was obtained from Cell Signaling Technology. For *c-Jun* immunohistochemical processing, overnight fasted mice ($n=5$ mice/group) were ICV treated with saline, CART (61-102) in dose of 0.1 µg/mouse and 1 µg/mouse or its analog Nle⁶⁷ CART (61-102) in dose of 1 µg/mouse as described previously (Maletínská et al., 2008). Ninety minutes after ICV injection, the mice were deeply anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg, intraperitoneally) and perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) containing 4% paraformaldehyde. Then the brains were removed, postfixed in the same fixative overnight at 4 °C, and infiltrated with 20% sucrose in 0.1 M PB for 48 h at 4 °C. The brains were cut into coronal sections of 30 µm thicknesses at –22 °C in a cryostat CM1950 (Leica Microsystems GmbH, Germany) and the sections were collected as free floating in cold (4 °C) PB. Location of ICV cannulas in the third ventricle was verified during sectioning.

4.6.2. Immunohistochemistry

Free floating sections were repeatedly washed in cold PB followed by preincubation in 3% H₂O₂ for 40 min at room temperature. They were incubated with *c-Jun* Rabbit mAb (1:400), diluted in 0.1 M PB containing 4% normal goat serum (Gibco, Grand Island, NY, USA), 0.5% Triton X-100 (Koch-Light Lab. Ltd., Colnbrook, Berks, England), and 0.1% sodium azide for 48 h at 4 °C. After several rinses in PB, the sections were incubated with biotinylated goat-anti-rabbit IgG (1:500, VectorStain Elite ABC, Vector Lab., Burlingame, CA, USA) for 90 min at room temperature. Next PB rinses were followed by incubation with the avidin–biotin peroxidase complex (1:250) for 90 min at room temperature. PB washing was followed by washing in 0.05 M sodium acetate buffer (SAB, pH 6.0). The *c-Jun* antigenic sites were visualized with 0.0266% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) dissolved in SAB containing 0.0006% H₂O₂ and 2.5% nickel ammonium sulfate, for 7 min. The metal-intensification of DAB produced black staining in the labeled nuclei. Finally, the sections were rinsed in 0.05 M SAB, mounted into 0.1% of gelatin dissolved in 0.0125 M SAB, air-dried and coverslipped with Permount (Sigma, St. Louis, MO, USA). Immunostaining

of negative control, which did not show any antiserum immunolabeling, included substitution of the primary antiserum with normal rabbit serum, and sequential elimination of the primary or secondary antibody from the staining series.

4.7. Statistical analysis

The data are presented as the means ± S.E.M of at least three independent experiments. The saturation binding curves were plotted using GraphPad software (San Diego, CA, USA) comparing the best fits for single-binding site model (K_d and B_{max} values were obtained from nonlinear regression analysis).

The data from the cell signaling experiments were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test using GraphPad software; $p < 0.05$ was considered statistically significant.

The data obtained from immunohistochemical study were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (Statistica 6.0 software) and presented as means ± S.E.M. $P < 0.05$ was considered as a minimum statistically significant difference. The *c-Jun* immunoreactive cells were counted separately in each side of the coronal sections within the NTS (from Bregma –7.48 mm to Bregma –7.32 mm), PVN (from Bregma –0.7 mm to –0.94 mm), ARC (from Bregma –1.58 mm to –1.94 mm), VMH and DMN (both from Bregma –1.46 mm to –1.82 mm) according to the mouse brain atlas (Franklin and Paxinos, 1997). Quantitative assessment for *c-Jun* immunohistochemistry was performed from the images captured by digital camera (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss) and Axio Scope.A1 light microscope (Carl Zeiss) in a computer screen obtained from 2 to 3 brain sections per animal. Representative sections were captured by the same computerized system by AxioVision 4.7. (Carl Zeiss) program.

Acknowledgments

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic No. P303/10/1368 and by the Academy of Sciences of the Czech Republic RVO:61388963. The study was also supported by the "BrainCentrum" grant of the Centrum of Excellence of the Slovak Academy of Sciences (Bratislava, Slovakia), and the National Reference Laboratory for Pesticide of the University of Veterinary Medicine and Pharmacy (Kosice, Slovakia). We gratefully acknowledge T. Elbert for the radioiodination of CART peptide.

R E F E R E N C E S

- Adler, E.M., Gough, N.R., Blundon, J.A., 2006. Differentiation of PC12 cells. *Sci. STKE* 351:tr9.
- Blechová, M., Nagelová, V., Záková, L., Demianová, Z., Zelezná, B., Maletínská, L., 2013. New analogs of the CART peptide with anorexigenic potency: the importance of individual disulfide bridges. *Peptides* 39, 138–144.
- Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37–40.

- Couceyro, P., Koylu, E., Kuhar, M., 1997. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J. Chem. Neuroanat.* 12, 229–241.
- Douglass, J., Daoud, S., 1996. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene* 169, 241–245.
- Eriksson, M., Taskinen, M., Leppä, S., 2007. Mitogen activated protein kinase-dependent activation of c-Jun and c-Fos is required for neuronal differentiation but not for growth and stress response in PC12 cells. *J. Cell. Physiol.* 210, 538–548.
- Franklin, K., Paxinos, G., 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York (Vol.).
- Greene, L.A., Tischler, A.S., 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.
- Herdegen, T., Kovary, K., Buhl, A., Bravo, R., Zimmermann, M., Gass, P., 1995. Basal expression of the inducible transcription factors c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, and Krox-24 in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 354, 39–56.
- Hou, J., Zheng, D.Z., Zhou, J.Y., Zhou, S.W., 2010. Orexigenic effect of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) after injection into hypothalamic nuclei in streptozotocin-diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 37, 989–995.
- Imaki, T., Shibasaki, T., Chikada, N., Harada, S., Naruse, M., Demura, H., 1996. Different expression of immediate-early genes in the rat paraventricular nucleus induced by stress: relation to corticotropin-releasing factor gene transcription. *Endocr. J.* 43, 629–638.
- Jones, D., Kuhar, M., 2008. CART receptor binding in primary cell cultures of the rat nucleus accumbens. *Synapse* 62, 122–127.
- Kim, M.J., Chang, U.J., Chung, J.H., Kim, H.K., Lim, B.O., Yamada, K., Lim, Y., Kang, S.A., 2005. Dissimilarity in Fos and Jun immunoreactivity in hypothalamic regions between obese and lean Zucker rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1982–1984.
- Kristensen, P., Judge, M., Thim, L., Ribell, U., Christjansen, K., Wulff, B., Clausen, J., Jensen, P., Madsen, O., Vrang, N., Larsen, P., Hastrup, S., 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72–76.
- Lakatos, A., Prinster, S., Vicentic, A., Hall, R., Kuhar, M., 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.
- Leppä, S., Eriksson, M., Saffrich, R., Ansorge, W., Bohmann, D., 2001. Complex functions of AP-1 transcription factors in differentiation and survival of PC12 cells. *Mol. Cell Biol.* 21, 4369–4378.
- Lin, Y., Hall, R.A., Kuhar, M.J., 2011. CART peptide stimulation of G protein-mediated signaling in differentiated PC12 cells: identification of PACAP 6-38 as a CART receptor antagonist. *Neuropeptides* 45, 351–358.
- Maixnerová, J., Hlaváček, J., Blokesová, D., Kowalczyk, W., Elbert, T., Sanda, M., Blechová, M., Zelezná, B., Slaninová, J., 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., Sloncová, E., Elbert, T., Slaninová, J., Zelezná, B., 2007. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur. J. Pharmacol.* 559, 109–114.
- Maletínská, L., Maixnerová, J., Matysková, R., Haugvicová, R., Pirmík, Z., Kiss, A., 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.
- Mao, P., Meshul, C.K., Thuillier, P., Goldberg, N.R., Reddy, P.H., 2012. CART peptide is a potential endogenous antioxidant and preferentially localized in mitochondria. *PLoS One* 7, e29343.
- Mao, P., Meshul, C.K., Thuillier, P., Reddy, P.H., 2013. Neurotransmitter CART as a new therapeutic candidate for Parkinson's disease. *Pharmaceuticals (Basel)* 6.
- Motulsky, H., Neubig, R., 2002. Analyzing radioligand binding data. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 7, Unit 7.5.
- Rogge, G., Jones, D., Hubert, G., Lin, Y., Kuhar, M., 2008. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 747–758.
- Sathanoori, R., Olde, B., Erlinge, D., Göransson, O., Wierup, N., 2013. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) protects beta cells against glucotoxicity and increases cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 288, 3208–3218.
- Schwartz, P.J., Blundon, J.A., Adler, E.M., 2007. A biochemical assay for acetylcholinesterase activity in PC12 cells. *Sci. STKE* 394:tr2.
- Sen, A., Lv, L., Bello, N., Ireland, J., Smith, G., 2008. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript accelerates termination of follicle-stimulating hormone-induced extracellularly regulated kinase 1/2 and Akt activation by regulating the expression and degradation of specific mitogen-activated protein kinase phosphatases in bovine granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 22, 2655–2676.
- Spiess, J., Villarreal, J., Vale, W., 1981. Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. *Biochemistry* 20, 1982–1988.
- Thim, L., Nielsen, P., Judge, M., Andersen, A., Diers, I., Egel-Mitani, M., 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.
- Thim, L., Kristensen, P., Nielsen, P., Wulff, B., Clausen, J., 1999. Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 2722–2727.
- Vicentic, A., Lakatos, A., Kuhar, M., 2005. CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 528, 188–189.
- Vrang, N., Larsen, P., Clausen, J., Kristensen, P., 1999a. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine-amphetamine-regulated transcript neurons. *J. Neurosci.* 19, RC5.
- Vrang, N., Tang-Christensen, M., Larsen, P., Kristensen, P., 1999b. 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, P., Hoshi, T., 2001. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 21, 7474–7480.
- Yu, Y., South, T., Wang, Q., Huang, X., 2008. Differential expression of hypothalamic CART mRNA in response to body weight change following different dietary interventions. *Neurochem. Int.* 52, 1422–1430.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Peptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

New analogs of the CART peptide with anorexigenic potency: The importance of individual disulfide bridges

Miroslava Blechová, Veronika Nagelová, Lenka Žáková, Zuzana Demianová, Blanka Železná, Lenka Maletínská*

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2012

Received in revised form

21 September 2012

Accepted 24 September 2012

Available online xxx

Keywords:

CART peptide analogs

Sulfitolysis

PC12 cells

Binding

Food intake

ABSTRACT

The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide is an anorexigenic neuropeptide that acts in the hypothalamus. The receptor and the mechanism of action of this peptide are still unknown. In our previous study, we showed that the CART peptide binds specifically to PC12 rat pheochromocytoma cells in both the native and differentiated neuronal phenotypes. Two biologically active forms, CART(55–102) and CART(61–102), with equal biological activity, contain three disulfide bridges. To clarify the importance of each of these disulfide bridges in maintaining the biological activity of CART(61–102), an Ala scan at particular S–S bridges forming cysteines was performed, and analogs with only one or two disulfide bridges were synthesized. In this study, a stabilized CART(61–102) analog with norleucine instead of methionine at position 67 was also prepared and was found to bind to PC12 cells with an anorexigenic potency similar to that of CART(61–102). The binding study revealed that out of all analogs tested, [Ala^{68,86}]CART(61–102), which contains two disulfide bridges (positions 74–94 and 88–101), preserved a high affinity to both native PC12 cells and those that had been differentiated into neurons. In food intake and behavioral tests with mice after intracerebroventricular administration, this analog showed strong and long-lasting anorexigenic potency. Therefore, the disulfide bridge between cysteines 68 and 86 in CART(61–102) can be omitted without a loss of biological activity, but the preservation of two other disulfide bridges and the full-length peptide are essential for biological activity.

© 2012 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides were described more than fifteen years ago [8] and were linked to a previously isolated hypothalamic peptide with unknown function [30]. CART is one of the most abundant hypothalamic transcripts [13], and both CART mRNA and CART peptide immunoreactivity were found not only in the hypothalamus but also in the anterior pituitary [19,32], adrenal medulla [9], islets of Langerhans [16,35], and gastrointestinal tract [11]. CART peptides are involved in feeding and energy expenditure, reward and reinforcement, stress, endocrine regulation, and sympathetic nerve-regulated activities, and recently, a neuroprotective effect of CART peptides has been reported (for reviews, see [3,28,36]).

CART peptides are evolutionarily conserved across species. The CART transcript is alternatively cleaved to a long and short form,

transcribed in two CART propeptides of 102 and 89 amino acids, which are identical in the rat and mouse, that yield two biologically active CART peptides, namely, CART(55–102) and (62–102) [31].

Central administration of the CART peptide decreased feeding in rodents even after starvation and induced Fos expression in brain nuclei involved in feeding behavior (paraventricular nucleus (PVN), brainstem) [34]. The CART peptide also attenuated the orexigenic effect of neuropeptide Y (NPY) [20]. Chronic central infusion of the CART peptide decreased food intake and caused weight loss in obese leptin-receptor-deficient Zucker rats, diet-induced obese rats, and their respective lean controls [21,29]. Despite the effects of the CART peptide on food intake, CART knockout mice had normal body weight and food intake but were more susceptible to high-fat-diet-induced obesity than wild-type mice [1].

In our previous study [24], we reported the synergistic and long-lasting effect of intracerebroventricularly administered CART(61–102) peptide and intraperitoneally administered cholecystokinin octapeptide (CCK-8) on food intake and Fos immunoreactivity in the PVN and nucleus tractus solitarius (NTS). The synergistic effect of CART(61–102) and CCK-8 via the CCK-A receptor on the regulation of food intake points to the integrated action of these peptides in the central nervous system [24].

* Corresponding author at: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic. Tel.: +420 220183525; fax: +420 220183571.

E-mail address: maletin@uochb.cas.cz (L. Maletínská).

Despite a great deal of effort, no receptors for CART peptides have been isolated and cloned to date. However, specific binding sites for ^{125}I -CART(61–102) were found in rat adrenal pheochromocytoma PC12 cells in both the native form and those that were differentiated into a neuronal phenotype [25]. These findings suggested a possible role for the CART peptide in the sympatho-adreno-medullary system, as had been previously suggested [9].

The identification of cells with specific CART peptide binding sites enabled us to look for shorter fragments that maintained the biological effect and, ideally, to identify a pharmacophore of CART peptides. In our previous study [23], fourteen fragments of the CART(61–102) peptide corresponding to structural loops between particular disulfide bridges were synthesized and tested for binding to PC12 cells in both the native form and those that had been differentiated into the neuronal phenotype. Of all the fragments tested, none displaced ^{125}I -CART(61–102) binding with a K_i lower than 10^{-5} M, and none inhibited food intake after its central administration to fasted mice. Previously studied fragments CART(62–76) [17] and C-terminal [Abu^{86,94}]CART(85–102) [10] were also resynthesized and tested but did not reveal any biological activity in our study either. The results suggested that a compact structure of the CART peptide containing disulfide bridges is necessary for the preservation of its full biological activity [23].

The present study provides insight into the structure–activity relationship of CART(61–102) analogs. We hypothesized that CART peptide containing one or more disulfide bridges could preserve the biological activity of the original molecule. Ala scanning at relevant pairs of cysteines was used to monitor the significance of individual disulfide bridges in CART(61–102) in binding to PC12 cells, food intake and behavioral activities in mice. A full-length [Nle⁶⁷]CART(61–102) analog and a shortened CART(74–102) representing C-terminal core of the molecule with two disulfide bridges were synthesized and tested as well.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of peptides

Analogues of CART(61–102) were assembled in a solid-phase ABI433A synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) by stepwise coupling of the corresponding Fmoc-amino acids to the growing chain on Fmoc-Leu-Wang LL resin (0.25 mmol, substitution 0.3 mmol/g for 3 disulfide bridges containing peptides; 0.1 mmol, substitution 0.21 mmol/g for 2 disulfide bridges containing peptides; both from Nova Biochem, San Diego, CA, USA). HBTU/HOBt in DMF was used as a coupling reagent. The fully protected peptides were synthesized and cleaved from the resins by a mixture of TFA/water/TIS/EDT/thioanisole (90:1:1:3:5) for analog **1** and TFA/TIS/water (95:2.5:2.5) for analogs **2–9**. Peptide **9** had all cysteines protected by an acetamidomethyl (Acm) group. TFA filtrates were evaporated at room temperature by nitrogen. The residues were precipitated with *tert*-butyl-methylether, collected by suction, dissolved in acetonitrile/water and lyophilized.

The structures of synthesized peptides **1–9** are described in Table 1.

2.1.1. Synthesis of analog **1**

Sulfitolysis: Crude analog **1** in a reduced SH form was dissolved and stirred in 25 ml of buffer (100 mM Tris, 250 mM Na_2SO_3 , 80 mM $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$, 7 M GuaHCl, pH 8.6) for 3 h at room temperature to convert SH groups to S-sulfonates [18]. Analog **1** was then desalted on a Sephadex G10 (column 4 cm \times 85 cm) in 50 mM NH_4HCO_3 and purified using RP-HPLC (Waters 600; column: Waters Symmetry 300, 19 cm \times 150 mm, 5 μm).

Disulfide bridge combination: Analog **1** (10 mg) was dissolved in 1.5 ml of degassed 0.1 M Gly/NaOH buffer, pH 7.7. Dithiothreitol (DTT) in a minimum volume of a degassed 0.1 M Gly/NaOH buffer, pH 7.7, was rapidly added to the peptide solution to give an SH:SSO₃[−] molar ratio of 1.2. The solution was stirred for 15 min in a capped vessel at room temperature. After the reduction of SSO₃[−] to SH, 3 ml of aerated 0.1 M Gly/NaOH buffer, pH 7.7, was added, and the resulting solution was stirred for 48 h in 4 °C in an open vessel to permit air oxidation [5]. Glacial acetic acid (3 ml) was added to the mixture to terminate the reaction. The resulting mixture was applied to a low-pressure column (Sephadex G-50 in 1 M acetic acid, 2 cm \times 75 cm). Fractions containing analog **1** were purified using RP-HPLC (Waters 600; column: Waters Symmetry 300, 19 cm \times 150 mm, 5 μm). The molecular weight of analog **1** was confirmed by mass spectroscopy (LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)).

