

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Obor Biochemie

**CHARAKTERIZACE VAZEBNÉHO MÍSTA PRO
PEPTID CART**

Diplomová práce

Darja Koutová (roz. Blokešová)

Školitelka: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Garantka: Prof. RNDr. Danuše Sofrová, CSc.

Praha 2009

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovávala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Lenky Maletínské, CSc. (ÚOCHB, v.v.i., AV ČR, Praha), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze.....

.....

podpis

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

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

Chtěla bych také upřímně poděkovat Ing. Blance Železné, CSc. za odborné rady a její obětavost při psaní mé diplomové práce a při experimentální činnosti a za její oporu nejen při zvládání úkolů týkajících se diplomové práce.

Kolektivu skupiny RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. z oddělení Biochemie a molekulární biologie ÚOCHB, v.v.i., AV ČR děkuji za vytvoření příjemného a milého pracovního prostředí, zvláště Mgr. Reshe Matyškové za její pečlivost, vlídnost, obětavost a pomoc při experimentální činnosti, Mgr. Janě Maixnerové za její ochotu, nasazení a pomoc při experimentální činnosti a v neposlední řadě si mé díky zaslouží i Andrea Špolcová a Miroslava Pýchová.

Děkuji Mgr. Ivě Veselé za provedení radioaktivního značení peptidu CART a Mgr. Miloslavu Šandovi za proměření hmotnostních spekter.

Mé velké srdečné a upřímné díky patří mému manželovi nejen za jeho odborné rady, ale i za lásku, kterou mě podporoval po celou dobu mého studia, a mým rodičům za jejich oporu, naslouchání, trpělivost a zajištění klidného zázemí při mých studiích.

Tato práce byla podporována grantem č. 303/05/0614 grantové agentury ČR a záměrem Z40550506 Akademie věd ČR.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	8
1.1. CART (Cocaine- and amphetamine-regulated transcript)	8
1.1.1. Objev transkriptu a peptidu	8
1.1.2. Struktura peptidů CART	8
1.1.3. Výskyt	9
1.1.4. Fyziologické účinky peptidů CART	10
1.1.4.1. Role peptidů CART v regulaci příjmu potravy	11
1.1.4.2. Peptidy CART a jejich vliv na vnímání bolesti	14
1.1.4.3. Drogová závislost a zneužívání drog jako další oblast působení peptidů CART	14
1.1.4.4. Peptidy CART a jejich regulační role v pankreatu	15
1.1.4.5. Úloha peptidů CART v hypotalamo-hypofýzo-adrenální ose	16
1.1.4.6. Úloha peptidů CART v hypotalamo-hypofýzo-tyroidální ose	17
1.1.4.7. Úloha peptidů CART v sympato-adrenálním systému	18
1.1.4.8. Shrnutí fyziologických účinků	19
1.1.5. Fragmenty peptidů CART	19
1.2. Receptor pro CART a buněčná signalizace	21
1.2.1. Buněčné signalizace peptidů CART	21
1.2.2. Vazebné studie s peptidy CART	24
1.3. Buněčná linie – feochromocytomální buňky PC12	26
1.3.1. Původ	26
1.3.2. Charakteristika buněčné linie PC12	26
1.4. Přístupy k hledání vazebného místa pro peptidy CART	27
2. Cíl diplomové práce	28
3. Materiál	29
4. Metody	30
4.1. Peptidy CART a jejich značení	30
4.1.1. Peptidy	30
4.1.2. Jodace CART(61-102)	30
4.1.3. Biotinylace a fluorescenční značení peptidu CART(61-102)	30
4.2. Buněčná linie PC12	32
4.2.1. Pěstování buněčné linie PC12	32
4.3. Kompetitivní vazebné experimenty	32

4.3.1. Kompetitivní vazba na celé buňky na destičkách	33
4.3.2. Kompetitivní vazba na buněčné membrány z nediferencovaných a diferencovaných buněk PC12	34
4.4. Analýza dat získaných z vazebných pokusů a statistika	35
4.5. Metoda sít'ování pomocí sít'ovacích činidel	36
4.5.1. Zesít'ování ¹²⁵ I-CART(61-102) a vazebného místa	38
4.6. Fosforylace MAPK (ERK1/2) v buňkách PC12	41
4.6.1. Metoda fosforylace MAPK (ERK1/2) v buňkách PC12	42
5. Výsledky	45
5.1. Značení peptidu CART(61-102)	45
5.1.1. Jodace CART(61-102)	45
5.1.2. Biotinylace a fluorescenční značení peptidu CART(61-102)	45
5.2. Buněčná linie PC12	46
5.2.1. Pěstování buněčné linie PC12	46
5.2.2. Sklizení buněk na membrány	46
5.3. Kompetitivní vazebné experimenty s peptidy CART	47
5.3.1. Kompetitivní vazba k nediferencovaným a diferencovaným buňkám PC12	47
5.3.2. Kompetitivní vazba k membránám z nediferencovaných a diferencovaných buněk PC12	50
5.4. Zesít'ování ¹²⁵ I-CART(61-102) a vazebného místa	52
5.5. Fosforylace MAPK (ERK1/2) v buňkách PC12	55
6. Diskuze	58
6.1. Význam peptidů ovlivňujících příjem potravy pro možnou léčbu obezity	58
6.2. Značení peptidu CART a vazba analogů k buňkám PC12	59
6.3. Zesít'ování vazebného místa s CART(61-102)	61
6.4. Signalizace peptidu CART v nediferencovaných buňkách PC12	62
6.5. Další plánované studie	63
7. Souhrn	64
Seznam použité literatury	66

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACB – Nucleus accumbens

ACTH – Adrenokortikotropní hormon (Adrenocorticotropic Hormone)

AgRP – Agouti Related Peptide

APS - Amonium-perchlorosíran

ARC – Nucleus arcuatus

BioCART(61-102) – Biotinem značený peptid CART(61-102)

BPTI – Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor)

BSA – Hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)

CART – Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript

CNS – Centrální nervová soustava

CREB – Vazebný element cyklického AMP (CREB, Cyclic AMP-Response-Element-Binding)

CRH – Kortikoliberin (Corticotropin releasing hormone)

DSG – Disukcinimidyl-glutarát

DSS – Disukcinimidyl-suberát

EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová (Ethylendiamintetraacetic acid)

EGS – Ethylenglykol-bis[sukcinimidylsukcinát]

ERK 1/2 – Extracelular Regulated Kinase 1/2

FBS – Fetální hovězí sérum (Fetal Bovine Serum)

FluoCART(61-102) – Fluorescenčně značený peptid CART(61-102)

GABA – γ -Aminomáselná kyselina (γ -amino butyric acid)

GFP – Zelený fluorescenční protein (Green Fluorescent Protein)

GPCR – Receptory spřažené s G proteiny (G Protein Coupled Receptors)

HEPES – N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonová kyselina)

HPA – Hypotalamo-hypofyzární osa (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis)

HPT – Hypotalamo-tyroidální osa (Hypothalamus-Pituitary-Thyroidal Axis)

ICV – Podání látek do mozkové komory (Intracerebroventricular neboli intracerebroventrikulární podání)

JNK – c-Jun-N-Terminal Kinase

*10/2010
Grafy a tabulky*

LHA – Laterální hypotalamus
LC-MS/MS – Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
MALDI-TOF – Hmotnostní spektrometrie (Matrix Assisted Laser Desorption – Time of Flight)
MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase
MBS – *N*-hydroxysukcinimid-3-maleimidobenzoát
MDMA – 3,4-Metylendioxy-*N*-metyl-amfetamin
(3,4-Methylenedioxy-*N*-Methyl-Amphetamine)
mRNA – Mediátorová ribonukleová kyselina (Messenger Ribonucleotic Acid)
MSG – Glutamát sodný (Monosodium Glutamate)
 α -MSH – Hormon stimulující α -melanocyty (α -Melanocyte Stimulating Hormone)
NGF – Nervový růstový faktor (Nerve growth factor)
NMR – Nukleární magnetická rezonance
NPY – Neuropeptid Y
NTS – Nucleus tractus solitarius
PACAP – Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PAGE – Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PC1/2/3 – Prohormon-konvertáza typu 1, 2 nebo 3
PEI – Polyethylenimin
POMC – Pro-opiomelanokortin (Pro-opiomelanocortin)
PVN – Paraventriculární jádro
PYY – Peptid YY
RP-HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RTK – Receptor tyrosin kináza (Receptor Tyrosine Kinase)
SAM – Sympato-adrenální osa (Sympathic-Adrenal-Medullary axis)
SDS – Dodecylsulfát sodný
SNP – Polymorfismus jednoho nukleotidu (Single Nucleotide Polymorphism)
TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametyl-1,2-diaminometan
TRH – Tyroliberin (Thyrotropin Releasing Hormone)
TSAT – Tris-succinimidyl aminotriacetát
TSH – Thyrotropin (Thyrotropin Stimulating Hormone)