2.1.2. Synthesis of analogs **2–8** containing 1–2 disulfide bridges

Relevant pairs of cysteines were protected by a Trt group and an Acm group. First, cysteines were cyclized by air oxidation after Trt deprotection (analog **2–8**), and then, the Acm group was removed, and the cysteines were oxidized by iodine (analog **2, 6–8**). To complete the oxidation by iodine, ascorbic acid was used (a modification of a procedure described in [26]).

All peptides **1–9** were isolated using a Waters 600 HPLC instrument on a reverse phase C18 column (Waters Symmetry 300, 19 cm \times 150 mm, 5 μm). Oxidation changes were monitored by analytical HPLC (Waters Alliance, Vydac column, 4.6 cm \times 250 mm, 5 μm). The purity and identity of all peptides were determined by analytical HPLC and using a MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Germany)/Q-TOF micro (Waters) MS technique.

The positions of disulfide bridges in the CART peptide analogs were verified using the procedure described in [33].

Peptide CART(61–102) was a gift from Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark).



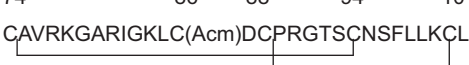

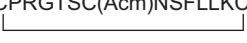
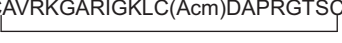



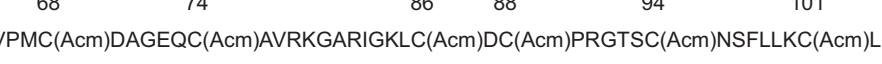
2.2. Iodination of CART(61–102)

CART(61–102) was iodinated at Tyr⁶² with Na¹²⁵I using IODO-GENTM (Pierce, Rockford, IL, USA)-coated Eppendorf tubes and purified according to a published procedure [12]. The specific activity of ^{125}I -CART(61–102) was approximately 2000 Ci/mmol. The peptide was stored in aliquots at −20 °C and used for binding studies within 1 month.

2.3. Cell culture

The rat pheochromocytoma cell line PC12 was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). The cells were grown in RPMI 1640 medium (Sigma, St. Luis, MO, USA) supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, 4.5 g/l glucose, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, and 1.5 g/l sodium bicarbonate, pH 7.4, and passaged once per week to maintain the cells in the exponential growth phase. For binding studies, the cells were seeded on polyethylene imine-coated 24-well plates (Corning, NY, USA). To reach a density of approximately 5×10^5 cells/well, which was found to be optimal for binding experiments, the non-differentiated cells were allowed to grow for 3 days. Differentiation was induced by the addition of nerve growth factor (50 ng/ml) to the fresh medium on days 1, 3, and 5. On day 7, cells at a density of approximately 5×10^5 cells/well were used in the experiment. Differentiation was checked microscopically, and the number of cells per well was counted before and after the experiment.

Table 1
Structure of CART peptide analogs.

Analog	Structure
CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 KYGQVPMCDAGEQCAVRK GARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL 
Analog 1 [Nle ⁶⁷] CART(61-102)	61 67 68 74 86 88 94 101 KYGQVP(Nle)CDAGEQCAVRK GARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL 
Analog 2 [Cys(Acm) ⁸⁶] CART(74-102)	74 86 88 94 101 CAVRK GARIGKLC(Acm)DCPRGTSCNSFLLKCL 
Analog 3 [Ala ^{74, 94} , Cys(Acm) ^{68, 86}] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 KYGQVPMCDAGEQA AVRK GARIGKLCDC(Acm)PRGTSANSFLLK(Acm)L 
Analog 4 [Ala ^{68, 86} , Cys(Acm) ^{74, 94}] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 KYGQVPMADAGEQC(Acm)AVRKGARIGKLADCPRGTSC(Acm)NSFLLKCL 
Analog 5 [Ala ^{88, 101} , Cys(Acm) ^{68, 86}] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 KYGQVPMC(Acm)DAGEQCAVRK GARIGKLC(Acm)DAPRGTSCNSFLLKAL 
Analog 6 [Ala ^{74, 94}] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 KYGQVPMCDAGEQA AVRK GARIGKLCDCPRGTSANSFLLKCL 
Analog 7 [Ala ^{68, 86}] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 KYGQVPMADAGEQCAVRK GARIGKLADCPRGTSCNSFLLKCL 
Analog 8 [Ala ^{88, 101}] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 KYGQVPMCDAGEQCAVRK GARIGKLC DAPRGTSCNSFLLKAL 
Analog 9 [Cys(Acm) ^{68, 74, 86, 88, 94, 101}] CART(61-102)	61 68 74 86 88 94 101 KYGQVPMC(Acm)DAGEQC(Acm)AVRKGARIGKLC(Acm)DC(Acm)PRGTSC(Acm)NSFLLK(Acm)L 

Nle, norleucine; Acm, acetamidomethyl.

2.4. Binding to intact plated cells

Competition binding experiments were performed according to Motulsky and Neubig [27].

Plated cells were incubated with 10^{-10} M 125 I-CART(61-102) and 10^{-11} to 10^{-3} M non-radioactive CART peptides in a total volume of 0.25 ml of binding buffer (20 mM HEPES buffer, pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 1 mg/ml BSA, and 0.1 mg/ml basic pancreatic trypsin inhibitor) for 30 min at 37 °C as previously described [25]. Non-specific binding was determined using 10^{-6} M CART(61-102).

After incubation, the cells were washed with washing buffer (10 mM HEPES buffer, pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl₂) and then solubilized in 0.1 N NaOH. Bound radioactivity was determined by γ -counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). The total binding amounted to 3–8% of the radioactivity added, and the non-specific binding was less than 15% of the total binding. Experiments were carried out in duplicate at least three times. All compounds tested were dissolved in water and stored frozen in aliquots until use.

2.5. Experimental animals

All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and Czech Republic Law No. 246/1992 and were approved by the committee for experiments with laboratory animals of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

Inbred C57BL/6 male mice (AnLab, Prague, Czech Republic) were housed at a temperature of 23 °C under a daily cycle of 12 h of light and dark (light from 6:00 a.m.) with free access to water and a standard chow diet that contained 25%, 9% and 66% calories from protein, fat and carbohydrate, respectively. The energy content of the diet was 3.4 kcal/g (St-1, Mlýn Kocanda, Jesenice, Czech Republic).

2.6. Food intake experiments

At the age of 12 weeks, mice were implanted with cannulas into the third ventricle (AP 2 mm, V 3 mm) as described previously [25]. Animals were placed into separate cages and allowed to recover from surgery for at least three days before being used in the experiment.

On the day of the experiment at 8:00 a.m., mice that had fasted for 17 h were injected intracerebroventricularly (ICV) with 5 μ l of either saline or CART(61–102) or CART peptide analogs at a dose of 0.1–4 nmol/mouse (dissolved in saline) ($n=6$ –12).

Fifteen minutes after the ICV injection, the mice were given weighed food pellets. Food consumption was determined every 30 min for 5 h. Animals had free access to water during the experiment. The results are expressed in grams of food consumed. The placement of the cannula was verified histologically after the experiment.

2.7. Behavioral studies

2.7.1. Open-field locomotor activity

Locomotor activity was measured using the VideoMot system (TSE Systems, Bad Homburg, Germany). Fed mice were placed individually in an open field (0.5 \times 0.5 m), and their locomotor activity, i.e., total distance traveled, was measured for 10 min. Testing started 15 min after the ICV administration of saline, CART(61–102) (0.2 nmol/mouse) or CART peptide analog **1** (0.1 and 0.2 nmol/mouse) or analog **7** (0.2 and 1 nmol/mouse) ($n=6$).

2.7.2. Hot-plate analgesic test

Immediately following the locomotor activity test, analgesia was measured with a hot-plate analgesia meter (TSE Systems, Bad Homburg, Germany) set at 53 $^{\circ}$ C. Latency of front paw licking and latency of jumping were measured. The end-point of the test was the jump, after which the animals were immediately removed from the plate.

2.8. Analysis of binding data and statistics

Data are presented as the means \pm S.E.M. Competitive binding curves were plotted using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA) using the best fit for single-binding-site models (IC₅₀ values were obtained from a non-linear regression analysis). Inhibition constants (K_i) were calculated from the IC₅₀ using the Cheng–Prusoff equation [6]. The K_d from saturation experiments was 0.48 nM for non-differentiated cells and 1.90 nM for differentiated cells, as described previously [25].

Food intake and behavioral data were analyzed using a one-way ANOVA (analysis of variance) followed by Dunnett's post hoc test using Graph-Pad Software; $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Synthesis of CART peptide analogs

The structures of CART(61–102) and its analogs used in this study are given in Table 1.

The linear sequences of the peptides were assembled on solid support using common protocols for peptide synthesis, and disulfide bonds were closed as described in Section 2. The purity of all peptides was higher than 90%.

Analog **1** was full-length CART(61–102) with the methionine at position 67 replaced by the more stable norleucine to avoid the previously described oxidation of Met [23].

The correct arrangement of disulfide bridges in Analog **1** was achieved by the reduction of the S-sulfonated derivative of [Nle⁶⁷]CART(61–102) at pH 7.7 in the presence of a nearly stoichiometric amount of dithiothreitol and by subsequent slow air oxidation of the free sulfhydryl groups. This procedure profits from the natural folding of the CART molecule and the spontaneous formation of the correct disulfide bridges. The yield of the product

Table 2

Displacement of ¹²⁵I-CART(61–102) binding by CART peptide analogs on PC12 cells.

Analog	Non-differentiated cells K_i [M]	Differentiated cells K_i [M]
CART(61–102)	$(7.78 \pm 3.38) \times 10^{-9}$	$(4.73 \pm 1.73) \times 10^{-9}$
Analog 1	$(3.98 \pm 2.10) \times 10^{-9}$	$(3.61 \pm 0.705) \times 10^{-9}$
Analog 2	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$
Analog 3	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
Analog 4	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
Analog 5	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
Analog 6	$(2.43 \pm 3.37) \times 10^{-5}$	$(1.34 \pm 0.698) \times 10^{-5}$
Analog 7	$(3.95 \pm 1.77) \times 10^{-8}$	$(1.85 \pm 0.0328) \times 10^{-8}$
Analog 8	$(3.37 \pm 1.95) \times 10^{-6}$	$(4.24 \pm 1.60) \times 10^{-6}$
Analog 9	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$

Mean \pm S.E.M. of at least three separate experiments.

K_i was calculated using Cheng–Prusoff equation (concentration of the radioligand was 0.1 nM and K_d taken from saturation experiments was 0.48 nM for non-differentiated cells and 1.90 nM for differentiated cells [25]).

was approximately 14%. The resulting product was analyzed by RP-HPLC and identified by mass spectroscopy.

Analog **2** was a shorter analog of CART(61–102), namely, CART(74–102), which contains two disulfide bridges and has the odd Cys⁸⁶ stably protected with AcM.

CART(61–102) full-length analogs **3–8** were the result of the Ala scan of the cysteine pairs 68–86, 74–94, and 88–101 that form disulfide bridges. Analogs **3–5** contained one disulfide bridge (one pair of cysteines replaced by alanines and one pair of cysteines protected by AcM), and analogs **6–8** had two disulfide bridges (one pair of cysteines replaced by alanines).

Analog **9** was a linear CART(61–102) with all six cysteines protected by AcM.

3.2. Competitive binding of CART(61–102) analogs to PC12 cells

The K_d of CART(61–102) binding in non-differentiated and NGF-differentiated PC12 cells was previously determined to be in the low nanomolar range [25].

The K_i resulting from the displacement of ¹²⁵I-CART(61–102) by CART(61–102) and its synthetic analogs **1–9** are summarized in Table 2. CART(61–102) and analog **1** had K_i values in the nanomolar range, analog **6** in the 10^{-5} M range, analog **7** in the 10^{-8} M range and analog **8** in the 10^{-6} M range (see Table 2). The remaining analogs tested did not displace ¹²⁵I-CART(61–102) binding even at a concentration of 10^{-4} M (Table 2). The K_i values for the binding of particular ligands to native and NGF-differentiated PC12 cells were comparable in this study.

3.3. Food intake experiments

The time course of food intake after the ICV administration of CART(61–102) and CART analogs **1** and **7** (the analogs with the highest affinity to PC12 binding sites) and analog **2** in fasted mice is shown in Fig. 1. The decrease in food intake after administration of the natural peptide CART(61–102) corresponded with our previously published values [25]. Analog **1** showed a strong and long-lasting anorexigenic effect (Fig. 1b), which was more significant than that of CART(61–102) at a dose of 0.2 nmol/mouse after 75 min (Fig. 1a). Analog **7** also very significantly decreased food intake (Fig. 1c); however, higher doses (0.2 and 1 nmol/mouse) of analog **7** were chosen because of one order of magnitude lower binding affinity compared to CART(61–102) (Table 2). Shortened analog **2** did not show any significant effect even at a dose of 4 nmol (Fig. 1c).

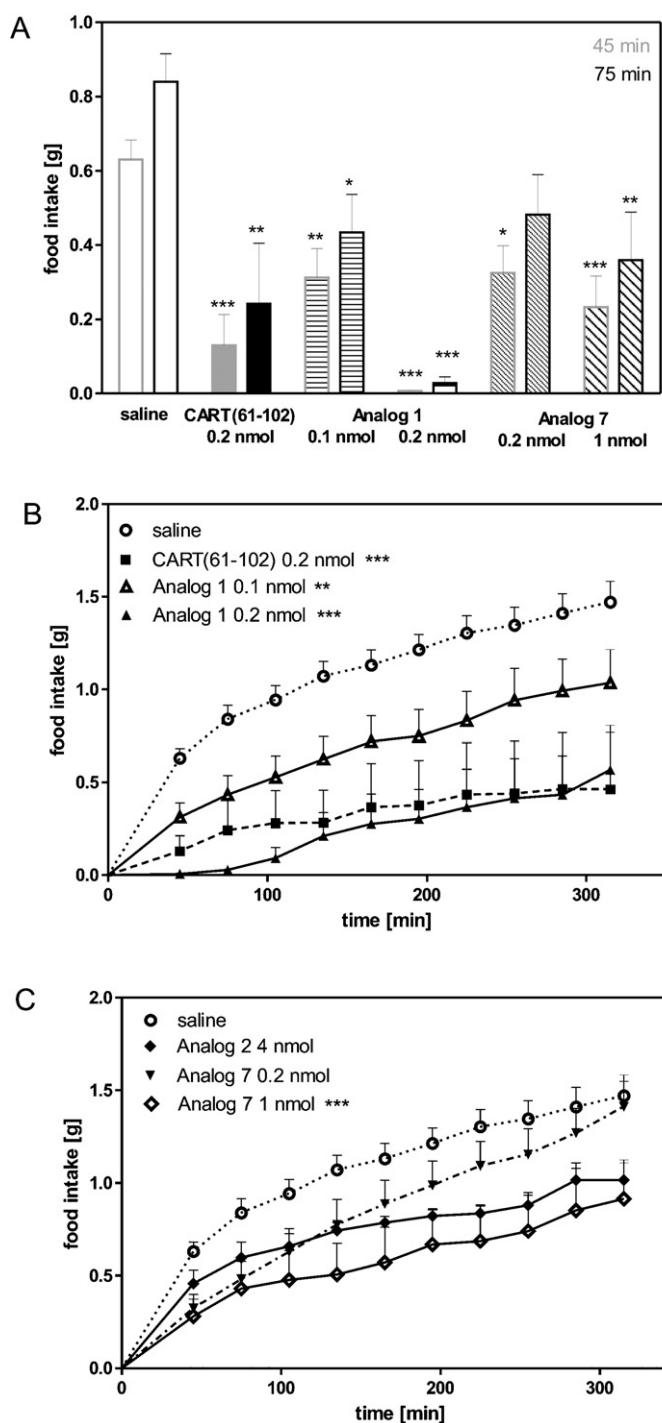


Fig. 1. The effect of CART(61–102) and selected analogs on the food intake of fasted mice. CART(61–102) was administered ICV at 0.2 nmol/mouse, analog **1** at 0.1 and 0.2 nmol/mouse, **7** at 0.2 and 1 nmol/mouse and **2** at 4 nmol/mouse. A/food intake 45 and 75 min after injection and B and C/cumulative food intake 300 min after injection was measured. Data are expressed in grams of food consumed per mouse. Significance is noted for * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the respective saline-treated group ($n = 6-12$).

3.4. Behavioral effects

The aim of the behavioral tests was to determine whether analogs **1** and **7** that exhibited biological activity similar to CART(61–102) in the binding test and food intake test would therefore also exhibit behavioral effects similar to CART(61–102). The open-field locomotor activity of fed lean mice after ICV

administration of CART(61–102) and analogs **1** and **7** was measured for 10 min. The results clearly showed that CART(61–102) and analog **1** at a dose of 0.2 nmol/dose and analog **7** at dose of 1 nmol/mouse significantly attenuated the distance traveled in the open field compared to the effect of the saline-treated group (Fig. 2a).

The analgesic test on the hot plate showed a significant latency of paw licking and jumping latency after injection of the above-mentioned compounds compared to the saline treated group (Fig. 2b and c).

4. Discussion

Obesity is a major public health problem associated with morbidity and mortality that continues to increase worldwide. Obesity increases the risk for a number of medical conditions, including type II diabetes mellitus, hypertension, coronary heart disease, osteoarthritis, respiratory problems and cancer, and appropriate treatment is not currently available [15]. Recently discovered anorexigenic neuropeptides involved in food intake regulation, such as CART peptides, represent new possibilities in the development of future anti-obesity agents. Therefore, potent analogs of CART peptides that centrally attenuate feeding and obesity would be very useful.

Based on our discovery of the specific binding of 125 I-CART(61–102) to the rat adrenal pheochromocytoma cell line PC12 [25] and our study of shorter fragments of CART(61–102) corresponding to the structural loops between cysteines [23], we extended our search for the minimal biologically active structure of CART peptides. Despite the fact that the CART peptide receptor has not yet been identified, the strong and specific binding of CART peptides to PC12 cells [25] is a powerful tool that enables us to test CART peptide analogs. Recently, the specific binding of the CART peptide to PC12 cells was confirmed by others [22], and MAPK/ERK1/2 (mitogen-activated protein kinase/extracellular-regulated kinase) signaling was suggested to be an effect of CART(55–102).

In the present study, analog **1**, which replaces the methionine at position 67 with norleucine, was synthesized. Analog **1**, [Nle⁶⁷]CART(61–102), was prepared using the strategy of reduction of the S-sulfonated derivative followed by a subsequent slow air oxidation of free sulfhydryl groups. S-sulfonated derivatization prepared by the oxidative sulfitolysis of cysteine has been used in the synthesis of insulin and insulin analogs [5], proinsulin [4] and ribonuclease A [14]. This procedure benefitted from the spontaneous folding of the molecule with the correct arrangement of the disulfide bridges. We used a similar approach to that used for the preparation of insulin [5] with the only change being that pH 7.7 was used instead of pH 10.6 to accommodate the basic isoelectric point of the CART derivative (8.9). The yield was satisfactory (14%) considering the necessity of forming three disulfide bridges.

Analog **1** showed high binding affinity both to native PC12 cells and those that had been differentiated to neurons. K_i values were in the 10^{-9} M range, similar to those of CART(61–102), which was used as a standard compound. We suggest that analog **1**, with Nle⁶⁷ instead of Met, is more stable because Met oxidation [23] is avoided.

To clarify the importance of each of the three disulfide bridges in the CART(61–102) molecule to its biological activity, an Ala scan at the particular cysteines forming disulfide bridges was performed, and analogs with only one or two disulfide bridges were synthesized. Analogs **3**, **4** and **5** contained one disulfide bridge (in positions 68–86, 88–101 and 74–94, respectively) and did not bind to either the native or NGF-differentiated PC12 cells in the range of concentrations tested.

In contrast, analogs containing two different disulfide bridges, analog **6** (S–S bridges 68–86, 88–101), analog **7** (S–S bridges 74–94

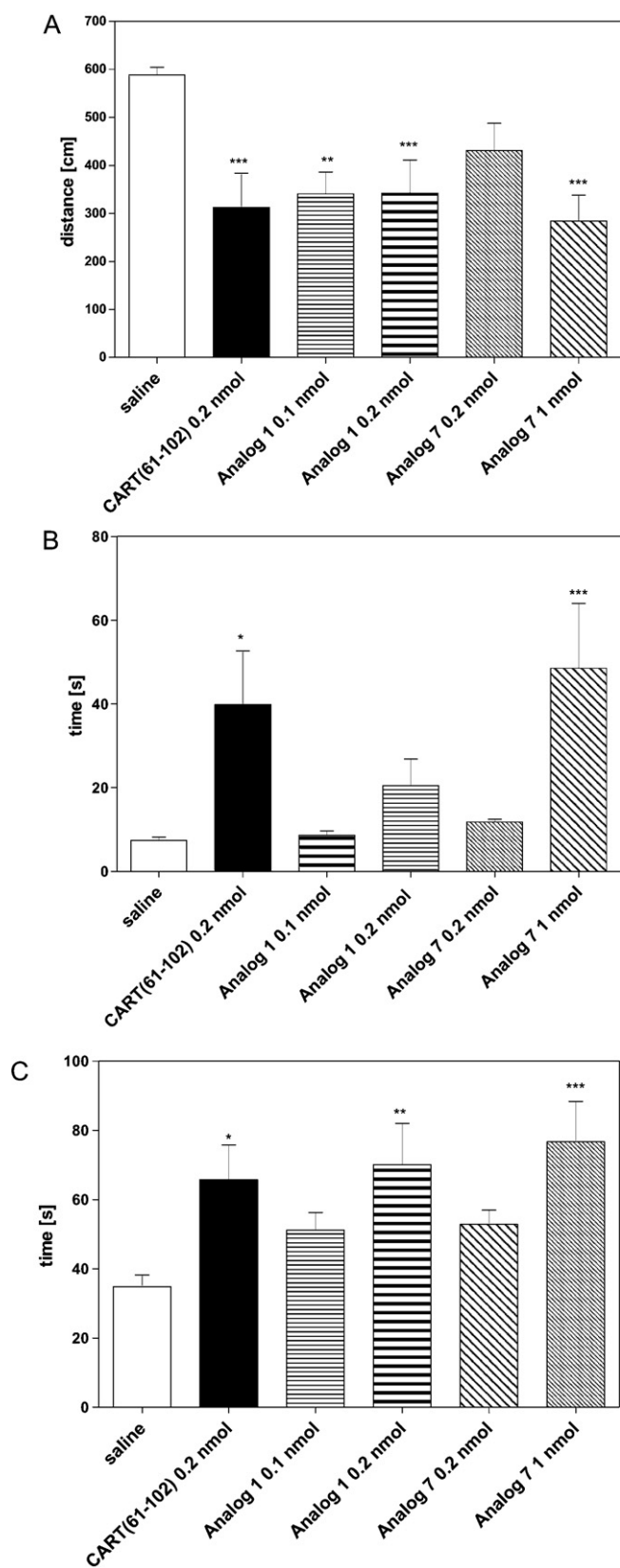


Fig. 2. The behavioral activity of fed mice after the ICV administration of saline, CART(61-102) (0.2 nmol/mouse) or analog **1** at 0.1 and 0.2 nmol/mouse and **7** at 0.2 and 1 nmol/mouse. A/open-field test (total distance traveled in 10 min), B/hot-plate test: paw-licking latency, C/hot-plate test: latency to jump. Significance is noted for * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus the respective saline-treated group ($n = 6$).

and 94-101) and analog **8** (S-S bridges 68-86 and 74-94), showed detectable specific binding to PC12 cells, although with different affinities. Whereas analogs **6** and **8** lost a large portion of their ability to displace ^{125}I -CART(61-102) binding, resulting in K_i values in the 10^{-5} and 10^{-6} M range, respectively, analog **7** preserved most of the binding potency of the original CART(61-102) molecule. Thus, a disulfide bridge in positions 68-86 does not seem to be essential for binding to PC12 cells. However, analog **2**, containing identical disulfide bridges to analog **7** but lacking the N-terminal residues 61-73, exhibited a K_i higher than 10^{-4} M. This finding indicates the importance of the N-terminal region of CART(61-102) for binding PC12 cells.

The fundamental importance of disulfide bridges in CART peptides was also confirmed by a binding experiment with the linear CART(61-102) analog **9**. This peptide did not show any binding affinity in the range of concentrations measured. The lack of biological activity of unfolded CART(55-102) was suggested previously [7].

The analogs with the highest binding potency to PC12 cells, i.e., analogs **1** and **7**, were submitted to further in vivo tests. First, we tested the ability of both analogs to influence food intake in mice fasted overnight after ICV administration. The doses for CART(61-102), used as a standard compound that significantly decreases food intake, were chosen based on previous publications [2,24,25,33]. At the time of maximal effect, i.e., 45 and 75 min after administration, analog **1** (dose 0.2 nmol/mouse) and analog **7** (1 nmol/mouse) highly significantly ($P < 0.001$) lowered food intake compared to the saline-treated group. A higher dose of analog **7** was used because its binding affinity was one order of magnitude weaker than CART(61-102). Analog **2**, a fragment of analog **7**, did not decrease food intake at doses up to 4 nmol/mouse. The anorexigenic effect of a dose of 0.2 nmol/mouse of analog **1** at 75 min was even more significant than that of CART(61-102), and the effect lasted more than 5 h.

To extend our in vivo study and to support the feeding test with additional data, behavioral tests with mice after ICV administration were performed. It was previously described that CART(61-102) and/or CART(55-102) influenced behavior in the open field test [17,24] and caused analgesia [2]. In the present study, a significant decrease of locomotor activity in the open-field test after the administration of analogs **1** and **7** was observed, which is a typical satiety behavior. In addition, a significant but mild analgesic effect in the hot-plate test (significant latency in jumping after administration of analog **1** and latency both in licking and jumping after administration of CART(61-102) and analog **7**) was monitored. Evaluation of analgesic effect using latency to jump showed to be more precise compared to paw licking and led to more accurate results. However, analgesic effect was weaker compared to the anorexigenic effect and CART(61-102) and analogs **1** and **7** differed slightly in the analgesic potency, similarly as described previously by Bannon et al. [2] for CART(61-102) and CART(55-102).

Both analogs thus showed similar potency compared to natural CART(61-102) but with prolonged effects. Analog **7**, containing only two disulfide bridges, is easier to synthesize than the original peptide with three bridges and may serve as the basic analog for future structure activity studies. This is the first analog described with a less complicated structure and the full spectrum of activity of the original molecule.

In conclusion, CART(61-102) analogs were synthesized, and their biological activities were tested. The full-length analog [Nle⁶⁷]CART(61-102) with three disulfide bridges was synthesized using sulfitolysis and showed high binding and anorexigenic potency with a prolonged effect. Of the analogs containing two instead of three disulfide bridges, only the analog lacking a disulfide bridge at position 68-86 preserved the affinity for PC12 cells and showed a strong anorexigenic effect. This analog thus has the

potential to be used to construct derivatives for identifying the CART receptor and further elucidation of the physiological role of the CART peptides.

Acknowledgements

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic [P303/10/1368] and the Academy of Sciences of the Czech Republic [RVO: 61388963].

We gratefully acknowledge the excellent technical assistance of H. Vysušilová. We would like to thank T. Elbert for the radioiodination of CART(61–102), P. Majer for suggestions concerning the structure of the analogs and J. Jiráček for valuable advice on peptide synthesis.

References

- [1] Asnicar M, Smith D, Yang D, Heiman M, Fox N, Chen Y, et al. Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. *Endocrinology* 2001;142:4394–400.
- [2] Bannon A, Seda J, Carmouche M, Francis J, Jarosinski M, Douglass J. 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* 2001;299:1021–6.
- [3] Broberger C. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and food intake: behavior in search of anatomy. *Drug Dev Res* 2000;12:4–42.
- [4] Bullesbach E. Semisynthesis of a shortened open-chain proinsulin. *Tetrahedron Lett* 1982;23:1877–80.
- [5] Chance RE, Hoffmann JA, Kroeff EP, Johnson MG, Schirmer EW, Bromer WW. The production of human insulin using recombinant DNA technology and a new chain combination procedure. Rockford, IL, USA: Pierce Chemical Company; 1981.
- [6] Chang C, Cheng Y. Ribonucleotide reductase isolated from human cells. Heterogeneity among the sources. *Biochem Pharmacol* 1978;27:2297–300.
- [7] Couceyro P, Fritz T. Production of recombinant CART peptides in *Escherichia coli* with agonist and antagonist effects on food intake in rats. *Protein Expr Purif* 2003;32:185–93.
- [8] Douglass J, Daoud S. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene* 1996;169:241–5.
- [9] Dun S, Brailoiu G, Yang J, Chang J, Dun N. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and sympatho-adrenal axis. *Peptides* 2006;27:1949–55.
- [10] Dylag T, Rafalski P, Kotlinska J, Silberring J. CART (85–102)-inhibition of psychostimulant-induced hyperlocomotion: importance of cyclization. *Peptides* 2006;27:3183–92.
- [11] Ekblad E, Kuhar M, Wierup N, Sundler F. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: distribution and function in rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2003;15:545–57.
- [12] Elbert T, Veselá I. Conditions for successful labeling of oxidation sensitive peptides by Na¹²⁵I – IODO-GEN™ system. *J Labelled Compd Radiopharm* 2010;53:288–93.
- [13] Gautvik KM, de Lecea L, Gautvik VT, Danielson PE, Tranque P, Dopazo A, et al. Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:8733–8.
- [14] Gutte B, Merrifield RB. The synthesis of ribonuclease A. *J Biol Chem* 1971;246:1922–41.
- [15] Heal DJ, Gosden J, Smith SL. What is the prognosis for new centrally-acting anti-obesity drugs. *Neuropharmacology* 2012;63:132–46.
- [16] Jensen P, Kristensen P, Clausen J, Judge M, Hastrup S, Thim L, et al. The hypothalamic satiety peptide CART is expressed in anorectic and non-anorectic pancreatic islet tumors and in the normal islet of Langerhans. *FEBS Lett* 1999;447:139–43.
- [17] Kask A, Schiöth H, Mutulis F, Wikberg J, Rågo L. Anorexigenic cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide intensifies fear reactions in rats. *Brain Res* 2000;857:283–5.
- [18] Katsoyannis PG, Tometsko A, Zalut C, Johnson S, Trakatellis AC. Studies on the synthesis of insulin from natural and synthetic A and B chains. I. Splitting of insulin and isolation of the S-sulfonated derivatives of the A and B chains. *Biochemistry* 1967;6:2635–42.
- [19] Koylu E, Couceyro P, Lambert P, Ling N, DeSouza E, Kuhar M. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol* 1997;9:823–33.
- [20] Kristensen P, Judge M, Thim L, Ribel U, Christjansen K, Wulff B, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998;393:72–6.
- [21] Larsen P, Vrang N, Petersen P, Kristensen P. Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42–89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res* 2000;8:590–6.
- [22] Lin Y, Hall RA, Kuhar MJ. CART peptide stimulation of G protein-mediated signaling in differentiated PC12 cells: identification of PACAP 6–38 as a CART receptor antagonist. *Neuropeptides* 2011;45:351–8.
- [23] Maixnerová J, Hlaváček J, Blokesová D, Kowalczyk W, Elbert T, Sanda M, et al. Structure–activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. *Peptides* 2007;28:1945–53.
- [24] Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Pirník Z, Kiss A, et al. Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci* 2008;9:101.
- [25] Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Sloncová E, Elbert T, et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol* 2007;559:109–14.
- [26] Monincová L, Slaninová J, Fučík V, Hovorka O, Voburka Z, Bednářová L, et al. Lasiocepsin, a novel cyclic antimicrobial peptide from the venom of eusocial bee *Lasioglossum laticeps* (Hymenoptera: Halictidae). *Amino Acids* 2012;43:751–61.
- [27] Motulsky H, Neubig R. Analyzing radioligand binding data. *Curr Protoc Neurosci* 2002 [chapter 7, unit 7.5].
- [28] Rogge G, Jones D, Hubert G, Lin Y, Kuhar M. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:747–58.
- [29] Rohner-Jeanrenaud F, Craft L, Bridwell J, Suter T, Tinsley F, Smiley D, et al. Chronic central infusion of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART 55–102): effects on body weight homeostasis in lean and high-fat-fed obese rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:143–9.
- [30] Spiess J, Villarreal J, Vale W. Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. *Biochemistry* 1981;20:1982–8.
- [31] Thim L, Kristensen P, Larsen P, Wulff B. CART, a new anorectic peptide. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1281–4.
- [32] Thim L, Kristensen P, Nielsen P, Wulff B, Clausen J. Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2722–7.
- [33] Thim L, Nielsen P, Judge M, Andersen A, Diers I, Egel-Mitani M, et al. Purification and characterisation of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast. *FEBS Lett* 1998;428:263–8.
- [34] Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen P, Kristensen P. Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res* 1999;818:499–509.
- [35] Wierup N, Björkqvist M, Kuhar M, Mulder H, Sundler F. CART regulates islet hormone secretion and is expressed in the beta-cells of type 2 diabetic rats. *Diabetes* 2006;55:305–11.
- [36] Zhang M, Han L, Xu Y. Roles of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:586–92.

V. PRAZIENKOVA, A. TICHA, M. BLECHOVA, A. SPOLCOVA, B. ZELEZNA, L. MALETINSKA

PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF LIPIDIZED ANALOGS OF PROLACTIN-RELEASING PEPTIDE WITH A MODIFIED C-TERMINAL AROMATIC RING

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Prolactin-releasing peptide (PrRP) is an anorexigenic neuropeptide expressed in the brain where it regulates food intake and energy expenditure. The C-terminal Arg-Phe-NH₂ of PrRP is crucial for its biological activity. In our previous study, we showed that PrRP analogs myristoylated or palmitoylated at the N-terminus seem to cross the blood-brain barrier and lower food intake following peripheral administration. In this study, myristoylated and palmitoylated PrRP31 analogs with a modified C-terminal Phe were designed and tested. Lipidized analogs containing Phe³¹ replaced by aromatic non-coded amino acids or tyrosine revealed high binding affinity to rat pituitary RC-4B/C cells with endogenous PrRP and neuropeptide FF 2 receptors and to CHO-K1 cells overexpressing either PrRP or neuropeptide FF 2 receptors. The analogs also showed strong agonistic properties at the GPR10 receptor using the beta-lactamase reporter gene assay. Moreover, lipidized PrRP analogs, especially those that were palmitoylated, demonstrated strong and long-lasting anorexigenic effects in fasted mice after subcutaneous administration. The most efficient PrRP31 analogs with PheCl₂³¹, either palmitoylated or myristoylated at the N-terminus, are promising candidates for the study of food disorders, possibly for anti-obesity treatment. Despite the therapeutic potential in targeting central GPR10, the endogenous ligand PrRP cannot cross the blood-brain barrier. Understanding biological activity and transport of novel structural analogs of PrRP with a potential central anorexigenic effect is of key therapeutic significance.