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

1. ÚVOD

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

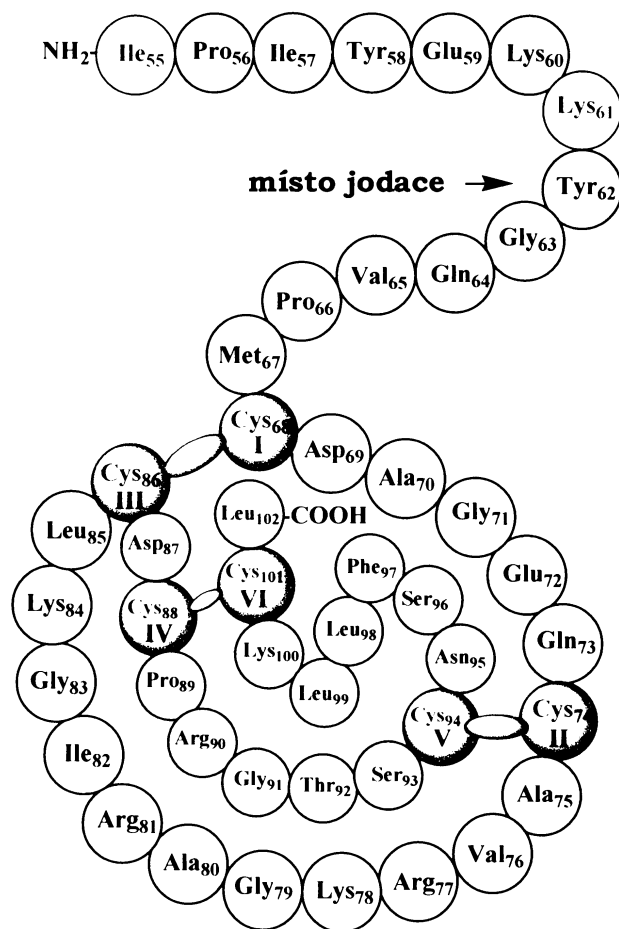
1.1.1. Objev transkriptu a peptidu

Skupina vědců pod vedením J. Douglassa objevila v roce 1995 genový transkript, jehož množství bylo účinkem kokainu a amfetaminu zvýšeno; odtud tedy pochází i samotný název tohoto produktu cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) [1]. Ukázalo se, že tento genový transkript kóduje nový protein, jehož C-koncová sekvence odpovídá peptidu, který byl již v roce 1981 izolován z ovčího hypotalamu Spiessem a kol. a jehož funkce nebyla tehdy známa [2]. V roce 1998 připravili Thim a kol. tento nový hypotalamický peptid rekombinantně v kvasinkách [3]. Poté Jensen a kol. potvrdili pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce expresi CART mRNA v hypotalamu, v různých tumorech odvozených z Langerhansových ostrůvků a v Langerhansových ostrůvcích [4] a pomocí *in situ* hybridizace a imunocytochemie lokalizovali expresi peptidu CART také v δ -buňkách pankreatu [4]. Periferní podání leptinu stimulovalo expresi CART mRNA v nucleu arcuatu hypotalamu u obézních myší [5].

1.1.2. Struktura peptidů CART

Lidský gen pro CART je velký přibližně 2,5 kb, je umístěn na chromozomu 5q13-q14 a obsahuje 3 axony a 2 introny [6]. Gen peptidu CART je evolučně konzervovaný, což ukazuje na jeho podobnou funkci u různých živočišných druhů a tedy i velkou důležitost [6]. Transkripce genu vznikají dva alternativní produkty mRNA, které mají odlišnou délku. Prepropeptid CART je tvořen 129 nebo 116 aminokyselinami [1]. Signální sekvence má 27 aminokyselin, výsledný propeptid CART se pak skládá ze 102 aminokyselin v případě dlouhé formy (potkaní, myší) nebo 89 v případě krátké formy (potkaní, myší, lidský). Krátký myší a potkaní propeptid se od lidského liší v pozici 42 (lidský má valin místo izoleucinu), přičemž C-koncová sekvence je vždycky stejná [1]. Struktura peptidu CART je znázorněna na obr. 1 na str. 9. Propeptid obsahuje několik štěpných míst pro prohormon-konvertázu typu 2 (PC2), která dává vzniknout

dvěma přirozeným biologicky aktivním fragmentům, CART(55-102/42-89) a CART(62-102/49-89) [7]. Jak prokázala NMR spektroskopie, CART(55-102) obsahuje kompaktní jádro stabilizované 3 disulfidickými můstky s neuspořádanou N-koncovou sekvencí [8].

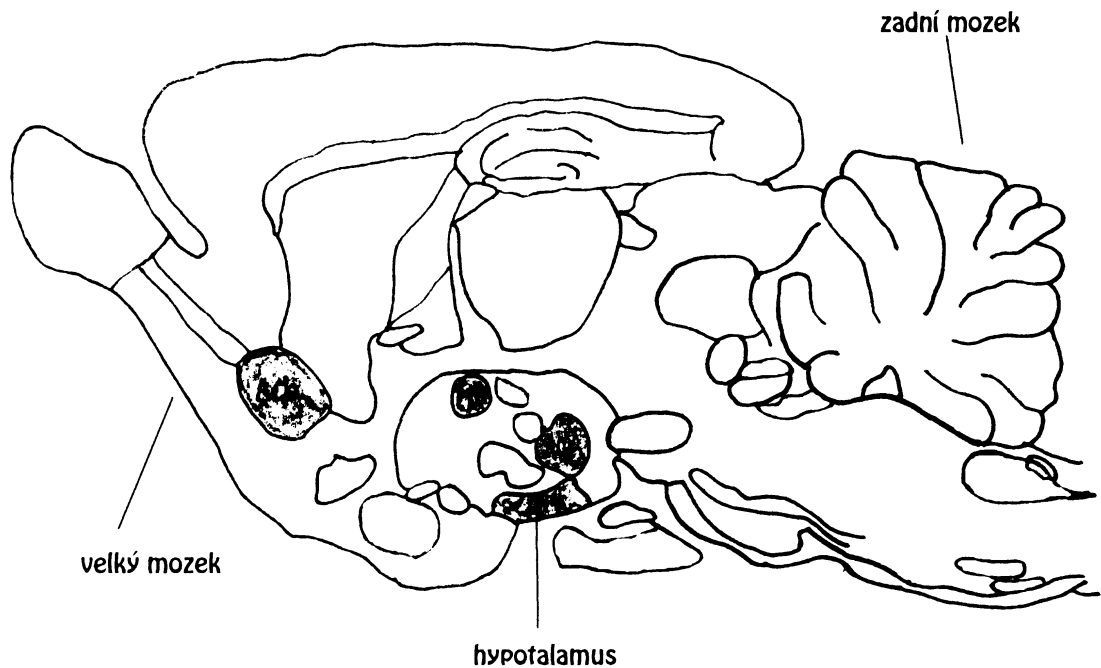


Obr. 1 Struktura peptidu CART [3]

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

1.1.3. Výskyt

Peptidy CART se vyskytují jednak v centrální nervové soustavě (CNS), jednak v periférii. V CNS jsou přítomny prakticky ve všech částech mozku, ale v různých koncentracích. CART je jedním z nejhojnějších transkriptů v hypotalamu [9] a rovněž tak příslušné peptidy jsou jedněmi z nejhojnějších peptidů v hypotalamu [10]. Jsou přítomny v nucleu arcuatu (ARC), v paraventriculárním jádru (PVN), nucleu accumbens (ACB) a laterálním hypotalamu (LHA), jak ukazuje obr. 2 na následující straně a v hypofýze [11, 12]. Z periferních orgánů se vyskytují v dřeni nadledvin, Langerhansových ostrůvcích pankreatu a v trávicím traktu [11, 12].



Obr. 2 Schéma řezu mozku – největší exprese CART mRNA v mozku [12]

Acb – nucleus accumbens, Arc – nucleus arcuatus, LH – laterální hypotalamus, PVN – nucleus paraventricularis. Barvou zvýrazněné části představují oblasti související s příjmem potravy.

Peptidy CART mohou být zařazovány mezi neurotransmitery. Vyskytují se pouze v neuronech a jsou lokalizovány společně s dalšími neurotransmitery, např. s γ -aminomáselnou kyselinou (GABA) [11]. Navíc uvolnění peptidů CART z hypotalamu vyvolané draselnými ionty je závislé na vápenatých iontech [13].

Peptidy CART jsou řízeny denním rytmem, kdy jsou jejich hladiny v hypotalamu, amygdale a v krvi potkanů ráno nízké a večer vysoké [14].

1.1.4. Fyziologické účinky peptidů CART

Peptidy CART působí v celé řadě fyziologických procesů v lidském organismu a mají rozdílné fyziologické účinky v periférii a v CNS [15].

Účastní se centrální regulace příjmu potravy (anorexigenní účinek – snižování příjmu potravy, opak orexigenního účinku) a energetického metabolismu, endokrinní regulace [16, 17], mohou snižovat bolest nezánnětlivého charakteru [18] a ovlivňují funkci pankreatu [19].

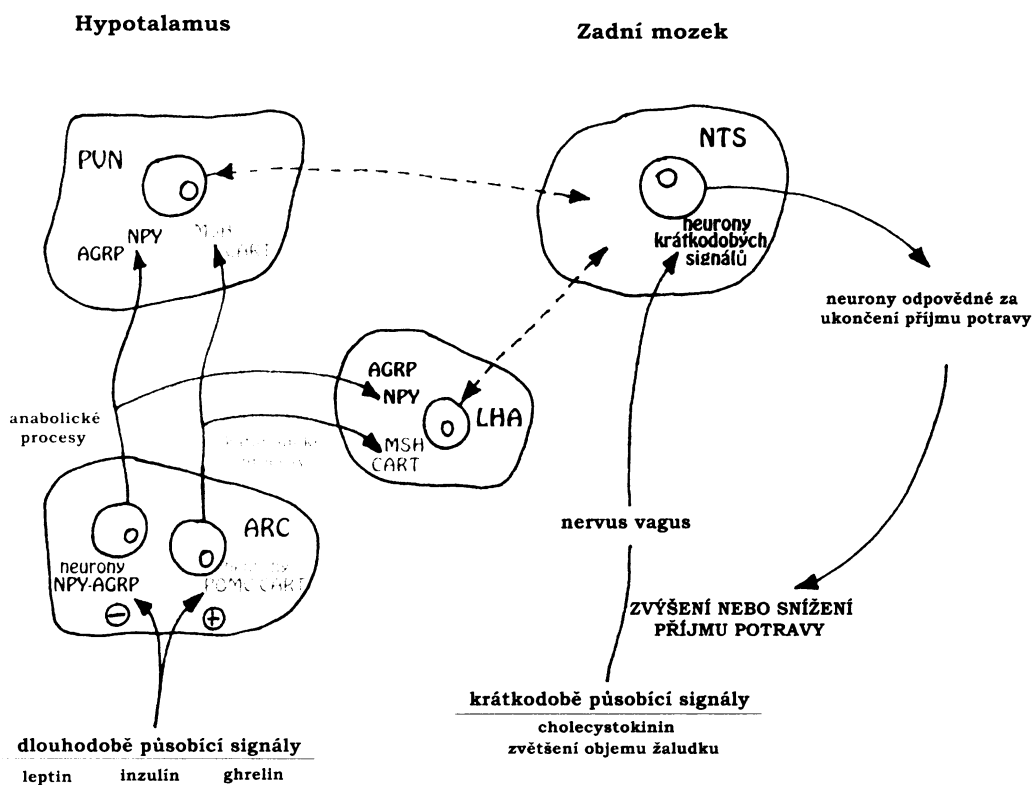
Peptidy CART ovlivňují neuroendokrinní systémy, jako hypotalamo-hypofýzo-adrenální osu [20], hypotalamo-hypofýzo-tyroidální osu [12, 21] a sympato-adrenální systém [22].

1.1.4.1 Role peptidů CART v regulaci příjmu potravy

V posledních letech se ukazuje jako zvlášť významné hledání nových možností v terapii lidské obezity. Obezita je v současné době velkou hrozbou ve výčtu závažných onemocnění na světě s trvale vzestupným trendem výskytu. Může významně zkrátit život a sama je pak predispozicí vzniku dalších onemocnění. Krátce po objevu peptidů CART se ukázala jejich spjitost s regulací příjmu potravy, a to na základě distribuce peptidů CART v mozku, zvláště v hypotalamu (v ARC, LHA, PVN, ACB), který je hlavním centrem regulace příjmu potravy [10, 20]. Dále byly peptidy CART nalezeny i v periferních oblastech souvisejících s příjmem potravy [23, 24, 25].

Schéma CNS znázorňující vztah dlouhodobě působících signálů a krátkodobě působících signálů a jejich vliv na příjem potravy je vidět na následující straně na obr. 3.

Lambert a kol. [26, 27] ukázal, že intracerebroventrikulární (ICV, podané do mozkové komory) podání fragmentu peptidu CART(62-76) potkanům snižuje příjem potravy a ICV podané protilátky proti těmto peptidům zvyšují příjem potravy u potkanů. Neurony nucleu arcuatu obsahující peptidy CART byly lokalizovány poblíž nervových zakončení neuronů neuropeptidu Y (NPY), který je nejznámějším stimulatorem příjmu potravy. Toto zjištění poukazovalo na vzájemný vztah mezi peptidy CART a NPY. Peptid CART tlumil orexigenní aktivitu NPY [5]. Krom anorexigenních účinků peptidů CART bylo také pozorováno snížení CART mRNA v nucleu arcuatu u hladových zvířat a periferní podání leptinu obézním myším zvyšovalo hladiny CART mRNA v nucleu arcuatu [5]. V modelech myši obezity s mutací v genu pro leptin (ob/ob myši) exprese CART mRNA téměř vymizela.



Obr. 3 Hypotetický model CNS znázorňující vztah dlouhodobě působících signálů a krátkodobě působících signálů a jejich vliv na příjem potravy, upraveno dle [28].

Neurony orexigenních peptidů NPY a AGRP (agouti-related peptide) a neurony anorexigenních peptidů pro-opiomelanokortinu (POMC) a CART jsou součástí ARC a jsou to tzv. neurony 1. řádu. Tyto neurony reagují na dlouhodobě působící signály z periferie, tedy leptin, inzulín a ghrelin. Neurony 1. řádu vysílají signály k neuronům 2. řádu, tedy např. k neuronům LHA a neuronům PVN. Nucleus tractus solitarius (NTS) reaguje na krátkodobě působící signály z periferie, např. na cholecystokinin. Mezi PVN, LHA a NTS se integrují signály z periferie a signály centrální a tyto vztahy mají vliv na zvýšení nebo snížení příjmu potravy.

Model myší obezity, vyvolané glutamátem sodným (MSG), je charakteristický vznikem lézí v nucleu arcuatu v hypotalamu po subkutánním podání glutamátu sodného novorozeným myším, což způsobí výraznou obezitu [29]. Poškození nucleu arcuatu vede

ke ztrátě produkce peptidů CART, přičemž po jejich podání exogenně je jejich anorexigenní aktivita zachována [30].

Peptidy CART byly také nalezeny ve střevech [13, 31, 32, 23, 24, 25] a v nervu vagu [33, 34]. ICV a intracisternální podání (podání do prostoru mezi mozečkem a prodlouženou míchou, který je vyplněn mozkomíšním mokem) peptidu CART(55-102) inhibovalo sekreci žaludečních šťáv a vyprazdňování žaludku [35].