Key words: *prolactin-releasing peptide, blood-brain barrier, food intake, lipidization, phenylalanine derivatives*

INTRODUCTION

Obesity is nowadays a widely spread disease in both developed and developing countries, reaching epidemic proportions and is considered one of the biggest health problems by the WHO (1). Obesity affects both adults and children and is related to type 2 diabetes, cardiovascular and other serious diseases (2, 3).

Food intake is regulated by peripheral signals relayed to the brain regions involved in the regulation of energy balance. Centrally produced and acting anorexigenic neuropeptides can significantly decrease food intake after central, but not peripheral administration because only few of them are able to cross the blood-brain barrier (BBB).

The anorexigenic neuropeptide prolactin-releasing peptide (PrRP) was discovered as an endogenous ligand of an orphan G-protein-coupled receptor GPR10 (4, 5). It was originally considered a prolactin-releasing factor (4). Currently, it is known that its prolactin-releasing effect is negligible compared to thyrotropin-releasing hormone (TRH) (6). Lawrence *et al.* proposed PrRP as a regulator of energy balance (7), due to its mRNA expression in brain nuclei involved in regulation of food intake (8, 9). Central injection of PrRP results in increased energy expenditure and core body temperature, effects additive to those of leptin (10). Dodd *et al.* suggested PrRP as a mediator of thermogenic actions of leptin in dorsomedial hypothalamus

and satiating actions of cholecystokinin (11). Moreover, the PrRP receptor was detected primarily in anterior pituitary, thalamus, hypothalamus and nucleus tractus solitarius, which are areas associated with the regulation of energy balance (8, 12, 13). After intracerebroventricular (icv.) administration of PrRP, food intake and body weight were both reduced in rats and mice (7, 14). Moreover, mice deficient in either PrRP or PrRP receptor became hyperphagic and obese in adulthood (15, 16).

PrRP belongs to the RF-amide peptide family with the C-terminal sequence Arg-Phe-NH₂ that is necessary for its biological activity (12). PrRP binds specifically not only to the GPR10 receptor but it has also high affinity for the neuropeptide FF2 receptor (NPFF2) (17). The other member of RF-amide peptide family and endogenous ligand of NPFF2 is neuropeptide FF (NPFF), which is also implicated in the negative regulation of food intake (18). In our previous study, we showed binding affinity for PrRP to the rodent tumor pituitary cell lines AtT20, GH3 and RC-4B/C, which endogenously express both PrRP and NPFF2 receptors (19).

Based on our previous studies (19, 20), we designed lipidized analogs with C-terminus modifications and examined the affinity of these analogs *in vitro* in RC-4B/C cells and CHO-K1 cells that overexpress human GPR10 or NPFF2. We also examined *in vivo* activity of the analogs on acute food intake in fasted mice. We hypothesized that lipidization would stabilize

PrRP and enable to accomplish its central anorexigenic effect after peripheral administration. The aim of the study was to identify the most potent lipidized PrRP analogs with a modified C-terminal phenylalanine.

MATERIAL AND METHODS

Peptide synthesis and iodination

Human PrRP31 (SRTHRHSMEIRTPDINPAWYASR-GIRPVGRF-NH₂), rat PrRP31, rat PrRP31 analogs (for structures see *Table 1*) and the stable analog of NPFF, 1DMe (D-YL(N-Me)FQPQRF-NH₂) were synthesized and purified as described previously (21). Lipidization of PrRP analogs was performed as shown in (22) on fully protected peptide on resin as a final step. The purity and identity of all peptides were determined by analytical HPLC and by using a Q-TOF micro MS technique (Waters, Milford, MA, USA).

Rat or human PrRP31 and 1DMe were iodinated at Tyr²⁰ and D-Tyr¹, respectively, with Na¹²⁵I (Izotop, Budapest, Hungary) using IODO-GENTM (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Peptides were purified as described previously (22). The specific activity of all ¹²⁵I-labeled peptides was approximately 2000Ci/mmol. The radiolabeled peptides were kept in aliquots at -20°C and used for binding studies within 1 month.

Cell lines and binding to intact plated cells and cell membranes

The RC-4B/C cell line was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and grown as described previously (23). CHO-K1 cells, with GPR10 containing a beta-lactamase reporter gene under the control of a NFAT response element, were obtained from Life Technologies (GeneBLAzer® GPR10-NFAT-bla CHO-K1 cells, K1732, Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA). Cells were grown in DMEM, pH 7.4, supplemented with 10% dialyzed fetal bovine serum (FBS) from Life Technologies. For growing medium, non-essential amino acids (NEAA), HEPES, L-glutamine, streptomycin/penicillin, and the selective antibiotics geneticin and zeocin were added to DMEM according to manufacturer's instructions. DMEM and L-glutamine were from Biosera (Kansas City, MO, USA) and the remaining reagents were from Life Technologies. All cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% air/5% CO₂. Medium was changed every 2-3 days and cells were subcultured as required.

Saturation and competitive binding experiments were performed according to Motulsky and Neubig (24). RC-4B/C or CHO-K1 cells were grown in polylysine- or polyethylenimine-coated 24-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark). The competitive binding experiments on RC-4B/C cells and CHO-K1 cells with overexpressed GPR10 were performed as described in (20).

Binding assays on membranes of CHO-K1 cells with overexpressed human NPFF2 receptor (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) were performed according to the manufacturer's instructions. A stable analog of NPFF, 1DMe, was used as the standard ligand (25).

Bound radioactivity was determined by γ -counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, MA, USA). The total binding was 2-5% of the radioactivity added. Non-specific binding in competitive binding experiments amounted to less than 15% of the total binding. Experiments were carried out in duplicates at least three times.

Beta-lactamase-dependent FRET assay

CHO-K1 cells overexpressing GPR10 were plated at 40000 cells/well in 128 μ l assay medium (DMEM, containing 10% dialyzed FBS, 0.1mM NEAA, 25mM HEPES, 1% penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamine) in a 96-well plate and were incubated 20 h at 37°C/5% CO₂. The assay was performed according the manufacturer's protocol (GeneBLAzer® GPCR Cell-based assays, K1732, Thermo Fisher Scientific Inc. Brand, Waltham, MA, USA). The fluorescent plate reader Tecan Infinite M1000 (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland) was operated with 405 nm excitation and 460 nm or 530 nm emissions *via* bottom read.

Acute food intake in mice

All animal experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the Act of the Czech Republic Nr. 246/1992 and were approved by the Committee for Experiments with Laboratory Animals of the ASCR.

Male C57BL/6 mice from Charles Rivers Laboratories (Sulzfeld, Germany) used for all experiments, were housed at a temperature of 23°C and a daily cycle of 12 h light and dark (light on at 6:00 a.m.). The mice were given *ad libitum* water and standard chow diet (St-1, Mlýn Kocanda, Jesenice, Czech Republic) and housed until three months of age. On the day of the food intake experiment at 8:00 a.m., overnight (17 h) fasted mice were subcutaneously (SC) injected with 200 μ l of saline or PrRP analogs at doses of 5mg/kg (all dissolved in saline, n = 5 – 6). Fifteen minutes after injection, the mice were given weighed food pellets. The pellets were weighed every 30 min for at least 6 hours. The animals had free access to water during the experiment. The results were expressed in grams of food consumed.

Analysis of binding data and statistics

Data are presented as the means \pm S.E.M. The competitive binding curves were plotted using GraphPad software (San Diego, CA, USA) and compared the best fit for single-binding-site models (IC₅₀ values were obtained from nonlinear regression analysis). Inhibition constants (K_i) were calculated from the IC₅₀ values using the Cheng-Prusoff equation (26). Concentration of the radioligand was 0.1 nM for RC-4B/C cells and cell membranes of CHO-K1 with overexpressed NPFF2 and 0.03 nM for CHO-K1 overexpressing GPR10. The K_d calculated from saturation experiments was 4.21 \pm 0.66nM for RC-4B/C, 1.06 \pm 0.36 nM for CHO-K1 with the GPR10 and 0.72 \pm 0.12 nM for membranes with NPFF2 (20).

The results from the beta-lactamase assay were analyzed by nonlinear regression by log agonist versus response using GraphPad software. EC₅₀ was calculated as the concentration of the peptide that yielded 50% of the maximal effect.

Data from food intake experiments were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test using GraphPad Software; P < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Peptide synthesis and iodination

Structures of PrRP31 and its analogs used in this study are shown in *Table 1*. All peptide sequences were assembled on solid phase support. The purity of peptides was higher than 95%. Lipidized analogs of PrRP31 were prepared by the attachment of

Table 1. Structure of rat PrRP31 and its analogs.

Analog No	Sequence
rat PrRP31	S RAHQHS M ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
Nle-PrRP31	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
myr-PrRP31	(N-myristoyl)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
palm-PrRP31	(N-palmitoyl)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH ₂
1	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR 1-Nal -NH ₂
2	(N-myristoyl)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR 1-Nal -NH ₂
3	(N-palmitoyl)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR 1-Nal -NH ₂
4	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheCl₂ -NH ₂
5	(N-myristoyl)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheCl₂ -NH ₂
6	(N-palmitoyl)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheCl₂ -NH ₂
7	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheNO₂ -NH ₂
8	(N-myristoyl)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheNO₂ -NH ₂
9	(N-palmitoyl)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheNO₂ -NH ₂
10	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheF₅ -NH ₂
11	(N-palmitoyl)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR PheF₅ -NH ₂
12	S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR Tyr -NH ₂
13	(N-palmitoyl)S RAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGRGIRPVGR Tyr -NH ₂

Nle, norleucine; 1-Nal, naphthylalanine; PheCl₂, dichlorophenylalanine; PheNO₂, nitrophenylalanine; PheF₅, pentafluorophenylalanine; Palm, palmitoyl; myr, myristoyl.

Table 2. Biological properties of PrRP31 analogs.

Analog No	¹²⁵ I-rat PrRP31 binding to RC-4B/C	% binding rat PrRP31	¹²⁵ I-human PrRP31 binding to human GPR10	% binding rat PrRP31	¹²⁵ I-1DMe binding to human NPF ₂	% binding rat PrRP31	Activation of <i>bla</i> reporter gene in GPR10 overexpressing cells	Food intake in fasted mice (5 mg/kg sc)
	K _i (nM)		K _i (nM)		K _i (nM)		EC ₅₀ (pM)	% saline-treated group (45 min)
saline								100±9.3
rat PrRP31	2.39±0.11	100	3.91±0.21	100	57.1±15.5	100	359±79	113±10
Nle-PrRP31	1.28±0.20	187	1.87±0.42	209	49.6±3.4	115	NT	NT
myr-PrRP31	0.69±0.09	344	0.69±0.09	570	1.59±0.32	3582	102±12	9.5±6.5
palm-PrRP31	0.51±0.15	470	2.94±0.33	133	0.91±0.31	6251	70±3	13.2±6.2
1	83.3±2.60	3	33.6±15.6	12	24.3±3.82	236	1681±212	NT
2	3.95±1.22	60	1.30±0.21	302	NT	NT	71±21	4.9±2.7
3	0.85±0.15	280	3.82±0.37	102	0.41±0.06	13797	37±16	0.5±0.3
4	3.83±0.94	62	1.73±0.35	226	14.0±3.18	407	238±57	NT
5	0.60±0.22	396	0.92±0.32	425	3.08±0.01	1853	232±34	1.2±0.6
6	1.32±0.29	182	1.02±0.40	383	1.93±0.53	2962	146±16	0.7±0.4
7	19.9±5.96	12.0	4.66±0.85	84	352±0.03	16	940±97	NT
8	0.71±0.12	337	0.53±0.17	735	NT	NT	170±11	4.9±4.3
9	0.58±0.10	409	0.74±0.27	530	11.8±2.94	485	37±0	0.4±0.3
10	12.8±2.22	19	8.36±1.17	47	13.8±0.02	414	472±47	NT
11	0.51±0.08	465	1.86±0.52	210	0.24±0.05	23701	120±18	31.3±13.6
12	3.23±0.15	74	1.97±0.08	199	NT	NT	116±15	NT
13	0.22±0.01	1085	1.53±0.38	256	317±140	18	85±5	20.1±5.7

NT, not tested;

In competitive binding, K_i was calculated using Cheng-Prusoff equation. EC₅₀ is the concentration of peptide at 50% of maximal effect. Food intake was analyzed at 45 min after SC injection of an analog when the maximal effect is observed and is expressed in percentage of saline-treated group consumption. The data represent the means ± S.E.M. of at least three separate experiments.

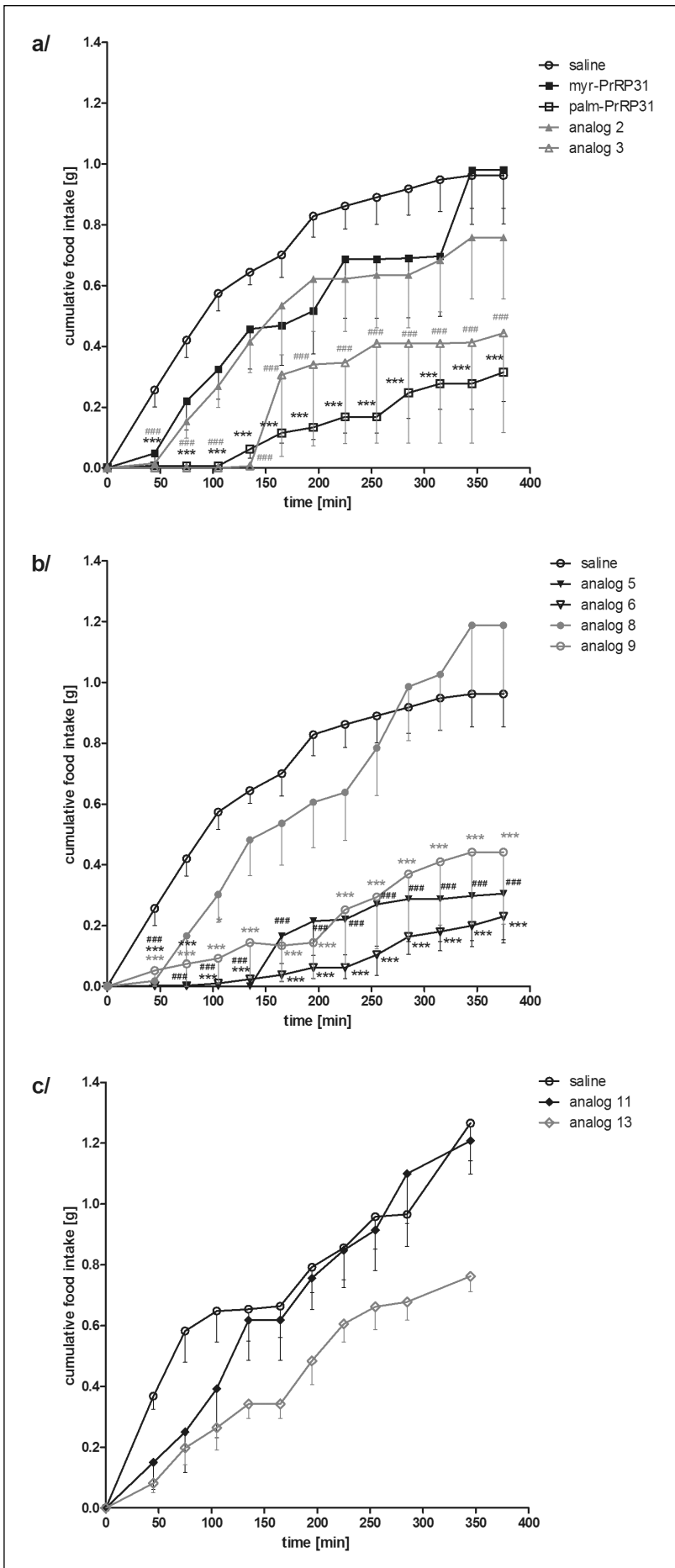


Fig. 1. Food intake of fasted wild type mice after peripheral SC administration of PrRP analogs.

All peptides were administered SC at a dose 5mg/kg. (a) Cumulative food intake of myr-PrRP31, palm-PrRP31, lipidized analog 2 and 3 with 1NaI³¹. (b) Cumulative food intake of lipidized analog 5 and 6 with PheCl₂³¹ and lipidized analog 8 and 9 with PheNO₂³¹. (c) Cumulative food intake of lipidized analog 11 with PheF₅³¹ and analog 13 with Tyr³¹. The curves are representative of the results obtained from three independent experiments. The data are analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. Significance is ***P < 0.001 vs. saline-treated group (n = 5 – 6).

myristic or palmitic acid to the N-terminus. In position 8 the original methionin was replaced with norleucine (Nle) to avoid a possible Met oxidation. This change does not influence the biological activity of prepared peptides (23).

The aromatic ring in Phe³¹ was substituted by naphthylalanine (1Nal³¹) - analogs 1 – 3; dichlorophenylalanine (PheCl₂³¹) - analogs 4 – 6; nitrophenylalanine (PheNO₂³¹) - analogs 7 – 9; pentafluoro-phenylalanine (PheF₅³¹) - analog 10 and 11; or tyrosine (Tyr³¹) - analogs 12 and 13.

Rat PrRP31, human PrRP31 and 1DMe were iodinated at Tyr²⁰ using IODO-GENTM as described previously (19).