Nucleus accumbens se považuje za jednu z oblastí působení anorexigenní aktivity peptidů CART, neboť kromě vysoké koncentrace endogenních peptidů CART i jejich podání do této oblasti mozku potlačuje příjem potravy [27]. Aktivací receptorů pro serotonin-4 v nucleu accumbens se v této oblasti zvýšily i hladiny CART mRNA a byl potlačen příjem potravy, zatímco snížení hladiny peptidů CART vedlo ke zrušení anorexigenní aktivity agonisty receptoru pro serotonin-4 [36]. Toto snížení hladiny CART mRNA také snížilo anorexigenní účinek 3,4-metylendioxy-N-metyl-amfetaminu (MDMA), peptidy CART tedy mohou v nucleu accumbens zprostředkovávat účinky MDMA [36].

Po podání peptidu CART(55-102) do hypotalamu byly v oblastech mozku souvisejících s příjmem potravy zvýšeny také hladiny proteinu c-fos, který je nepřímým indikátorem aktivity neuronů v mozku [37]. Chronické (10denní) ICV podání peptidů CART snižovalo příjem potravy u štíhlých i obézních potkanů [38]. I přes výše zmíněné účinky peptidů CART měly však např. myši s vyřazeným genem pro CART normální tělesnou hmotnost a příjem potravy, ale byly více náchylné k obezitě po vysokotučné dietě než myši bez tohoto defektu [39].

Vztah peptidů CART k příjmu potravy lze pozorovat i z jejich vztahu k jiným peptidům a hormonům ovlivňující příjem potravy. Peptidy CART jsou v potkaním nucleu arcuatu také společně lokalizovány s hormonem stimulujícím α -melanocyty (α -MSH) [40, 41], což je známý inhibitor příjmu potravy. Receptory pro leptin byly nalezeny v neuronech nucleu arcuatu, které produkují peptidy CART, a to může znamenat, že peptidy CART mohou zprostředkovávat v hypotalamu účinek leptinu [42].

Dalším důkazem je i vztah peptidů CART s endokanabinoidy [43]. Endokanabinoidy jsou orexigenními látkami a inhibují anorexigenní aktivitu peptidů, mezi které řadíme i peptidy CART. Spojení peptidů CART s endokanabinoidy potvrzuje i fakt, že byla nalezena společná lokalizace těchto peptidů s kanabinoidním receptorem CB1. Endokanabinoid anandamid zvyšuje příjem potravy aktivací receptoru CB1, zatímco antagonist receptoru CB1 inhibuje příjem potravy. Působení agonisty receptoru CB1 u

myši zvyšuje hladiny peptidů CART v nucleu accumbens, ale antiobezitní lék rimonabant, jenž je antagonistou CB1 receptoru, nemá na myši s vyřazeným genem pro CART žádný účinek [43, 44]. Peptidy CART tedy mohou mít vliv na orexigenní aktivitu anandamidu [44].

Účinky peptidů CART jsou pozorovány i u lidí. Členové italské rodiny s mutací v genu pro CART trpěli vysokým stupněm obezity [45]. U jiné studie provedené s více jak 500 lidmi se zjistilo, že 5' oblast genu pro CART je vysoce polymorfní a tento polymorfismus může souviset s obezitou [46]. Další studie se týkala vysoce obézních jedinců, u kterých se identifikoval polymorfismus v jednom nukleotidu (SNP, single nucleotide polymorphism) v genu pro CART, který může být genetickou predispozicí k obezitě [47].

Ukazuje se tedy, že peptidy CART působí jako anorexigenní látky, ačkoliv nejsou dosud známa všechna místa jeho působení a není dosud zatím zcela objasněn mechanismus tohoto působení. Z literatury je zřejmé, že takovýchto míst a mechanismů může být více. Velkou nevýhodou je však to, že dosud není znám receptor/receptory pro peptidy CART [48]. Peptidy CART mohou pomoci k pochopení dalších mechanismů vedoucích k obezitě a mohou být také nadějí v její terapii jako potenciální antiobezitní lék [49], i když se na regulaci příjmu potravy podílí řada dalších faktorů, které je třeba brát v potaz, neboť regulaci příjmu potravy ovlivňuje řada dalších neurotransmiterů a hormonů [48].

1.1.4.2 Peptidy CART a jejich vliv na vnímání bolesti

V souvislosti s distribucí CART mRNA v šedé kůře mozkové, v locus coeruleus mozkového kmene, v nucleus raphis dorsalis a v míše se uvažuje o jejich roli v regulaci bolesti [10]. V jednotlivých dílčích testech se zkoumal jejich vliv na bolestivost, zda jsou antihyperalgení (dokáží potlačit zvyšující se bolestivý stimul) či antiallodynní (potlačí bolestivý vjem, který normálně bolest nevyvolává) a zda mají protizánětlivé vlastnosti [18]. Zjistilo se, že peptidy CART zmírňují hyperalgesii a allodynii u zvířat s neuropatickou bolestí, to je s blíže nespecifikovaným onemocněním nervů [18]. Nemají však velký vliv na bolesti zánětlivého charakteru. Mechanizmy tohoto působení však nejsou zatím zcela známy a je to především dáno tím, že není znám receptor/receptory pro CART.

1.1.4.3 Drogová závislost a zneužívání drog jako další oblast působení peptidů CART

Expresi CART mRNA lze detekovat v oblastech ventral tegmentum mezencefalonu a nucleus accumbens, tedy v oblasti mozku, která poukazuje na možnou roli těchto peptidů při drogové závislosti a zneužívání drog. CART byl původně objeven jako mRNA, která byla zvýšena po podání kokainu a amfetaminu [1], v pozdějších studiích se to však ne zcela podařilo zopakovat. Spíše se jeví, že exprese těchto peptidů je zvýšena po dlouhodobém podání těchto látek než akutním [48]. Nicméně řada farmakologických experimentů a pokusů týkajících se sociální interakce a chování označuje peptidy CART jako peptidy, které jsou schopny ovlivňovat účinek psychostimulantů [50]. Potvrzuje to i studie s oběťmi drogově závislými na kokainu, které měly významně zvýšené hladiny CART mRNA [51,52]. Jako další důkazy můžeme zmínit i společnou lokalizaci neuronů pro CART s neurony dalších neurotransmiterů, jako dopaminu, GABA a glutamátu. Dále peptidy CART regulují mezokortikolimbický dopaminergní systém a mohou tak ovlivňovat reakci a odpověď na působení psychostimulantů [52], navíc byly na neuronech obsahujících peptidy CART také nalezeny receptory pro dopamin [53, 54]. Exprese genu pro CART je také regulována transkripčním faktorem vazebným elementem cyklického AMP (CREB, cyclic AMP-response-element-binding protein), který je znám svou rolí při závislosti na drogách [50]. Nedávné studie také potvrzují zvýšení hladiny CART mRNA v nucleu accumbens po podání metamfetaminu, MDMA nebo ethanolu [36, 55].

1.1.4.4 Peptidy CART a jejich regulační role v pankreatu

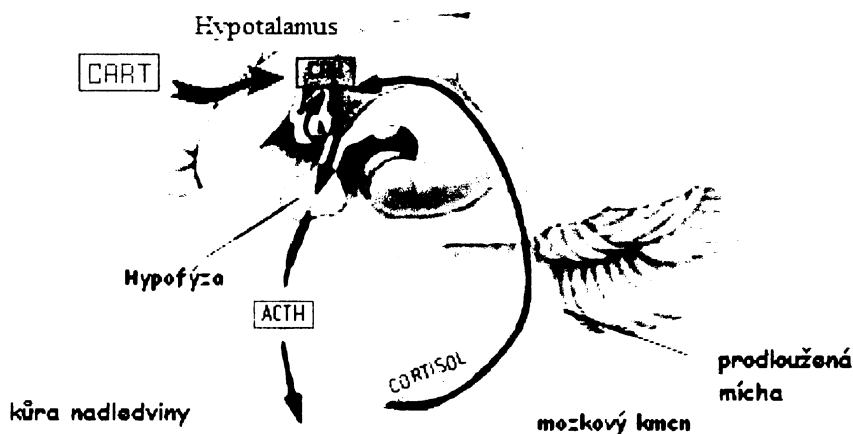
Langerhansovy ostrůvky pankreatu jsou tvořeny několika druhy buněk. Řadíme mezi ně β -buňky produkující inzulín, α -buňky produkující glukagon, δ -buňky produkující somatostatin, PP-buňky produkující pankreatický polypeptid a nedávno objevený nový typ buněk produkující ghrelin. Mezi další peptidy produkované pankreatem řadíme NPY, peptid YY (PYY) a mnoho dalších. Řada z nich se vyskytuje v nervové síti, která pankreas inervuje [56]. Peptidy CART jsou dalšími z peptidů, které jsou produkovány jednak samotnými buňkami Langerhansových ostrůvků, ale i parasympatickými nervovými vlákny inervující tuto tkáň. Místo jejich exprese se liší ve vývoji i v rámci jednotlivých zvířecích druhů (myš, potkan), nicméně právě u lidí se vyskytují v nervech pankreatu a jejich exprese je spojována s určitým stupněm diference nádoru pankreatu [57]. Peptidy CART by tak mohly sloužit jako tumorové markery pankreatu, jejich role však nebyla zatím zcela objasněna [56].

U potkaních modelů s diabetem druhého typu je jejich exprese v β -buňkách zvýšena. Peptidy CART inhibují sekreci inzulínu stimulovanou účinkem glukózy a zároveň se zvyšuje sekrece inzulínu po stimulu cAMP. Ukazuje se, že peptidy CART jsou důležitými regulátory pankreatu, protože mutace jejich genu vede k rozvoji diabetu druhého typu u lidí a dysfunkci pankreatu u myší [58].

1.1.4.5 Úloha peptidů CART v hypotalamo-hypofýzo-adrenální ose

Hypotalamo-hypofýzo-adrenální osa (HPA), jak je znázorněna na následující straně na obr. 4, je důležitou součástí neuroendokrinního systému, řídí a reguluje reakce organismu na stres a mnoho dalších tělesných pochodů, například trávení, imunitní systém, emoční stavy, sexualitu a hospodaření organismu s energií. Hlavním centrem je hypotalamus, který je řízen limbickým systémem, a který syntetizuje a produkuje kortikoliberin (CRH). CRH stimuluje sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH) v adenohypofýze (předním laloku hypofýzy) a ten aktivuje třetí část této osy, kůru nadledvin a stimuluje tak tvorbu mineralokortikoidů, glukokortikoidů a androgenů [59]. Významným hormonem, který řadíme mezi glukokortikoidy, je právě kortizol nebo kortikosteron.

Peptidy CART se účastní všech úrovní této osy. Stimulují CRH, ACTH i sekreci kortizolu a zároveň CRH a glukokortikoidy zvyšují transkripční aktivitu genu pro CART [60]. Adrenalektomie (odnětí nadledvin) snižuje koncentraci CART mRNA a peptidů CART jak v PVN a v ARC v hypotalamu, tak i v krvi. Podání kortizolu pak částečně vrací hladiny CART do stavu před adrenalektomií [60]. Účast peptidů CART na všech úrovních této osy signalizuje jejich vliv v regulaci odpovědi organismu na stres [60]. HPA osa je také pojítkem mezi faktory ovlivňujícími fyziologické pochody jakými je příjem potravy, drogová závislost a reakce na stres [60].



Obr. 4 Úloha peptidů CART v hypothalamo-hypofýzo-adrenální ose [61]

Peptidy CART se účastní všech úrovní hypothalamo-hypofýzární osy, mají vliv na uvolňování kortikoliberinu (CRH), adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a také na uvolňování kortizolu

1.1.4.6 Úloha peptidů CART v hypothalamo-hypofýzo-tyroidální ose

Hypothalamo-hypofýzo-tyroidální (HPT) osa je stejně jako HPA osa součástí neuroendokrinního systému a podílí se na regulaci metabolismu. Účastní se jí hypothalamus, který produkuje tyroliberin (TRH), adenohipofýza a štítná žláza. Adenohipofýza produkuje krom jiných peptid prolaktin a glykoprotein tyrotropin (TSH). Prolaktin je pak hormonem zprostředkovávajícím přímo fyziologické funkce, TSH působí ve štítné žláze a výsledkem tohoto působení je stimulace tyroxinu [59].

Peptidy CART se podílí na regulaci hypothalamo-hypofýzo-tyroidální osy [12, 21]. Vztah TRH a peptidů CART je dán společnou lokalizací jejich neuronů v PVN hypothalamu [12]. Inervace TRH neuronů CART neurony probíhá ze dvou zdrojů, jednak ze společné lokalizace peptidů CART a dalšího anorexigenního peptidu hormonu stimulačního

α -melanocyty (α -MSH) a jednak z CART neuronů v oblasti prodloužené míchy [12]. Peptidy CART nemají přímý vliv na sekreci tyrotropinu (TSH) ani na sekreci prolaktinu z buněk adenohypofýzy [21]. Peptidy CART inhibují stimulační účinek TRH na sekreci prolaktinu, nemají však vliv na zvýšení hladiny TSH po stimulu TRH. Společná sekrece TRH a CART do hypofyzárního oběhu může znamenat, že peptidy CART se podílí na účinku TRH v hypofýze [12].

Hladovění a periferně podaný leptin v HPA ose mohou aktivovat CART neurony v nucleu arcuatu, které jsou na leptin citlivé, zatímco vystavení organismu chladu (jeden z možných stresorů) aktivuje CART neurony v oblasti prodloužené míchy [12].

1.1.4.7 Úloha peptidů CART v sympato-adrenálním systému

Pod periferní nervový systém se řadí nervy vegetativní a somatické. Vegetativní nervstvo zahrnuje parasimpatikus a sympatikus, jež řídí dřeň nadledvin, pankreas nebo se přímo účastní regulace fyziologických procesů. Sympato-adrenální osa (SAM) zahrnuje sympatické nervy (vedoucí z mozku), které inervují dřeň nadledvin. Dřeň nadledvin tvoří chromafinní buňky a ty jsou hlavním producentem neurotransmiterů typu katecholaminů - adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu [59].

Na základě imunohistochemie byla zjištěna spjitost peptidů CART s SAM osou, neboť CART imunoreaktivní neurony byly uspořádány po celé délce této osy [22], ať už se jedná o preganglionické neurony sympatiku (nikoliv parasympatiku), které inervují postganglionické neurony v paravertebrálních a prevertebrálních gangliích sympatiku, tak také o lokalizaci peptidů CART v dřeni nadledvin [22]. CART neurony jsou spojeny s neurony ARC, nucleu retrochiasmaticu a s neurony medulla rostralis venrolateralis. Peptidy CART tak mohou přímo aktivovat neurony po celé SAM ose.

Naší skupinou byla publikována specifická vazba 125 I-CART(61-102) k feochromocytomálním buňkám PC12, jak k nediferencovaným tak i k diferencovaným v neurální fenotyp a buněčným membránám PC12 [62]. Jednalo se o buněčnou linii, jež byla získána z potkaního feochromocytomu, nádoru dřene nadledvin.

Peptidy CART zesilují účinek glutamátu na NDMA ionotropních receptorech. Mohou tak tedy i nepřímě aktivovat neurony po celé SAM ose [22]. Aktivace SAM osy peptidy CART potvrdila i studie, kdy potkanům a králíkům ICV, intracisternální a intratekální (do hrudní páteře) podání peptidu CART zvýšilo krevní tlak, srdeční tep a plazmatickou koncentraci adrenalinu a noradrenalinu [22].

1.1.4.8 Shrnutí fyziologických účinků

Pochopení mechanismu účinku těchto peptidů přispívá k pochopení celé řady metabolických a endokrinních dějů. Z anorexigenní aktivity peptidů CART vyplývá, že by mohly sloužit jako potenciální antiobezitní léky, jak bylo popsáno v kapitole týkající se regulace příjmu potravy [49].

Ať už by byly fyziologické účinky těchto peptidů využívány jakkoliv, je nezbytné znát receptor/receptory pro tyto peptidy, proto se této oblasti výzkumu věnuje velké úsilí, nicméně dosud nebyla publikována žádná identifikace a charakterizace receptoru/ů pro tyto peptidy.