Competitive binding and beta-lactamase assay of PrRP analogs

Rat PrRP31, Nle-PrRP31 or lipidized PrRP analogs competed with rat or human ¹²⁵I-PrRP for binding to RC-4B/C or CHO-K1 overexpressing human GPR10 or NPFF2 with a K_i in

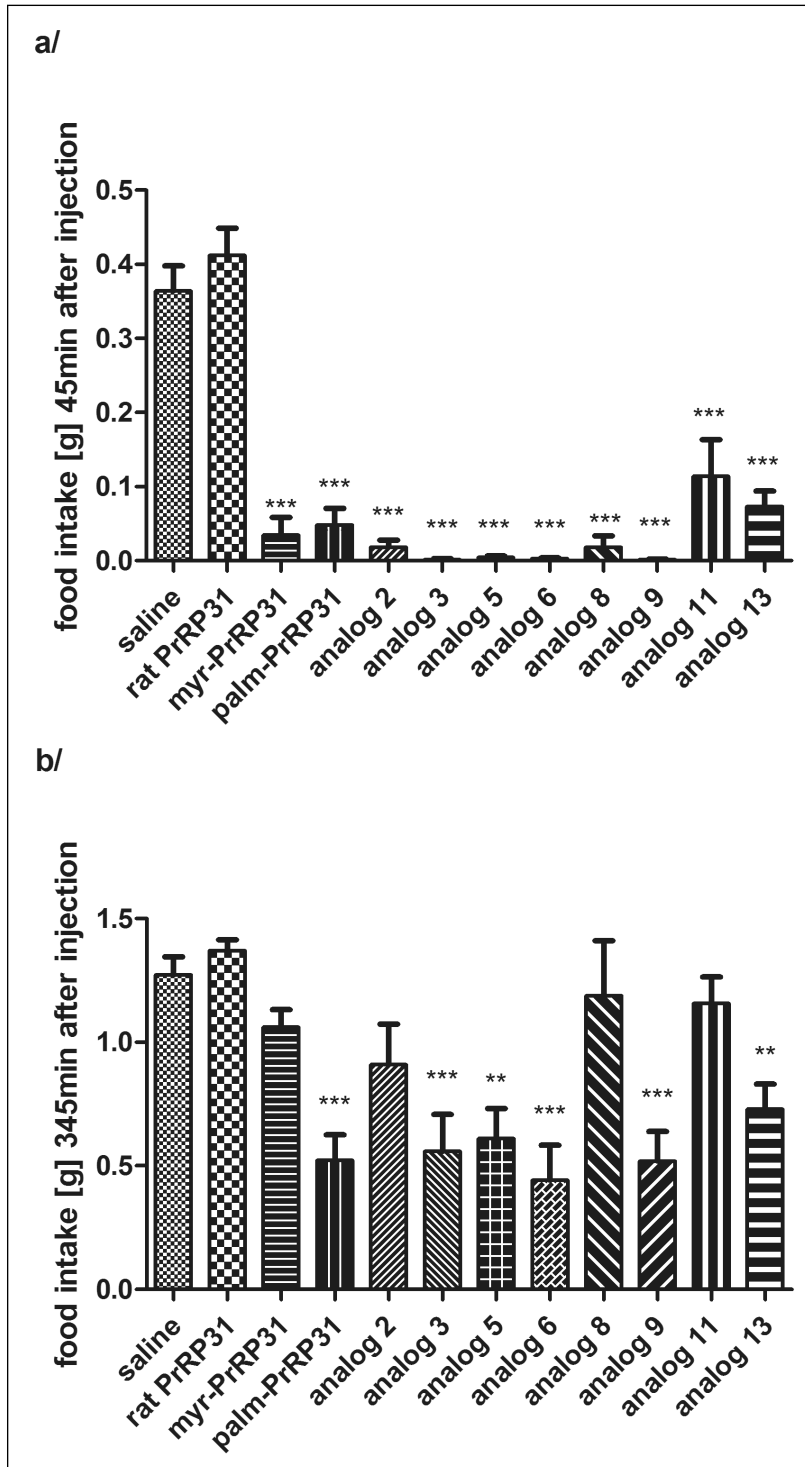


Fig. 2. Food intake in fasted mice (a) at the time of maximal effect (45 min after injection) and (b) at the end of experiment (345 min after injection)

All peptides were administered SC at a dose 5 mg/kg. (a) Food intake monitored 45 min after injection of saline, myr-PrRP31, palm-PrRP31, lipidized analog 2 and 3 with 1Nal³¹, analog 5 and 6 with PheCl₂³¹, analog 8 and 9 with PheNO₂³¹, analog 11 with PheF₅³¹ and analog 13 with Tyr³¹. (b) Food intake 345 min after injection. The results show representative values obtained from three independent experiments. The data are analyzed by one-way ANOVA using Dunnett's Multiple Comparison Test. Significance is **P < 0.01 and ***P < 0.001 vs. saline-treated group (n = 5 – 6).

the nanomolar range as shown in *Table 2*. The K_i value for the stable analog 1DMe from competitive binding assay with ^{125}I -1DMe on membranes of CHO-K1 cells overexpressing human NPFF2 was $1.80 \pm 0.54\text{nM}$. PrRP analogs with fatty acids showed a higher affinity for RC-4B/C cells and a comparable affinity for GPR10 with the natural peptide PrRP31. A similar trend was also observed in the binding of lipidized analogs on cell membranes with the human NPFF2 receptor. Thus, myristoylated and palmitoylated PrRP31 showed very high affinity for both the GPR10 and NPFF2 receptors. This tendency was similar for analog 5 and 6 (containing PheCl_2^{31}) and analog 9 (with PheNO_2^{31}). Interestingly, palmitoylated analog 3 (1Nal^{31}) and analog 11 (PheF_5^{31}) were bound to both GPR10 and NPFF2 with nanomolar K_i s, but the affinity for the human NPFF2 receptor was higher compared to that of natural peptide.

Activation of the beta-lactamase reporter gene on CHO-K1 cells overexpressing GPR10 by PrRP31 or PrRP analogs revealed agonistic characteristics of the PrRP analogs with EC_{50} in sub-nanomolar range (*Table 2*). Similarly, as in the binding assay, we found that the lipidized analogs were more effective than the natural peptide.

Acute food intake

The results of food intake experiments after SC injection in fasted mice are shown in *Table 2* and in *Fig. 1* and *2*. As expected, SC-injected natural PrRP31 did not affect food intake (*Table 2*, *Fig. 2a* and *2b*). However, in accordance with data from the binding assay, myristoylated and palmitoylated PrRP31 analogs significantly decreased food intake. Palm-PrRP31 had stronger and long-term anorexigenic effects compared to myr-PrRP31 (*Fig. 1a*). Analogous effects were observed with analogs 2 and 3 with 1Nal^{31} (*Fig. 1a*) or analogs 8 and 9 with PheNO_2^{31} as shown in *Fig. 1b*. Analog 11 and 13 attenuated food intake but their effects were weaker compared to other lipidized analogs (*Fig. 1c*). Interestingly both analogs 5 and 6 with PheCl_2^{31} substituent showed very strong and long-lasting anorexigenic effects (*Fig. 1b*) similar to palm-PrRP31.

At the time of maximal effect, 45 min after subcutaneous injection, a significant decrease in food intake occurred with all lipidized analogs compared to the saline-treated group as shown in *Fig. 2a*. Natural non-lipidized rat PrRP31 did not influence food intake after subcutaneous injection. Significant and long lasting effects (approximately 6 hours after injection) of palmitoylated analogs are shown in *Fig. 2b*.

DISCUSSION

To overcome the drawback of neuropeptides that are unable to cross the BBB and act centrally after peripheral administration, lipidization of these peptides could be employed. In our recent study we showed that lipidization of PrRP31 or PrRP20 through an amide bond at the N-terminus increased the half-life of the molecule and possibly allowed PrRP to cross the BBB from the periphery similarly as it was proven with analog of naturally lipidized peptide ghrelin in our previous study (27). Peripheral administration of palmitoylated or myristoylated analogs of PrRP resulted in decreased food intake and body weight in mice (20). As proof-of-concept, our analogs modified with longer fatty acids (myristic or palmitic) were active after peripheral administration and increased neuronal activation.

Boyle *et al.* performed an *in vitro* structure-activity study with analogs of PrRP(19-31). The C-terminal segment $\text{Ile}^{25}\text{-Arg}^{26}\text{-Pro}^{27}\text{-Val}^{28}\text{-Gly}^{29}\text{-Arg}^{30}\text{-Phe}^{31}\text{-NH}_2$ is important for biological activity. However, amino acids in this segment could be modified except Arg^{30} , which is necessary for the preservation of PrRP *in*

vitro biological activity (28). Our previous study (19) has shown that analogs of PrRP20 that have the C-terminal Phe^{31} replaced by its derivatives with modified non-coded aromatic amino acids, such as $[\text{PheCl}_2^{31}]\text{PrRP20}$, $[\text{PheF}_5^{31}]\text{PrRP20}$ or $[\text{Tyr}^{31}]\text{PrRP20}$, bound to RC-4B/C with affinities similar to natural PrRP20, which indicates preservation of biological activity and high affinity for the GPR10 receptor. Moreover, the PrRP analogs showed highly significant and long-lasting anorexigenic effects after central (i.v.) administration in fasted mice.

For this study, we have designed analogs of rat PrRP31 instead of PrRP20 with C-terminal Phe^{31} modified by non-coded amino acids with a bulky aromatic side chain (1-Nal, PheCl_2 , PheF_5 or PheNO_2) or with tyrosine, employing similar design as in our previous study (19). Replacement of the C-terminal phenylalanine in position 31 with modified aromatic amino acids can increase their biological activity. All PrRP31 analogs were lipidized by a fatty acid (myristic or palmitic) at the N-terminus of the peptide and conserved the C-terminal amide necessary for preserving PrRP biological activity (28). All analogs have replaced the Met in position 8 with Nle.

For *in vitro* experiments, pituitary cell line RC-4B/C endogenously expressing both GPR10 and NPFF2 and CHO-K1 cells overexpressing human GPR10 or human NPFF2 were employed (20, 23). We found that analogs of rat PrRP31 with 1Nal, PheCl_2 , PheF_5 , PheNO_2 or Tyr in position 31 had high affinity for the GPR10 receptor, i.e., K_i value in 10^{-9}M range, which was comparable to the K_i for natural PrRP31 as determined both by Langmead *et al.* in HEK293 cells transfected with the GPR10 receptor and by Satoh *et al.* in rat hypothalamus or pituitary cell membranes (29, 30). Lipidized PrRP analogs were bound to GPR10 with an even higher affinity than natural PrRP with K_i in the 10^{-10}M range. In competition binding assays with human NPFF2 and ^{125}I -1DMe, the affinity of 1DMe, the stable NPFF analog for the NPFF2 receptor was comparable with the study performed by Engstrom *et al.* (17). In our binding assay both rat and human PrRP showed higher K_i than natural PrRP but was also in the nanomolar range. Interestingly, our lipidized analogs showed higher affinity for the human NPFF2 receptor compared to the natural PrRP31 or 1DMe. The K_i of palmitoylated PrRP31 analogs (analog 3, 6, 9, 11 and 13) in binding experiments with RC-4B/C cells were in 10^{-10}M range, comparable with K_i of lipidized analogs from our previous study (20). Thus, we can hypothesize that lipidized PrRP31 analogs might act through both GPR10 and NPFF2 receptors to perform their central anorexigenic effects. Functional *in vitro* studies using beta-lactamase reporter gene assay confirmed that all lipidized analogs were agonists with lower EC_{50} (i.e. higher activity) than relevant non-lipidized peptides. Therefore, all lipidized PrRP31 analogs with C-terminal modifications were used for the *in vivo* study in mice to test their anorexigenic potency.

PrRP is a proven anorexigenic factor (7). PrRP mRNA was found in brain regions important in the regulation of energy balance (DMN, NTS and VLM) and was decreased at negative energy balance states (breastfeeding, starvation). Numerous studies confirmed that PrRP reduced food intake, increased body temperature and energy expenditure following injection into the third ventricle of rats and mice (7, 10, 23, 31). Ellacott *et al.* found out that after three days of repeated central administration of PrRP to rats, animals became unresponsive to anorectic effect of PrRP (32). However, chronic peripheral administration of palm- $\text{PheCl}_2^{31}\text{PrRP31}$ and palm-PrRP31, but not natural PrRP, to diet induced obese mice led to preserved anorexigenic effect and decreased body weight even after 2-week-long repeated administration (data not shown). As we described in Maletinska *et al.* (20) palm-PrRP31 and other lipidized analogs didn't cause any side effects such as sedation (open field test), analgesia (hot plate test) or anxiety (elevated plus maze). The behavioral tests

were performed at the time and the doses of the maximal anorexigenic effect of the substances studied (20), similarly as it was done at behavioral satiety sequence test elsewhere (33). We can than presume that our substances induced physiological satiety. For future studies it's necessary to test the most potent PrRP analogs in GPR10^{-/-} mice in order to determine participation of GPR10 in the biological effects of lipidized PrRP analogs.

Similarly to this what was found for liraglutide (34), we expected that the attached fatty acid could enable PrRP to cross the BBB and accomplish its anorexigenic effect in the brain. In this study, analogs with the highest anorexigenic activity, N-palmitoylated analogs with PheCl₂ or PheNO₂ in position 31, reduced food intake significantly, up to 6 hours after injection. However, myristoylation of these analogs did not result in a significant decrease in food intake in fasted mice. Out of all lipidized PrRP31 analogs, only the myristoylated analog 5 and palmitoylated analog 6 with PheCl₂³¹ showed the highest and longest-lasting reduction of food intake. These two analogs were the most potent analogs in our structure-activity study.

In our study lipidized PrRP31 analogs with modifications of the C-terminal amino acid showed high affinities for the GPR10 and NPF2 receptors *in vitro* and prolonged anorexigenic effects in fasted mice. PheCl₂³¹PrRP31 palmitoylated or myristoylated at N-terminus, showed strong long-lasting anorexigenic effect in fasted mice most probably owing a higher stabilization without a negative effect on their biological effect. It makes them promising candidates for study of food intake disorders and potentially for anti-obesity treatment.

Acknowledgements: This work was supported in part by RVO: 61388963 and research grant GACR 15-08679S. The authors would like to thank T. Elbert for radioiodination of peptides and H. Vysusilova for her excellent technical assistance.

Conflict of interests: None declared.

REFERENCES

1. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894:i-xii, 1-253.
2. Tsigos C, Hainer V, Basdevant A, *et al.* Management of obesity in adults: European clinical practice guidelines. *Obes Facts* 2008; 1: 106-16.
3. Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 153-160.
4. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, *et al.* A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 1998; 393: 272-176.
5. Marchese A, Heiber M, Nguyen T, *et al.* Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* 1995; 29: 335-44.
6. Samson WK, Resch ZT, Murphy TC. A novel action of the newly described prolactin-releasing peptides: cardiovascular regulation. *Brain Res* 2000; 858: 19-25.
7. Lawrence CB, Celsi F, Brennand J, Luckman SM. Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat Neurosci* 2000; 3: 645-646.
8. Fujii R, Fukusumi S, Hosoya M, *et al.* Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor. *Regul Pept* 1999; 83: 1-10.
9. Ibata Y, Iijima N, Kataoka Y, *et al.* Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain. *Neurosci Res* 2000; 38: 223-230.
10. Ellacott KL, Lawrence CB, Rothwell NJ, Luckman SM. PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight. *Endocrinology* 2002; 143: 368-374.
11. Dodd GT, Worth AA, Nunn N, *et al.* The thermogenic effect of leptin is dependent on a distinct population of prolactin-releasing peptide neurons in the dorsomedial hypothalamus. *Cell Metab* 2014; 20: 639-649.
12. Roland BL, Sutton SW, Wilson SJ, *et al.* Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology* 1999; 140: 5736-5745.
13. Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, *et al.* Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain. *Endocrinology* 1999; 140: 2326-2333.
14. Lawrence CB, Ellacott KL, Luckman SM. PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology* 2002; 143: 360-367.
15. Gu W, Geddes BJ, Zhang C, Foley KP, Stricker-Krongrad A. The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice. *J Mol Neurosci* 2004; 22: 93-103.
16. Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, *et al.* Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents. *J Clin Invest* 2008; 118: 4014-4024.
17. Engstrom M, Brandt A, Wurster S, Savola JM, Panula P. Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 825-832.
18. Murase T, Arima H, Kondo K, Oiso Y. Neuropeptide FF reduces food intake in rats. *Peptides* 1996; 17: 353-354.
19. Maletinska L, Spolcova A, Maixnerova J, Blechova M, Zelezna B. Biological properties of prolactin-releasing peptide analogs with a modified aromatic ring of a C-terminal phenylalanine amide. *Peptides* 2011; 32:1887-1892.
20. Maletinska L, Nagelova V, Ticha A, *et al.* Novel lipidized analogs of prolactin-releasing peptide have prolonged half-lives and exert anti-obesity effects after peripheral administration. *Int J Obes (Lond)* 2015; 39: 986-993.
21. Blechova M, Nagelova V, Zakova L, Demianova Z, Zelezna B, Maletinska L. New analogs of the CART peptide with anorexigenic potency: the importance of individual disulfide bridges. *Peptides* 2013; 39: 138-144.
22. Maletinska L, Pychova M, Holubova M, *et al.* Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 340: 781-786.
23. Maixnerova J, Spolcova A, Pychova M, *et al.* Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor. *Peptides* 2011; 32: 811-817.
24. Motulsky H, Neubig R. Analyzing radioligand binding data. *Curr Protoc Neurosci* 2002; Chapter 7: Unit 7.5.
25. Maletinska L, Ticha A, Nagelova V, *et al.* Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPF2 receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration. *Brain Res* 2013; 1498: 33-40.
26. Chang C, Cheng Y. Ribonucleotide reductase isolated from human cells. Heterogeneity among the sources. *Biochem Pharmacol* 1978; 27: 2297-2300.
27. Pirnik Z, Majercikova Z, Holubova M, *et al.* Effect of ghrelin receptor agonist and antagonist on the activity of arcuate nucleus tyrosine hydroxylase containing neurons in

- C57BL/6 male mice exposed to normal or high fat diet. *J Physiol Pharmacol* 2014; 65: 477-486.
28. Boyle RG, Downham R, Ganguly T, Humphries J, Smith J, Travers S. Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide. *J Pept Sci* 2005; 11: 161-165.
29. Satoh F, Smith DM, Gardiner JV, *et al.* Characterization and distribution of prolactin releasing peptide (PrRP) binding sites in the rat - evidence for a novel binding site subtype in cardiac and skeletal muscle. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1787-1793.
30. Langmead CJ, Szekeres PG, Chambers JK, *et al.* Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 683-638.
31. Lawrence CB, Liu YL, Stock MJ, Luckman SM. Anorectic actions of prolactin-releasing peptide are mediated by corticotropin-releasing hormone receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R101-R107.
32. Ellacott KL, Lawrence CB, Pritchard LE, Luckman SM. Repeated administration of the anorectic factor prolactin-releasing peptide leads to tolerance to its effects on energy homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285: R1005-R1010.
33. Teuffel P, Wang L, Prinz P, *et al.* Treatment with the ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) inhibitor GO-CoA-Tat reduces food intake by reducing meal frequency in rats. *J Physiol Pharmacol* 2015; 66: 493-503.
34. Secher A, Jelsing J, Baquero AF, *et al.* The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. *J Clin Invest* 2014; 124: 4473-4488.

Received: November 4, 2015

Accepted: January 29, 2016

Author's address: Lenka Maletinska, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Flemingovo nam 2, 16610 Prague 6, Czech Republic.

E-mail: maletin@uochb.cas.cz

ORIGINAL ARTICLE

Novel lipidized analogs of prolactin-releasing peptide have prolonged half-lives and exert anti-obesity effects after peripheral administration

L Maletínská¹, V Nagelová¹, A Tichá¹, J Zemenová^{1,2}, Z Pirník^{1,3,4}, M Holubová¹, A Špolcová¹, B Mikulášková^{1,5}, M Blechová¹, D Sýkora², Z Lacinová⁶, M Haluzík⁶, B Železná¹ and J Kuneš^{1,5}

OBJECTIVES: Obesity is a frequent metabolic disorder but an effective therapy is still scarce. Anorexigenic neuropeptides produced and acting in the brain have the potential to decrease food intake and ameliorate obesity but are ineffective after peripheral application. We have designed lipidized analogs of prolactin-releasing peptide (PrRP), which is involved in energy balance regulation as demonstrated by obesity phenotypes of both PrRP- and PrRP-receptor-knockout mice.

RESULTS: Lipidized PrRP analogs showed binding affinity and signaling in PrRP receptor-expressing cells similar to natural PrRP. Moreover, these analogs showed high binding affinity also to anorexigenic neuropeptide FF-2 receptor. Peripheral administration of myristoylated and palmitoylated PrRP analogs to fasted mice induced strong and long-lasting anorexigenic effects and neuronal activation in the brain areas involved in food intake regulation. Two-week-long subcutaneous administration of palmitoylated PrRP31 and myristoylated PrRP20 lowered food intake, body weight and improved metabolic parameters, and attenuated lipogenesis in mice with diet-induced obesity.

CONCLUSIONS: Our data suggest that the lipidization of PrRP enhances stability and mediates its effect in central nervous system. Strong anorexigenic and body-weight-reducing effects make lipidized PrRP an attractive candidate for anti-obesity treatment.

International Journal of Obesity advance online publication, 14 April 2015; doi:10.1038/ijo.2015.28

INTRODUCTION

Prolactin-releasing peptide (PrRP) was originally discovered as an endogenous ligand of an orphan G-protein-coupled receptor.¹ PrRP and its receptor named GPR10 were detected in several hypothalamic nuclei,² suggesting an involvement of PrRP in the control of food intake and body weight.³ PrRP was also found to have high affinity to the neuropeptide FF-2 (NPFF2) receptor, resulting in anorexigenic effect.⁴ The endogenous ligand of NPFF2 receptor, NPFF, also has hyperalgesic and anti-morphine analgesic properties (for reviews, see^{5,6}).

The suggestion that PrRP may act as a homeostatic regulator of food intake was supported by the finding that PrRP messenger RNA (mRNA) expression was reduced in situations of negative energy balance similarly to other anorexigenic peptides such as α -melanocyte stimulating hormone or cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide.³ The intracerebroventricular administration of PrRP inhibited food intake and body weight gain in rats but did not cause conditioned taste aversion.⁷ Furthermore, Fos immunoreactivity was enhanced after PrRP administration in the brain areas associated with food intake regulation.⁷

Finally, PrRP-receptor-knockout mice had significantly higher body weight at 15 weeks of age compared with wild-type mice, and this late-onset obesity was much more pronounced in female mice, which also exhibited a significant decrease in energy

expenditure.⁸ Similarly, PrRP-deficient mice displayed late-onset obesity, increased food intake and attenuated responses to the anorexigenic signals cholecystokinin and leptin.⁹

Taken together, these findings suggest that PrRP and other anorexigenic neuropeptides involved in food intake regulation^{10,11} may have a potential in the development of future anti-obesity agents. Nevertheless, because these peptides normally regulate food intake directly in the hypothalamus, their anorexigenic potential after peripheral administration is hampered by their inability to cross the blood-brain barrier (BBB) and to reach the target brain receptors.

For the design of peptide drugs, the lipidization of peptides, that is, the attachment of fatty-acid chain to peptides through ester or amide bond is advantageous. Such modification results in an increased stability and half-life of the peptide, and it is possible that these modifications allow peptide to cross the BBB after a peripheral administration (reviewed by^{12–14}). Myristoylation or palmitoylation through an amide bond on a Lys has been employed in the insulin analog detemir¹⁵ or glucagon-like peptide 1 analog liraglutide.¹⁶ Both of these peripherally acting lipopeptide drugs show strongly prolonged half-lives and slower biodegradation. Central effects of detemir and liraglutide have been described suggesting that the attachment of fatty acid may also enable these peptides to cross the BBB.¹⁷

PrRP seems to be a suitable candidate for lipidization because of its linear, one-chain peptide structure. Two biologically active

¹Antiobesity Peptides, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Prague, Czech Republic; ²Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic; ³Laboratory of Functional Neuromorphology, Institute of Experimental Endocrinology, SAS, Bratislava, Slovak Republic; ⁴Department of Human and Clinical Pharmacology, University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic; ⁵Institute of Physiology, AS CR, Prague, Czech Republic and ⁶Third Department of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic. Correspondence: Dr L Maletínská, Antiobesity Peptides, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, AS CR, Flemingovo nám. 2, Prague 6 166 10, Czech Republic.

E-mail: maletin@uochb.cas.cz

Received 29 August 2014; revised 10 February 2015; accepted 19 February 2015; accepted article preview online 16 March 2015

isoforms of PrRP, with either 31 (PrRP31) or 20 (PrRP20) amino acids contain a C-terminal Arg-Phe-amide sequence that is critical for the preservation of biological activity of PrRP.^{18–20}

The aim of this study was to achieve the direct central anorexigenic activity of PrRP via its peripheral route of administration employing the lipidization of its N terminus. We tested a series of PrRP analogs modified with fatty acids of various lengths both *in vitro* and *in vivo*. The data showed that myristoylated PrRP20 and palmitoylated PrRP31 retained the biological activity of PrRP while significantly decreasing food intake and body weight and improving metabolic parameters upon peripheral administration in mice with diet-induced obesity. Thus, the lipidization of neuropeptides involved in food intake regulation might serve as a tool to retain their ability to act centrally after peripheral administration.

MATERIALS AND METHODS

Peptide synthesis and iodination

Rat PrRP analogs (for structure see Table 1), human PrRP31 (SRTHRHSMIEIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH₂), scrambled peptides (SHQRPADTHWYPRGNIeFPTIGRITARNGEVSR-NH₂ and (N-myr)SHQRPADTHWYPRGNIeFPTIGRITARNGEVSR-NH₂) and a stable analog of NPF2, 1DMe (D-YL(N-Me)FQPQRF-NH₂) were synthesized and purified as described previously.²¹ Lipidization of PrRP analogs was performed as shown in²² on fully protected peptide on resin as a last step. The purity and identity of all peptides were determined by analytical high-performance liquid chromatography and by using a Q-TOF micro MS technique (Waters, Milford, MA, USA).

Rat or human PrRP31 and 1DMe were iodinated at Tyr²⁰ and D-Tyr¹, respectively, with Na¹²⁵I (Izotop, Budapest, Hungary) as described previously.²²

Binding to intact plated cells and cell membranes

Rat pituitary RC-4B/C cells obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) were grown as described previously²⁴ and Chinese hamster ovarian (CHO)-K1 cells with GPR10 receptor (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) according to manufacturer's instructions. Saturation and competitive binding experiments were performed according to Motulsky and Neubig.²⁵ RC-4B/C or CHO-K1 cells were incubated with 0.5–5 nM ¹²⁵I-rPrRP31 or ¹²⁵I-hPrRP31, respectively, in saturation experiments or with 0.1 nM ¹²⁵I-rPrRP31 or with 0.03 nM ¹²⁵I-hPrRP31, respectively, and 10⁻¹¹–10⁻⁵ M non-radioactive ligands in competitive binding experiments. Experiments were performed on plates incubated for 60 min at 25 °C. Non-specific binding was determined using 10⁻⁵ M PrRP31. Binding assays on human NPF2 receptor membranes obtained from Perkin Elmer were performed as described in.²⁴

Detection of MAPK/ERK1/2 phosphorylation by western blotting
CHO-K1 cells were incubated with PrRP31, PrRP20, palm-PrRP31 or myr-PrRP20 with final concentrations from 10⁻⁷–10⁻¹² M for 5 min at 37 °C. The cells were lysed and western blots carried out as described in.²⁶

Stability of PrRP analogs *in vitro*

Rat plasma fortified with a solution of the studied compound at a concentration of 3 × 10⁻⁶ M was incubated at 37 °C. The times of sampling were 0–24 h for PrRP31 and PrRP20 and 0–96 h for palm-PrRP31 and myr-PrRP20. Samples were collected in triplicates and stored at –20 °C. The PrRP(1–31) EIA high-sensitivity kit (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA) was used according to the manufacturer's instructions.

Pharmacokinetics *in vivo* in mice

All animal experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the Act of the Czech Republic Nr. 246/1992 and were approved by the Committee for Experiments with Laboratory Animals of the ASCR.

The measurement of *in vivo* pharmacokinetics was performed as previously described.²³ C57BL/6 male mice were injected subcutaneously (SC) with PrRP31, PrRP20, palm-PrRP31 or myr-PrRP20 (dissolved in saline; Sal) at a dose of 5 mg kg⁻¹ (n=3), blood plasma collected and peptides determined by PrRP(1–31) EIA high-sensitivity kit.

Acute food intake in lean mice

Male C57BL/6 mice from Charles Rivers Laboratories (Sulzfeld, Germany) were housed at a temperature of 23 °C and a daily cycle of 12 h light and dark (lights on at 6:00). The mice were given *ad libitum* water and standard chow diet (St-1, Mlýn Kocanda, Jesenice, Czech Republic). Following schedules were used for food intake monitoring after single administration of peptides: (a) on the day of the food intake experiment, overnight (17 h) fasted mice were injected SC with Sal or PrRP analogs at doses of 0.1–5 mg kg⁻¹ (all dissolved in Sal) (n=6–8). Fifteen minutes after injection, the mice were given weighed food pellets. The pellets were weighed every 30 min for at least 6 h. (b) Freely fed mice were injected SC with Sal or PrRP analogs at a dose of 5 mg kg⁻¹ (all dissolved in Sal) (n=6) 30 min before lights out. Food intake was monitored every 10 min for at least 14 h using automatic food intake monitoring system (Development Workshops of IOCB, Prague, Czech Republic).

Fos immunohistochemistry

For c-Fos immunohistochemical processing, overnight-fasted male mice with the free access to water (n=4) were SC injected with Sal or PrRP31, oct-PrRP31, myr-PrRP20 or palm-PrRP31 at a dose of 5 mg kg⁻¹. Ninety minutes after injection, the mice were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg kg⁻¹, intraperitoneally) and perfused transcardially, the brains were treated and c-Fos immunoreactivity determined as described in.^{27,28}

Table 1. Structures and binding affinities of PrRP analogs

Analog	Sequence	Human GPR10, ¹²⁵ I-human PrRP31 binding K _i (nM)	Human NPF2, ¹²⁵ I-1DMe binding K _i (nM)	RC-4B/C cells, ¹²⁵ I-rat PrRP31 binding K _i (nM)
PrRP31	SRAHQHSMETRTPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	3.91 ± 0.21	42.21 ± 6.76	2.38 ± 0.11
oct-PrRP31	(N-oct)SRAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	1.49 ± 0.07	24.82 ± 13.2	0.98 ± 0.22
dec-PrRP31	(N-dec)SRAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	1.42 ± 0.55	14.73 ± 3.10	0.68 ± 0.12
dodec-PrRP31	(N-dodec)SRAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	1.15 ± 0.35	14.28 ± 6.40	0.38 ± 0.14
myr-PrRP31	(N-myr)SRAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	0.69 ± 0.09	1.59 ± 0.32	0.69 ± 0.09
palm-PrRP31	(N-palm)SRAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	2.94 ± 0.33	0.69 ± 0.36	0.51 ± 0.15
stear-PrRP31	(N-stear)SRAHQHS Nle ETRTPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	5.24 ± 0.57	15.92 ± 14.43	0.93 ± 0.08
PrRP20	TPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	4.4 ± 0.77	21.80 ± 9.91	2.23 ± 0.19
oct-PrRP20	(N-oct)TPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	1.88 ± 0.31	48.13 ± 13.19	0.91 ± 0.23
dec-PrRP20	(N-dec)TPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	2.94 ± 0.47	3.60 ± 2.57	0.41 ± 0.01
dodec-PrRP20	(N-dodec)TPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	2.34 ± 0.25	9.97 ± 3.48	0.58 ± 0.22
myr-PrRP20	(N-myr)TPDINPAWYTGIRPVGRF-NH ₂	4.21 ± 0.24	8.23 ± 1.97	1.02 ± 0.20

Abbreviations: dec, decanoyl; dodec, dodecanoyl; myr, myristoyl; Nle, norleucine; oct, octanoyl; palm, palmitoyl; stear, stearoyl. The means ± s.e.m. of at least three separate experiments are shown. In competitive binding, K_i was calculated using the Cheng–Prusoff equation. The concentration of the radioligand was 0.1 nM or 0.03 nM, and the K_d that was calculated from saturation experiments was 4.21 ± 0.66 nM for RC-4B/C²³ or 0.95 ± 0.20 nM for GPR10 receptor in CHO cells, respectively. K_d for NPF2 receptor in CHO cells was 0.72 ± 0.12 nM.

Behavioral tests in mice

Locomotor activity and analgesia were measured in free-fed mice using the VideoMot system (TSE Systems, Bad Homburg, Germany) after the SC injection of Sal, PrRP31, oct-PrRP31, palm-PrRP31 and myr-PrRP20 at a dose of 5 mg kg⁻¹ (*n* = 5) as described previously.^{28,29}

The elevated plus maze (TSE Systems) test was used to measure anxiety/fear behavior. The total time spent in open and closed arms was measured.

Determination of prolactin release in rats and mice

Male Wistar rats (250–300 g, Harlan Laboratories, Correzzana, Italy, *n* = 3) were injected intravenously into the jugular vein with Sal, thyrotropin-releasing hormone (10 µg kg⁻¹) or palm-PrRP31 (0.5 mg kg⁻¹), or SC with Sal or palm-PrRP31 (5 mg kg⁻¹). Blood was collected from carotid artery before injections and 5 and 10 min after injections. Male C57BL/6 mice were injected SC with Sal, myr-PrRP20 or palm-PrRP31 (5 mg kg⁻¹). Blood was collected by decapitation 10 min after injection. Prolactin (PRL) in rat or mouse serum was determined with a radioimmunoassay assay kit (Izotop).

Effect of 14-day administration of palm-PrRP31 and myr-PrRP20 on food intake and metabolic parameters in mice with high-fat diet-induced obesity

From 8 weeks of age, C57BL/6 mice were supplied with a high-fat (HF) diet for 12 weeks to induce obesity. The energy content of the HF diet was 5.3 kcal g⁻¹, with 13%, 60% and 27% of the calories derived from protein, fat and carbohydrate, respectively.³⁰ Food intake and body weight were monitored weekly from 9 to 18 weeks of age. Mice resistant to the HF diet were withdrawn from the experiment (~10% of mice).

At the age of 19 weeks, the mice were divided into groups of 10 animals and placed into the separate cages with free access to HF diet and water. Three groups were injected SC either with Sal or with palm-PrRP31 or myr-PrRP20 at a dose of 5 mg kg⁻¹ twice a day. The fourth group served as pair-fed controls to the animals treated with palm-PrRP31, and was given food amount consumed by palm-PrRP31 treated mice the previous day. The amount of the HF diet consumed and the weight of the mice were monitored daily.

At the end of the experiment, overnight-fasted mice were killed by decapitation starting at 8:00 a.m. The trunk blood was collected, and the plasma was separated and stored at -20 °C. The intraperitoneal adipose tissue (IPAT), subcutaneous adipose tissue (SCAT), the perirenal adipose tissue, the brown adipose tissue and the liver of all mice were dissected, weighed and stored at -70 °C.

Determination of hormonal and biochemical parameters

The plasma insulin concentrations were measured with radioimmunoassay assays (Linco Research, St Charles, MI, USA), leptin concentrations were determined with enzyme-linked immuno assay (Millipore, St Charles, MI, USA), corticosterone levels were determined with radioimmunoassay assay kit (Izotop) and adrenocorticotropic hormone with enzyme-linked immuno assay (Peninsula Laboratories). The plasma glucose levels were measured using a Glucocard glucometer (Arkray, Kyoto, Japan). The plasma triglyceride levels were measured by quantitative enzymatic reactions (Sigma, St Louis, MO, USA).