1.1.5. Fragmenty peptidů CART

Nejvíce studovanými fragmenty jsou CART(55-102) a CART(61-102). Dalším popsaným biologicky aktivním peptidem je CART(54-102/41-89) [3]. Fragment peptidu CART(61-102) není přirozeně se vyskytujícím fragmentem, nicméně je komerčně dostupný a je lépe přístupný pro radioaktivní značení jódem.

Prohormon konvertáza PC1/3 štěpí propeptid na intermediáty CART(33-102) a CART(10-89) [7]. V klasické práci Thima a kol. CART(54-102), (55-102), (61-102) a (62-102) po ICV podání hladovým myším inhibovaly příjem potravy téměř stejně [3], CART(55-102) byl mírně účinnější než ostatní peptidy [8]. Možné rozdíly v jejich aktivitě a v účinku mohou být přičítány skutečnosti, že peptidu CART(62-102) chybí flexibilní N-koncová část, kterou má peptid CART(55-102) [63], přesto se rozdíly v jednotlivých pokusech liší.

CART(1-26) a CART(1-27) jsou N-koncové fragmenty CART(1-102), nevykazují biologickou aktivitu a slouží jako negativní kontrola při pokusech s peptidem CART(55-102) [15]. Dále se podařilo izolovat v periférii delší formy peptidů CART, konkrétně CART(1-89) a (10-89) a to z nadledvin [15]. CART(10-89) inhiboval příjem potravy u myši po ICV podání [63].

CART(55-76) představuje N-koncovou část peptidu CART(55-102) a CART(62-76) N-koncovou část peptidu CART(62-102). V práci Kaska a kol. [64] oba tyto fragmenty snižovaly příjem potravy potkanů po ICV podání a to potvrdila i práce Lamberta a kol. [26].

Dylag a kol. [63] syntetizoval C-koncové deriváty CART(55-102) s redukovanými thiolovými skupinami, jeden byl lineární a druhý cyklický. Lineární fragment CART(85-102) byl schopen inhibovat lokomoční aktivitu (zvýšenou schopnost pohybu) vyvolanou po ICV podání morfinu myším [63]. Je známo, že přirozeně se vyskytující CART(55-102) snižuje lokomoci po podání kokainu a amfetaminu do nucleu accumbens potkanů [65, 66]. Ovšem srovnání těchto dvou studií je velmi komplikované, neboť se porovnává účinnost peptidů, které byly zkoumány na jiných zvířecích druzích, navíc po podání do odlišných mozkových oblastí.

V roce 2007 byla provedena strukturně-aktivitní studie na našem oddělení [67] mapující jednotlivé strukturní úseky biologicky aktivních peptidů CART s cílem najít minimální strukturu, která by si zachovala plnou biologickou aktivitu [67]. Tato publikace popisovala syntézu jednotlivých fragmentů a jejich schopnost vytěšňovat vazbu ^{125}I -CART(61-102) k buňkám PC12, ve kterých byla dříve změřena vazba tohoto peptidu [62]. Fragменты peptidu CART byly syntetizovány tak, aby odpovídaly strukturním smyčkám mezi jednotlivými cysteiny.

Fragменты kopírující aminokyselinovou sekvenci CART(61-102) mezi disulfidickými můstky (obr. 1), kde cysteiny byly nahrazeny glycinem, nebyly účinné v rozmezí testovaných koncentrací (10^{-4} až 10^{-10} M). Opět byl syntetizován lineární fragment CART(62-76) s volnými cysteiny a jeho derivát, který měl cysteiny v pozici 68 a 74 chráněny amidem kyseliny octové byly odvozeny od fragmentu CART(62-76), viz výše [26, 64]. Linearita fragmentu v naší práci byla potvrzena hmotnostní spektrometrií [67]. Žádný z nich se k nediferencovaným ani diferencovaným buňkám PC12 a membránám nevázal [67].

Analogy CART(74-86) a CART(62-86) obsahující disulfidické můstky mezi cysteiny v pozici 74-86 nebo 68-86 vykazovaly slabou afinitu k buňkám PC12 [67].

V naší strukturně-aktivitní studii byly podle práce Dylaga a kol. [63] znovu syntetizovány C-koncové deriváty peptidu CART(61-102), lineární a cyklický CART(85-102). Byla ověřena jejich vazebná afinita k buňkám PC12 a jejich linearita kontrolována během vazebného experimentu pomocí hmotnostní spektrometrie [67]. Žádný z těchto dvou fragmentů nevytěšňoval vazbu ^{125}I -CART(61-102) u PC12 ani v koncentraci 10^{-4} M a nebyly schopné potlačit příjem potravy u hladových myší [67].

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

smyčkou molekuly spíše než s C-koncovou a pro zachování vysoké vazebné afinity k buňkám PC12 a buněčným membránám je **nezbytná kompaktní struktura peptidu s třemi disulfidickými můstky** [67].

1.2. RECEPTOR PRO CART A BUNĚČNÁ SIGNALIZACE

Je zřejmé, že k úplnému pochopení mechanismu účinku peptidů CART je zapotřebí identifikace jejich receptoru/ů a zjištění signalizace peptidů do buňky. Ačkoliv identifikace a charakterizace receptoru pro peptidy CART je středem pozornosti řady laboratoří na celém světě a tomuto tématu se věnuje nemalé úsilí, dosud nebyl tento receptor identifikován. K identifikaci receptoru je nutné najít jeho zdroj, to je tkáň nebo buněčnou linii, k níž se peptidy CART specificky váží, a k tomu slouží vazebné studie, jež jsou jedním z prvních přístupů k hledání receptorové molekuly. Kromě toho je důležité zjistit signální dráhu, která je s receptorem spojena.

1.2.1. Buněčné signalizace peptidů CART

Ačkoliv se zpočátku nedařilo najít tkáň či buněčnou linii, ve které by byla pozorována specifická vazba peptidů CART k receptoru, byla publikována celá řada experimentů, která přítomnost receptoru pro peptidy CART dokazovala.

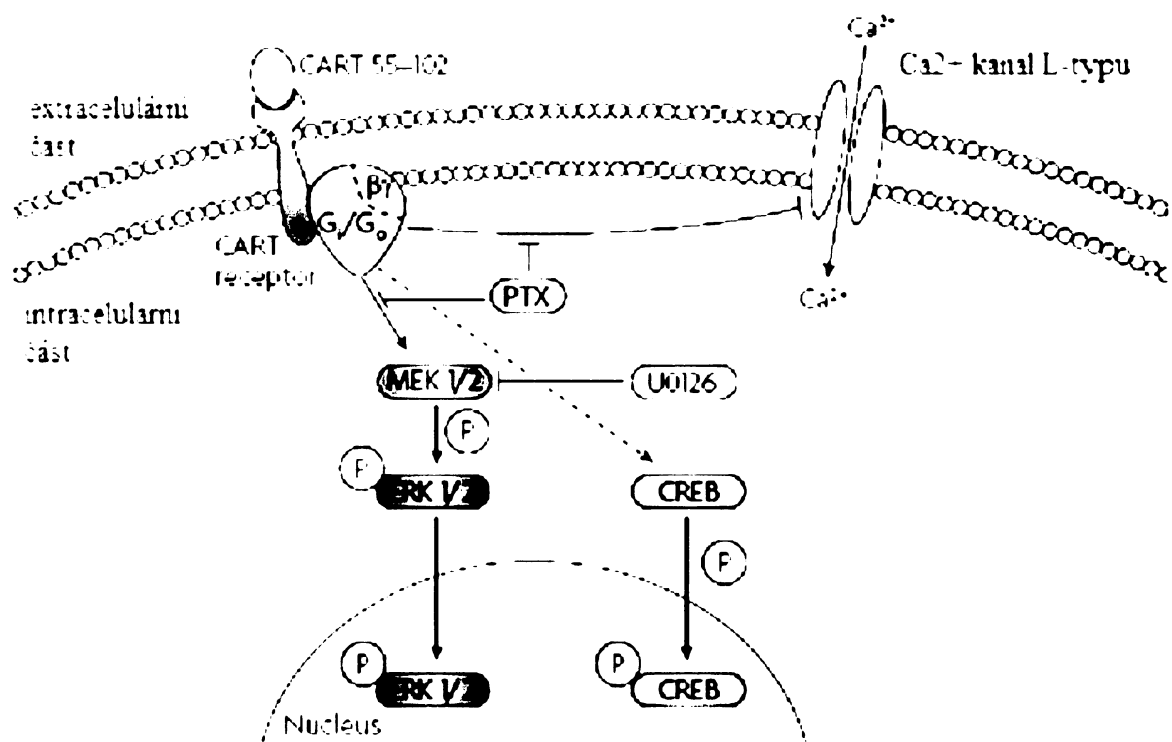
Například se zjistilo, že podání peptidů CART do mozku zvyšuje hladiny mRNA proteinu c-Fos, který je nepřímým indikátorem aktivity neuronů v mozku [37].

Obr. 5 na str. 23 shrnuje současné poznatky o buněčné signalizaci peptidu CART [48]. Zjistilo se, že peptid CART(55-102) inhiboval aktivitu vápenatých kanálů v neuronech hippocampu a to přes pertussis toxin, který katalyzuje ADP-ribosylaci G proteinů a tím zabraňuje jejich interakci s receptory spřaženými s G-proteiny (GPCR) [68]. Citlivost na pertussis toxin poukazuje na to, že inhibice vápenatých kanálů a následně snížení koncentrace vápenatých iontů peptidem CART(55-102) může být zprostředkována přes Gi/Go proteiny, které inhibují vápenaté kanály L-typu v některých buňkách [68]. Naznačený mechanismus je patrný z obr. 5 na str. 23.

V některých neuronech hypotalamu (neurony CRH) hladových a sytých potkanů vedlo podání peptidů CART do mozku k fosforylaci CREB [69], opět lze vidět na obr. 5 na str. 23.

Lakatos a kol. zveřejnili studii, ve které pozorovali signalizaci peptidu CART(55-102) do buněk hypofyzární buněčné linie (AtT20), buněčné linie dřene nadledvin (PC12), buněčné linii z lidských zárodečných buněk ledvin (HEK239) a buněčné linie připravené z myšního neuroblastomu (N2a). Časově i koncentračně závislá fosforylace MAP kinázy (ERK1/2) byla pozorována u hypofyzární buněčné linie AtT20 [70]. Dále bylo v této studii použito několik inhibitorů signální dráhy GPCR a receptor tyrosin kináz (RTK). Pertussis toxin na rozdíl od genisteinu (inhibitor RTK) tuto fosforylaci snižoval. Účinek peptidu CART(55-102) na fosforylaci MAPK byl také potlačen inhibitorem kináz MEK1 a MEK2, U0126 [70]. Naznačený mechanismus je patrný z obr. 5 na následující straně.

V poslední dosud publikované studii zabývající se vlivem peptidů CART na chování a lokomoční aktivitu bylo pozorováno, že fosforylace ERK1/2 vyvolaná kokainem byla inhibována peptidem CART(55-102) v tkáni připravené z nucleu accumbens. To vedlo k závěru, že působení kokainu v ACB může peptid CART(55-102) kompenzovat a tato regulace je zprostředkována inhibicí fosforylace ERK1/2 [71].



Obr. 5 Navržené signální dráhy pro peptid CART, upraveno dle [48]

Shrnutí ze studií zabývajících se buněčnou signalizací, ve kterých peptidy CART aktivovaly nejméně 3 signální mechanismy. CART(55-102) inhiboval vápenaté kanály L-typu přes pertussis toxin (zabraňuje interakci G proteinů s GPCR) v neuronech hippocampu [68]. CART(55-102) aktivoval fosforylaci proteinu CREB v jádru neuronů produkující CRH v hypothalamu u sytých a hladových myši [69]. CART(55-102) aktivoval fosforylaci extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) v linii hypofyzárních buněk AtT20 a tento efekt byl blokován U0126 (inhibitorem kinázy MEK1/2) a pertussis toxinem [70]. Přerušovaná šipka naznačuje, že u tohoto mechanismu není známo, zda je zprostředkován přes G proteiny. Hypotetický receptor pro peptid CART je zde znázorněn modře jako integrální membránový protein.

1.2.2. Vazebné studie s peptidy CART

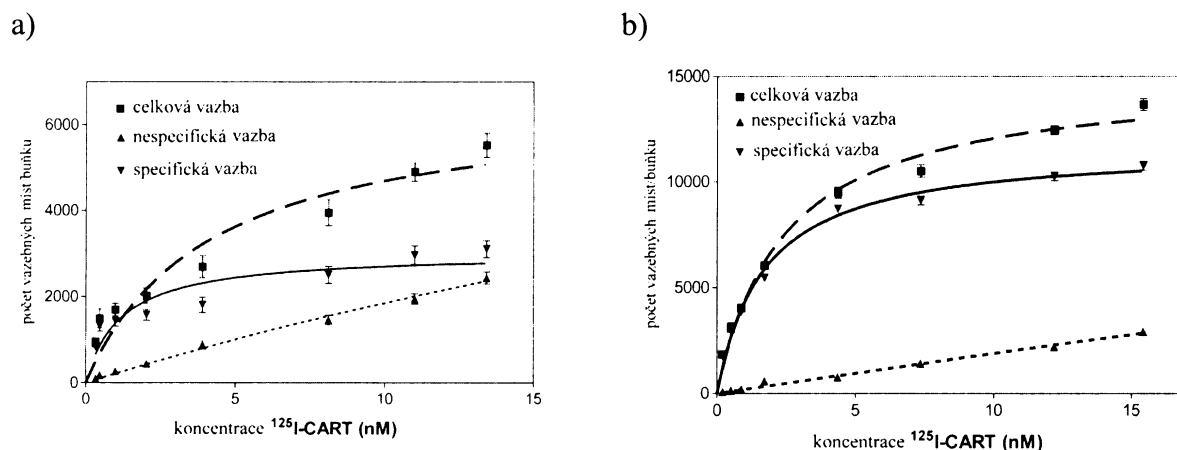
Vazebné studie obvykle vyžadujú splnení nasledujúcich obecných podmienok [72]:

- Vazba ligandu s receptorem vykazuje vysokou afinitu
- Schopnosť saturácie receptora ligandom
- Špecifickosť

Dosud boli publikované tieto vazebné štúdie:

1. Špecifická väzba ^{125}I -CART(61-102) k bunkám hypofyzárnej nádorovej bunkovej línie AtT20 [73, 74]. U tejto hypofyzárnej bunkovej línie bola dříve pozorovaná bunková signalizácia peptidu CART(55-102), viz str. 22 [70]. Počet vazebných miest B_{\max} u saturačných vazebných experimentů činil $101,4 \pm 8,8$ vazebných miest/bunku. Rovnovážná disociačná konštanta K_d určená ze saturačných vazebných pokusů činila $21,9 \pm 8$ pM [73, 74].
2. Väzba fúzného proteínu, skládajúceho sa z peptidu CART(55-102) a zeleného fluorescenčného proteínu GFP (green fluorescent protein), k disociovaným bunkám hypotalamu a hepatocytárnej bunkovej línie HepG2 [75]. ICV podání komplexu peptidu CART(55-102) s GFP myšim významne potlačoval príjem potravy, jeho biologická aktivita zůstala zachovaná.
3. Špecifická väzba ^{125}I -CART(61-102) k feochromocytomálnym bunkám PC12, jak k nediferencovaným, tak i k diferencovaným v neurálnej fenotyp a bunkovým membránam z týchto buněk [62]. V našej skupine boli kompetitívne vazebné experimenty provedeny s ^{125}I -CART(61-102), ktorý bol vytěšňovaný peptidom CART(61-102), CART(55-102) a di-jodovaným peptidom I_2 -CART(61-102) u nediferencovaných buněk PC12 a membrán z týchto buněk a to s rovnovážnou disociačnou konstantou inhibujúceho kompetitoru K_i v nízkej nM rozmezí [62]. Biologická aktivita CART(61-102) zůstala zachovaná po jeho jodácii na di-jodovaný I_2 -CART(61-102) [62]. Počet vazebných miest B_{\max} u saturačných vazebných experimentů nediferencovaných buněk činil 2228 ± 529 vazebných miest/bunku a pro diferencované byl B_{\max} dokonca 5 krát vyšší a to 11194 ± 261 vazebných miest/bunku. Rovnovážná disociačná konštanta K_d , určená ze saturačných vazebných pokusů pro nediferencované PC12 buněk činila 0,48 nM. Pro diferencované buněk měla K_d hodnotu 1,90 nM [62].