Determination of mRNA expression

Samples of adipose tissue (IPAT, SCAT) and liver were processed as described in.³¹ Determination of the mRNA expression of genes of interest (ACACA and FASN in liver, IPAT and SCAT; lipoprotein lipase, adiponectin and leptin in IPAT and SCAT, FABP-4 in liver, UCP-1 in brown adipose tissue) was performed using an ABI PRISM 7500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The expression of beta-2-microglobulin was used to compensate for variations in input RNA amounts and the efficiency of reverse transcription. (ACACA—acetyl-CoA carboxylase 1, FASN—fatty-acid synthase, LPL—lipoprotein lipase, SREBP—sterol regulatory element-binding protein, FABP-4—fatty-acid binding protein 4, UCP-1—uncoupling protein-1).

Analysis of binding data and statistics

The saturation binding curves were plotted using GraphPad software (San Diego, CA, USA) comparing the best fit for single binding site models (*K_d*, *B_{max}* and *IC₅₀* values were obtained from nonlinear regression analysis).

Inhibition constants (*K_i*) were calculated from the *IC₅₀* values using the Cheng–Prusoff equation.³²

The data are presented as the means ± s.e.m. for the number of animals indicated in the figures and tables. The data were analyzed using one-way analysis of variance followed by the Dunnett's *post hoc* test or a *t*-test, as stated in the figure and table legends, using the GraphPad Software.

RESULTS

Lipidized analogs of PrRP20 and PrRP31 are agonists of the PrRP receptor GPR10 and have high affinity to both GPR10 and NPFF2 receptors

The peptide sequences were assembled on a solid support as described in the Materials and Methods. The purity of all peptides was higher than 95%. The structures of the PrRP analogs used in this study are shown in Table 1. PrRP20 and PrRP31 were lipidized at the N terminus with fatty acids of different lengths. Lipidized PrRP31 analogs were modified with norleucine in position 8 to avoid oxidation of the original methionine. Analogously to a similar modification of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide,³³ the change of methionine for norleucine did not affect the biological activity of PrRP31.

All native and lipidized analogs of PrRP31 and PrRP20 competed with human ¹²⁵I-PrRP31 for binding to CHO cells overexpressing the human PrRP receptor GPR10 with *K_i* values in a nanomolar range, as shown in Table 1. Scrambled peptide based on PrRP20 and its myristoylated analog (structures in the Methods) were bound to GPR10 receptor with a negligible affinity, with *K_i* values higher than 10⁻⁵ M.

Natural PrRP31 and PrRP20, as well as their lipidized analogs palmitoylated PrRP31 (palm-PrRP31) and myristoylated PrRP20 (myr-PrRP20), respectively, increased the phosphorylation of MAPK/ERK1/2 in CHO cells overexpressing GPR10 receptor with an *EC₅₀* values in the nanomolar range (*EC₅₀* was 1.01 nM for PrRP31, 5.62 nM for PrRP20, 0.93 nM for palm-PrRP31 and 1.48 nM for myr-PrRP20), which confirmed the powerful agonist effects of palm-PrRP31 and myr-PrRP20 on the GPR10 receptor. The dose-response curves are shown in Supplementary Figure S1.

Lipidized PrRP analogs were bound to CHO cells overexpressing NPFF2 receptor with *K_i* values of 10⁻⁸ M range or lower, similar to native PrRP20 and PrRP31 in competition binding with a stable NPFF analog ¹²⁵I-1DMe (Table 1). Myristoylated and palmitoylated PrRP analogs displaced ¹²⁵I-1DMe with affinity equal to or higher than 1DMe (*K_i* = 2.21 ± 0.70).

In the rat tumor pituitary cell line RC-4B/C expressing endogenously both GPR10 and NPFF2, lipidized PrRP analogs were bound with a very high affinity to these cells that increased with the length of the carbon chain of a fatty acid (Table 1).

Palm- and stear-PrRP31 and myr-PrRP20 attenuate food intake after acute peripheral administration in fasted lean mice and activate neurons in the food intake-regulating areas in the brain. Food intake was unaffected in Sal-treated controls and native PrRP31 and native PrRP20 administered SC in mice, both fasted and freely fed (Figure 1). In contrast, anorexigenic effects of several peripherally administered lipidized analogs of PrRP31 and PrRP20 were proven in fasted mice (Figure 1a and b) and freely fed mice (Figure 1c). After the acute SC administration of myr-PrRP20 and palm- and stear-PrRP31 (dose of 5 mg kg⁻¹), food intake was very significantly lowered for several hours. The effects of myr-PrRP20 and palm-PrRP31 were dose-dependent, with a dose as low as 1 mg kg⁻¹ of each peptide significantly lowering food intake (Supplementary Figure S2). Scrambled myristoylated PrRP20 had no effect on food intake in mice after peripheral administration (Figure 1a). Interestingly, PrRP31 lipopeptides with myristoyl and fatty acids of shorter carbon chains and PrRP20 lipopeptides with dodecanoyl fatty acid and fatty

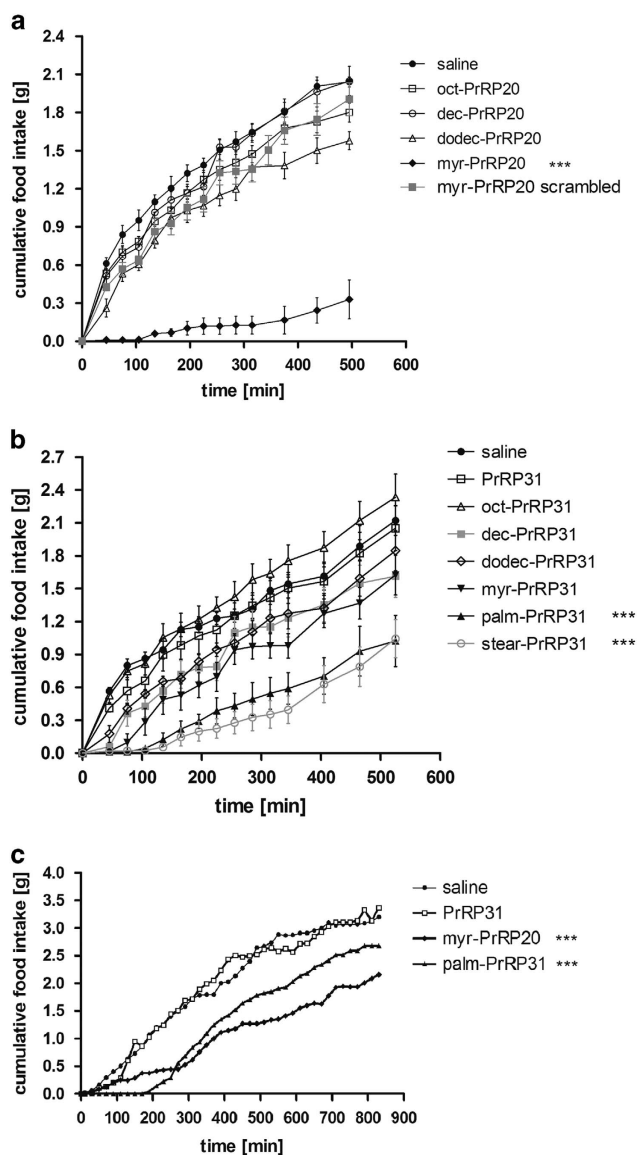


Figure 1. Palmitoylated and stearylated PrRP31 and myristoylated PrRP20 attenuate food intake after acute peripheral administration in fasted mice. Cumulative food intake of 17 h fasted mice after acute SC administration of (a) lipidized PrRP20 analogs, (b) natural and lipidized PrRP31 analogs at a dose of 5 mg kg^{-1} , (c) cumulative food intake of freely fed mice after acute SC administration of saline, PrRP31, myr-PrRP20 and palm-PrRP31 (dose 5 mg kg^{-1}). Food intake is expressed in grams of food consumed ($n = 6\text{--}8$ mice per group). $***p < 0.001$ vs saline-treated group. The significance concerns the whole time course.

acids of shorter carbon chains did not significantly affect food intake (Figure 1a and b). Although myr-PrRP20 showed a stronger anorexigenic potency at a dose of 5 mg kg^{-1} SC in fasted mice compared with palm-PrRP31 (Figures 1a and b), anorexigenic effect of both analogs was comparable in freely fed mice (Figure 1c) and moreover, palm-PrRP31 lowered food intake more significantly than myr-PrRP20 at a dose of 1 mg kg^{-1} (Supplementary Figure 2). It might be explained by higher lipophilicity and lower solubility of myr-PrRP20 compared with palm-PrRP31.

The central effect of peripherally administered palm-PrRP31 as well as myr-PrRP20 was confirmed by a significant increase in c-Fos immunoreactivity in the hypothalamic and brainstem nuclei

involved in food intake regulation (Figure 2). Natural and octanoylated PrRP31 administered peripherally did not influence food intake and did not increase c-Fos immunoreactivity.

Lipidized analogs of PrRP are selective and stable anorexigenic compounds

Several behavioral tests in mice were carried out to evaluate possible side effects of selected PrRP analogs after their peripheral administration. Two analogs that did not affect food intake after SC administration, PrRP31 and oct-PrRP31, and two analogs that did significantly decrease food intake, myr-PrRP20 and palm-PrRP31, were SC administered into mice at a dose of 5 mg kg^{-1} to test their sedative effect (in the open field test), analgesic activity (in the hot plate test) and anxiety (in the elevated plus maze). Neither non-lipidized nor lipidized PrRP analogs influenced open field locomotory activity, nor did they exhibit any analgesic or hyperalgesic activity, nor were any anxiogenic effects in the elevated plus maze observed (Supplementary Figure S3).

After intravenously or SC administration, Palm-PrRP31 did not increase PRL release in rats compared with intravenously administered thyrotropin (Supplementary Figure S4a). Similarly, myr-PrRP20 and palm-PrRP31 did not significantly affect PRL release in mice after SC administration (Supplementary Figure S4b).

The degradation of selected PrRP analogs was tested in rat plasma *in vitro*. The stabilities of palm-PrRP31 and myr-PrRP20 were prolonged ($> 24 \text{ h}$) compared with native PrRP20 or PrRP31 (half-lives $\sim 10\text{--}20 \text{ min}$) (Figure 3a), possibly by promoting the association of these peptides with circulating plasma proteins through the attached fatty-acid moieties.

To further validate the pharmacokinetic profiles of selected analogs *in vivo*, plasma concentrations of PrRP31, PrRP20, palm-PrRP31 and myr-PrRP20 were determined after a single SC injection into mice (Figure 3b). Lipidized PrRP analogs showed longer stability and increased AUC compared with natural PrRP31 and PrRP20.

Chronic 14-days administration of palm-PrRP31 and myr-PrRP20 decreased food intake and body weight in DIO mice, improved metabolic parameters and positively affected lipid metabolism. Rodents with diet-induced obesity are considered models of the most common human obesity, which is associated with the consumption of HF food. The therapeutic potential of two selected lipidized PrRP analogs that were the most potent in the acute food intake test was assessed in diet-induced obese mice that were peripherally administered these peptides for 14-days twice per day. Figure 4 shows that the food intake and body weight in diet-induced obesity (DIO) mice were significantly lowered, mainly by the effect of palm-PrRP31. After the treatment, palm-PrRP31-treated mice weighed $\sim 15\%$ less and myr-PrRP20-treated mice $\sim 10\%$ less than Sal-treated controls. No signs of inflammation were observed during the treatment.

As shown in Table 2, palm-PrRP31 treatment significantly lowered insulin and leptin levels in blood, and decreased SCAT and perirenal fat masses. The group of mice pair-fed to palm-PrRP31 showed similar metabolic changes, suggesting that the primary effect of palm-PrRP31 is most likely due to food intake regulation. Despite the fact that the treatment of DIO mice with myr-PrRP20 decreased circulating level of leptin significantly, the masses of the dissected fat tissues were not significantly lowered (Table 2).

Plasma corticosterone level significantly increased after myr-PrRP20 and palm-PrRP31 treatment compared with Sal-treated group, but increase in adrenocorticotrophic hormone level did not reach significance (Supplementary Figure S5).

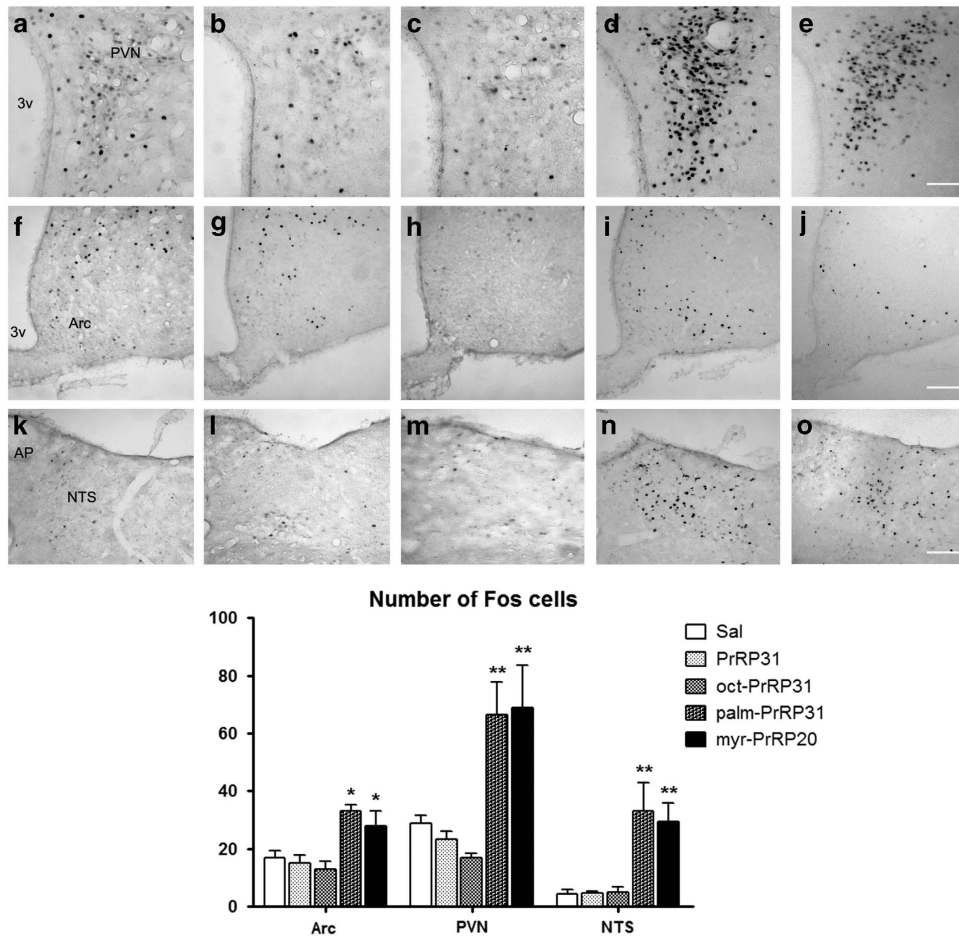


Figure 2. Effect of PrRP lipidization on cells activity in food intake-regulating areas in mouse brain. Fos immunoreactivity: the qualitative as well as quantitative assessment of Fos-immunostained cells in coronal section of PVN (a–e), Arc (f–j) and NTS (k–o) 90 min after SC application of saline (a, f, k) and PrRP31 (b, g, l), oct-PrRP31 (c, h, m), palm-PrRP31 (d, i, n) and myr-PrRP20 (e, j, o) at a dose of 5 mg kg⁻¹ in fasted mice (n=4). *P < 0.05, **P < 0.01 vs saline (Sal), PrRP31 and oct-PrRP31. PVN—paraventricular hypothalamic nucleus, Arc—arcuate hypothalamic nucleus, NTS—solitary tract nucleus, 3v—third brain ventricle. Scale bar is 50 μm for a–e, 100 μm for f–o.

Expression of UCP-1 was not changed in brown adipose tissue of palm-PrRP31 compared with Sal-treated group (Supplementary Figure S6).

As palm-PrRP31 treatment had the most attenuating effect on fat stores, we investigated the mRNA expressions of adipokines and fat metabolism-regulating enzymes only in palm-PrRP31-treated DIO mice and their pair-fed group. Decrease in the masses of all particular fats dissected resulted in a very significantly attenuated mRNA expressions of leptin (Supplementary Figure S7) but not adiponectin (not shown). In both SCAT and IPAT, the second most significant site of lipogenesis, fatty-acid synthase mRNA was significantly attenuated. Treatment with palm-PrRP31 did not decrease lipoprotein lipase mRNA expression in SCAT or in IPAT in contrast to the results observed in pair-fed animals (Supplementary Figure S7). Palm-PrRP31 treatment attenuated fat metabolism more significantly in the liver, where the mRNAs of enzymes catalyzing the *de novo* synthesis of fatty acids, ACACA and FASN, were reduced significantly and in addition to a reduction in sterol regulatory element-binding protein mRNA (Supplementary Figure S7).

DISCUSSION

In spite of their low toxicity and few side effects, the clinical potential of natural centrally acting anorexigenic neuropeptides is limited due to their low stability and poor bioavailability under

physiological conditions. Our work has shown for the first time that a unique modification of PrRP by lipidization led not only to an increased stability in blood but also enabled to exert PrRP central effect after peripheral administration.

In our previous study,²⁰ we confirmed the importance of the C terminus, identical for both PrRP20 and PrRP31, for their biological activity. Therefore, the N terminus of both natural peptides, PrRP31 and PrRP20, was lipidized with fatty acids of different lengths to preserve their full biological activity. PrRP31 and PrRP20 lipidized by 8–18 carbon chain fatty acids retained their binding affinities to GPR10 and NPFF2 receptors overexpressed in CHO cells and to tumor cells RC-4B/C endogenously expressing both GPR10 and NPFF2 receptors with affinities similar to natural PrRP31.^{20,34} Agonistic properties of the lipidized analogs of PrRP31 and PrRP20 were confirmed by an increased MAPK/EKR1/2 phosphorylation in CHO cells overexpressing GPR10 receptor.

Despite similar binding affinities and agonist character of PrRP lipidized by 8–18 carbons chain fatty acids, only palm- and stear-PrRP31 and myr-PrRP20 highly significantly and dose-dependently lowered food intake in lean overnight-fasted and freely fed mice after SC administration, whereas analogs containing fatty acids with shorter carbon chains and the natural PrRP31 or PrRP20 had no effect on food intake. These findings suggest that only palm- or stear-PrRP31 and myr-PrRP20 were probably able to cross the BBB and exert their central effect on food intake. This conclusion was

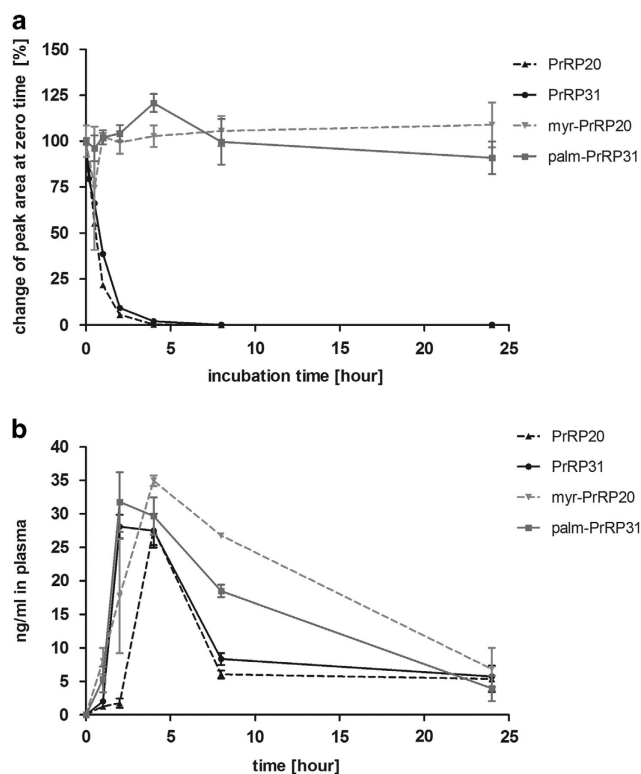


Figure 3. Pharmacokinetics of the PrRP analogs *in vitro* and *in vivo*. (a) Degradation profiles in rat plasma. The analog triplicates were incubated for different times in rat plasma and then submitted for immunoanalysis using EIA kit. The results are expressed as the percentage differences from the blood levels of PrRP31 at time 0 with a 10^{-6} M initial concentration. (b) Plasma concentrations after single SC injection (5 mg kg^{-1}) in mice ($n=3$) as measured by EIA kit.

further supported by the fact that both SC administered myr-PrRP20 and palm-PrRP31 significantly enhanced c-Fos immunoreactivity in food intake-regulating hypothalamic and brainstem nuclei containing both GPR10 and NPFF2 receptors,^{18,35} whereas natural and octanoylated PrRP31 did not induce these changes.

In the hypothalamus, leptin receptor and PrRP are colocalized and have additive anorexigenic effect.³⁶ Anorexigenic effect of PrRP independent of leptin but dependent on CCK was suggested in the brainstem.³⁷

The acute SC administration of natural PrRP31, palm-PrRP31 and myr-PrRP20 did not result in any sedative, analgetic or anxiety-inducing effects in mice. Thus, despite their high-affinity binding to NPFF2 receptor, lipidized PrRP analogs do not share the hyperalgesic activities of NPFF.²⁴ In spite of its name, PrRP-induced PRL release is currently considered controversial.³⁸ In our experiments, after intravenously or SC administration, palm-PrRP31 or myr-PrRP20 did not increase the release of PRL in rats and mice.

The long-lasting anorexigenic effect of palm- and stear-PrRP31 and myr-PrRP20 analogs could be explained by their prolonged stability owing to binding to serum albumin similar to liraglutide or palmitoylated gastric inhibitory polypeptide.¹⁶ Our stability test confirmed that both palm-PrRP31 and myr-PrRP20 were stable for > 24 h in rat plasma. *In vivo* pharmacokinetics in mice also showed longer stability and a higher area under the curve for palm-PrRP31 and myr-PrRP20 compared with natural, non-lipidized analogs.

Finally, the 2-week-long twice daily administration of palm-PrRP31 and myr-PrRP20 to mice with HF diet-induced obesity significantly decreased cumulative food intake and body weight. The time course and the extent of the effect were similar to those

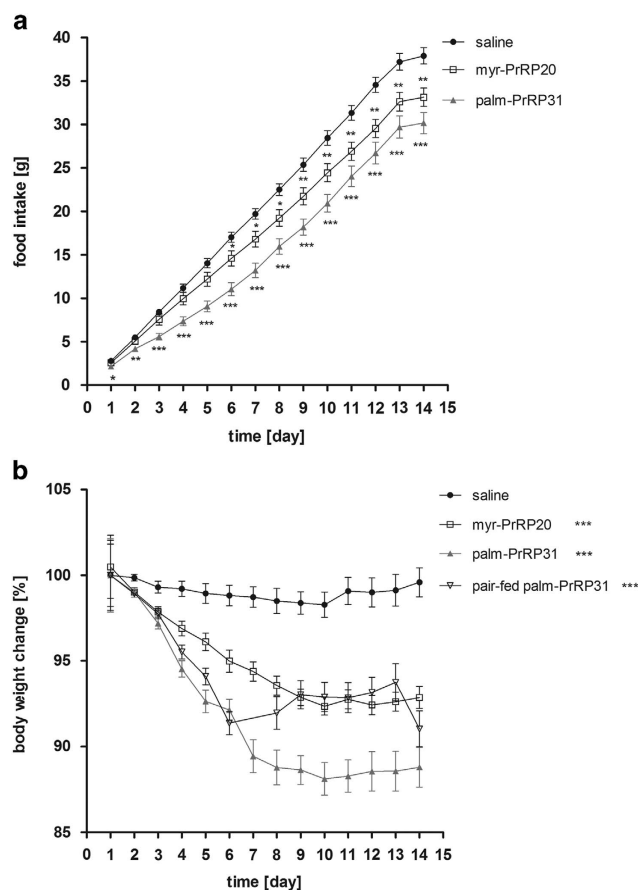


Figure 4. Palmitoylated PrRP31 and myristoylated PrRP20 reduce food intake and body weight of diet-induced obese mice. Effect of 14-day administration of palm-PrRP31 and myr-PrRP20 on (a) food intake and (b) body weight of DIO mice. Mice were SC administered by saline or peptides at a dose of 5 mg kg^{-1} twice daily ($n=10$). Pair-fed group received amount of food consumed by palm-PrRP31-treated group the previous day. The data were analyzed by one-way ANOVA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs saline-treated group.

of liraglutide,^{39,40} confirming the potential of these compounds for obesity treatment.

The decrease in body weight after 2-week palm-PrRP31 treatment in DIO mice was mediated mainly by the reduction of body fat that was accompanied by a decrease in leptin level. Decreased mRNA expressions of fatty-acid synthase in both the adipose tissue and the liver along with a decreased expression of acetyl-CoA carboxylase and sterol regulatory element-binding protein in the liver suggests that this reduction most likely resulted from a decreased *de novo* lipogenesis owing primarily to negative energy balance due to reduced food intake. In our study, changes of UCP-1 mRNA in brown adipose tissue after palm-PrRP31 treatment pointing to possible increase of energy expenditure were not found. On the other hand, significantly increased corticosterone and nonsignificantly increased adrenocorticotrophic hormone plasma levels after 14-days treatment with myr-PrRP20 and palm-PrRP31 support the fact that PrRP was proposed to be implicated also in endocrine regulation of hypothalamic–pituitary–adrenal axis.⁴¹

In conclusion, we have demonstrated that the lipidization of PrRP enabled its central anorexigenic effect after peripheral administration in both acute and chronic settings by enhancing its stability in the blood and improving its ability to cross the BBB. Our data also confirmed that GPR10 and/or NPFF2 receptors are suitable targets for the treatment of obesity. Collectively, our data

Table 2. Metabolic parameters after 14-day SC administration of PrRP analogs in fasted DIO mice

		Group/treatment			
		Saline	Myr-PrRP20	Palm-PrRP31	Pair-fed to palm-PrRP31
Fat/body weight	(%)	16.15 ± 0.4	15.3 ± 0.42	12.7 ± 0.71***	14.5 ± 0.67
SCAT/body weight	(%)	8.07 ± 0.33	7.05 ± 0.19	5.38 ± 0.49***	6.95 ± 0.50
IPAT/body weight	(%)	4.66 ± 0.33	5.09 ± 0.43	4.75 ± 0.19	4.67 ± 0.46
Perirenal fat/body weight	(%)	2.94 ± 0.14	2.77 ± 0.13	2.07 ± 0.20***	2.60 ± 0.08
Liver/body weight	(%)	4.07 ± 0.20	3.60 ± 0.18	3.56 ± 0.07	3.14 ± 0.13***
Leptin	(ng ml ⁻¹)	53.3 ± 3.49	39.6 ± 3.47*	24.7 ± 3.39***	27.4 ± 1.91***
Glucose	(mmol l ⁻¹)	6.94 ± 0.28	7.52 ± 0.16	7.26 ± 0.29	5.6 ± 0.37**
Insulin	(ng ml ⁻¹)	4.09 ± 0.55	3.54 ± 0.47	2.37 ± 0.47*	0.79 ± 0.14***
Triglycerides	(mg dl ⁻¹)	72.2 ± 3.2	68.7 ± 4.16	66.8 ± 8.74	57.5 ± 5.38

Abbreviations: IPAT, intraperitoneal adipose tissue; SCAT, subcutaneous adipose tissue. All values are expressed as mean ± s.e.m. (n = 10 per group). Significance (one-way ANOVA) is *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 vs saline-treated group.

suggest that lipidized PrRP analogs have potential as a possible future anti-obesity drugs.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the GACR No. P303/10/1368 and P303/12/0576, TACR TE01020028, grant of MSMT (No. 20/2014) and by the ASCR RVO: 61388963 and RVO:67985823. We gratefully acknowledge T Elbert for the radioiodination of peptides and H Vysušilová, Z Kopecká and I Nahodilová for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S *et al*. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 1998; **393**: 272–276.
- Ibata Y, Iijima N, Kataoka Y, Kakiyama K, Tanaka M, Hosoya *et al*. Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain. *Neurosci Res* 2000; **38**: 223–230.
- Lawrence C, Celsi F, Brennan J, Luckman S. Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat Neurosci* 2000; **3**: 645–646.
- Engström M, Brandt A, Wurster S, Savola JM, Panula P. Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neurotensin FF2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **305**: 825–832.
- Dockray GJ. The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol* 2004; **89**: 229–235.
- Chartrel N, Bruzzone F, Lepince J, Tollemer H, Anouar Y, Do-Régo JC *et al*. Structure and functions of the novel hypothalamic RFamide neuropeptides R-RFa and 26RFa in vertebrates. *Peptides* 2006; **27**: 1110–1120.
- Lawrence C, Ellacott K, Luckman S. PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling. *Endocrinology* 2002; **143**: 360–367.
- Bjursell M, Lenneräs M, Göransson M, Elmgren A, Bohllooly-Y M. GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **363**: 633–638.
- Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, Mera T, Fukusumi S, Hinuma S *et al*. Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents. *J Clin Invest* 2008; **118**: 4014–4024.
- Maniscalco JW, Rinaman L. Overnight food deprivation markedly attenuates hind-brain noradrenergic, glucagon-like peptide-1, and hypothalamic neural responses to exogenous cholecystokinin in male rats. *Physiol Behav* 2013; **121**: 35–42.
- Dodd GT, Luckman SM. Physiological Roles of GPR10 and PrRP Signaling. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; **4**: 20.
- Bellmann-Sickert K, Beck-Sickinger AG. Peptide drugs to target G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2010; **31**: 434–441.
- Brasnjević I, Steinbusch HW, Schmitz C, Martínez-Martínez P. Initiative ENR. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Prog Neurobiol* 2009; **87**: 212–251.
- Malavolta L, Cabral FR. Peptides: important tools for the treatment of central nervous system disorders. *Neuropeptides* 2011; **45**: 309–316.
- Havelund S, Plum A, Ribell U, Jonassen I, Vølund A, Markussen J *et al*. The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. *Pharm Res* 2004; **21**: 1498–1504.
- Gault VA, Kerr BD, Harriott P, Flatt PR. Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with Type 2 diabetes and obesity. *Clin Sci (Lond)* 2011; **121**: 107–117.
- Manning S, Pucci A, Finer N. Pharmacotherapy for obesity: novel agents and paradigms. *Ther Adv Chronic Dis* 2014; **5**: 135–148.
- Roland B, Sutton S, Wilson S, Luo L, Pyati J, Huvar R *et al*. Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery. *Endocrinology* 1999; **140**: 5736–5745.
- Boyle R, Downham R, Ganguly T, Humphries J, Smith J, Travers S. Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide. *J Pept Sci* 2005; **11**: 161–165.
- Maletínská L, Spolcová A, Maixnerová J, Blechová M, Zelezná B. Biological properties of prolactin-releasing peptide analogs with a modified aromatic ring of a C-terminal phenylalanine amide. *Peptides* 2011; **32**: 1887–1892.
- Blechová M, Nagelová V, Záková L, Demianová Z, Zelezná B, Maletínská L. New analogs of the CART peptide with anorexigenic potency: the importance of individual disulfide bridges. *Peptides* 2013; **39**: 138–144.
- Maletínská L, Pýchová M, Holubová M, Blechová M, Demianová Z, Elbert T *et al*. Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; **340**: 781–786.
- Holubová M, Spolcová A, Demianová Z, Sýkora D, Fehrentz JA, Martínez J *et al*. Ghrelin agonist JMV 1843 increases food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides in mice. *Physiol Res* 2013; **62**: 435–444.
- Maletínská L, Ticha A, Nagelova V, Spolcova A, Blechova M, Elbert T *et al*. Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPFF receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration. *Brain Res* 2013; **1498**: 33–40.
- Motulsky H, Neubig R. Analyzing radioligand binding data. *Curr Protoc Neurosci* 2002; **Chapter 7**: Unit 7.5.
- Nagelová V, Pirník Z, Zelezná B, Maletínská L. CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide specific binding sites in PC12 cells have characteristics of CART peptide receptors. *Brain Res* 2014; **1547**: 16–24.
- Pirník Z, Bundžiková J, Holubová M, Pýchová M, Fehrentz JA, Martínez J *et al*. Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice. *Neurochem Int* 2011; **59**: 889–895.
- Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Pirník Z, Kiss A *et al*. Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci* 2008; **9**: 101.
- Maletínská L, Lignon M, Galas M, Bernad N, Pírková J, Hlaváček J *et al*. Pharmacological characterization of new cholecystokinin analogues. *Eur J Pharmacol* 1992; **222**: 233–240.
- Kopecký J, Hodný Z, Rossmeisl M, Sýrový I, Kozak LP. Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am J Physiol* 1996; **270**: E768–E775.
- Maletínská L, Matyskova R, Maixnerova J, Sýkora D, Pychova M, Spolcova A *et al*. The Peptidic GHS-R antagonist [D-Lys(3)]GHRP-6 markedly improves adiposity and related metabolic abnormalities in a mouse model of postmenopausal obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2011; **343**: 55–62.

- 32 Chang C, Cheng Y. Ribonucleotide reductase isolated from human cells. Heterogeneity among the sources. *Biochem Pharmacol* 1978; **27**: 2297–2300.
- 33 Maixnerová J, Hlaváček J, Blokesová D, Kowalczyk W, Elbert T, Sanda *et al*. Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. *Peptides* 2007; **28**: 1945–1953.
- 34 Maixnerová J, Špolcová A, Pýchová M, Blechová M, Elbert T, Rezáčková *et al*. Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor. *Peptides* 2011; **32**: 811–817.
- 35 Gouardères C, Faura CC, Zajac JM. Rodent strain differences in the NPF1 and NPF2 receptor distribution and density in the central nervous system. *Brain Res* 2004; **1014**: 61–70.
- 36 Ellacott KL, Halatchev IG, Cone RD. Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. *Endocrinology* 2006; **147**: 3190–3195.
- 37 Bechtold DA, Luckman SM. Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice. *Endocrinology* 2006; **147**: 4723–4729.
- 38 Jarry H, Heuer H, Schomburg L, Bauer K. Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release *in vivo*. *Neuroendocrinology* 2000; **71**: 262–267.
- 39 Porter DW, Kerr BD, Flatt PR, Holscher C, Gault VA. Four weeks administration of Liraglutide improves memory and learning as well as glycaemic control in mice with high fat dietary-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 2010; **12**: 891–899.
- 40 Kerr BD, Flatt PR, Gault VA. Effects of gamma-glutamyl linker on DPP-IV resistance, duration of action and biological efficacy of acylated glucagon-like peptide-1. *Biochem Pharmacol* 2010; **80**: 396–401.
- 41 Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Noguchi J, Kitada C, Fujino *et al*. Prolactin-releasing peptide as a novel stress mediator in the central nervous system. *Endocrinology* 2001; **142**: 2032–2038.

Supplementary Information accompanies this paper on International Journal of Obesity website (<http://www.nature.com/ijo>)