Výsledné saturační křivky pro diferencované a nediferencované buňky PC12 lze vidět na obr. 6. Detekce vazebných míst pro peptid CART v diferencovaných a nediferencovaných buňkách PC12 ukazuje na možnou roli tohoto peptidu v SAM ose.



Obr. 6 Saturační vazba ^{125}I -CART(61-102) k nediferencovaným a diferencovaným buňkám PC12 [62]

Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ^{125}I -CART(61-102) v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) $2 \cdot 10^{-6}$ M CART(61-102) při 37°C 30 minut. Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby. Saturační vazebné křivky byly vypočítány metodou nelineární regrese pro a) nediferencované PC12 a b) buňky PC12 diferencované pomocí nervového růstového faktoru (nerve growth factor, NGF) v neurony.

4. Vazba peptidu ^{125}I -CART(61-102) k primární buněčné linii připravené z potkaního nucleu accumbens [76]. Rovnovážná disociační konstanta K_d , určená ze saturačních vazebných pokusů činila $1,43 \pm 0,25$ nM a počet vazebných míst B_{max} u saturačních vazebných experimentů činil $49,03 \pm 2,33$ vazebných míst/buňku. Afinita peptidu k receptoru byla snížena v přítomnosti analogů GTP, narozdíl od analogů ATP, které neměly na afinitu vliv. Toto zjištění může také poukazovat na to, že receptor pro CART je ze skupiny receptorů GPCR [76].

Je možné, že existuje více druhů receptorů pro CART, neboť dva biologicky aktivní fragmenty CART(55-102) a CART(62-102) vykazují odlišné biologické aktivity [43, 51, 74].

Byla provedena studie [73], ve které bylo zjištěno, že ^{125}I -CART(61-102) se neváže k řadě z dosud známých receptorů, například opioidním receptorům, receptorům pro

somatostatin, progesteron, cholecystokinin, NPY, oxytocin, TRH a dalším. Také v naší vazebné studii [62] s buněčnou linií PC12 ^{125}I -CART(61-102) nebyl vytěsněn řadou peptidů, např. cholecystokininem, α -MSH, TRH, angiotenzinem II, neurotenzinem, leptinem atd. a z toho lze usoudit, že hledaný receptor pro peptidy CART je patrně unikátní.

Nalezení receptoru je naprosto klíčové pro další výzkum a využití biologických vlastností peptidů CART, jak byly zmíněny výše.

1.3. BUNĚČNÁ LINIE - FEOCHROMOCYTOMÁLNÍ BUŇKY PC12

1.3.1. Původ

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

1.3.2. Charakteristika buněčné linie PC12

PC12 buňky mají morfologické a cytochemické vlastnosti podobné vlastnostem normálních chromafinních buněk a lidskému feochromocytomu. Buňky jsou schopné syntetizovat a ukládat neurotransmitery typu katecholaminu, tedy dopamin a noradrenalin, ne však adrenalin [77].

Nediferencované buňky jsou kulovitěho tvaru, působením NGF se buňky PC12 přestávají dělit, zastavují svůj růst, vytvářejí nervové výběžky axony a tedy nervovou síť [77]. Dále jsou více citlivé na působení acetylcholinu a mají zvýšené množství vápenatých kanálů [77]. Tato diferenciaci je reverzibilní, neboť po odebrání NGF buňky do 24 hodin ukončují proces diferenciaci a do 72 hodin se začínají opět dělit a vracet se ke svým původním vlastnostem [77]. Diferencované buňky vytvářejí shluky 30 až 120 nm dlouhých granulí a 30 až 70 nm dlouhých váčků (vezikul), které se podobají granulím a váčkům v neuronech, uvolňujících adrenalin a acetylcholin.

Diferenciaci této buněčné linie v neurální fenotyp lze docílit i použitím peptidu PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) [78]. Působením syntetického glukokortikoidu dexamethasonu vyžívají buňky PC12 v typický fenotyp normálních

dřeňových chromafinních buněk, které vykazují zvýšenou aktivitu tyrosin hydroxylázy [79].

Buněčná linie PC12 slouží jako modelový systém pro studium signalizačních kaskád [79]. Mechanismus diferenciaci v neurální fenotyp dosažené užitím NGF a užitím PACAP není stejný. Přesto, že oba využívají cestu přes MAPK kinázu, PACAP na rozdíl od NGF nepotřebuje ke své signalizaci protein Ras [78]. To vedlo ke zjištění, že ač je výsledkem stejná diferenciaci a podobná signální dráha a PACAP i NGF sdílejí část stejných signálních komponent, mohou se opírat i o jiné signální molekuly [78]. Buněčná linie PC12 je díky svým vlastnostem zvláště vhodná pro studium řady problematik v oblasti neurobiologie a neurochemie.

1.4. PŘÍSTUPY K HLEDÁNÍ VAZEBNÉHO MÍSTA PRO PEPTIDY CART

- Prvním krokem při hledání vazebného místa jsou vazebné studie, při kterých se měří afinita značených peptidů (např. radioaktivně, fluorescenčně, biotinem) k buněčné linii nebo tkáním zvířat za stále stejných podmínek a za rovnovážného stavu.
- Vazebný komplex značeného peptidu a vazebného místa je nestabilní, metodou síťování lze spojit dvě nebo více molekul chemickou kovalentní vazbou pomocí síťovacích činidel, která mohou být bifunkční nebo trifunkční, a která mají rozdílnou délku raménka.
- Takto zesíťovaný komplex vazebného místa se značeným peptidem pomocí vhodného síťovacího činidla lze rozdělit od ostatních proteinů elektroforeticky na SDS-polyakrylamidovém gelu. Výhodou např. radioaktivního značení může být to, že komplex vazebného místa s radioaktivně značeným peptidem lze po provedení elektroforézy detekovat autoradiograficky, přičemž lze sledovat i výtěžek dané reakce.
- Komplex vazebného místa se značeným peptidem lze izolovat z gelu, štěpit trypsinem nebo chymotrypsinem a takovéto štěpy lze identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie.

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Charakterizace vazebného místa pro peptid CART(61-102) v buněčné linii PC12, konkrétně tedy:

- **Radioaktivní, fluorescenční a biotinylační značení peptidu CART a vazba těchto analogů k feochromocytomálním buňkám PC12.**
- **Zesíťování vazebného místa s peptidem CART pomocí 5 různých síťovacích činidel na membránách z nediferencovaných buněk PC12 a celých nediferencovaných buňkách PC12 a následná detekce zesíťovaného komplexu vazebného místa s peptidem CART.**
- **Buněčná signalizace peptidu CART v nediferencovaných buňkách PC12.**

3. MATERIÁL

Buněčná linie PC12	Manassas, VA, USA
BSA	Serva, Heidelberg, Německo
Běžné chemikálie	Sigma, St. Louis, MO, USA
BODIPY (viz str. 32)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
CART(54-102), (61-102)	Novo Nordisk, Kodaň, Dánsko
Destičky (24-jamkové)	Nuclon, NUNC, Roskilde, Dánsko
Femto Pierce SuperSignal	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Filtry GF/C	Whatman, Maidstone, Velká Británie
Fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	
myší mAB	Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA
Fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	
myší mAB AlexaFluor	Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA
fosforylovaná MAPK (ERK2)	Cell signalling Technology, Beverly, MA, USA
Iodo-Gen	Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA
Protimyší IgG peroxidázový konjugát	Sigma, St. Louis, MO, USA
Na(¹²⁵ I)	MP Biomedicals, Illkirch, Francie
NGF	Sigma, St. Louis, MO, USA
PEI	Sigma, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640	Sigma, St. Louis, MO, USA
SDS-PAGE elektroforéza	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Sít'ovací činidla	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Standard dual color	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

4. METODY

4.1. PEPTIDY CART A JEJICH ZNAČENÍ

4.1.1. Peptidy

Peptid CART(61-102) a peptid CART(54-102) byly darovány farmaceutickou firmou Novo Nordisk (Kodaň, Dánsko).

4.1.2. Jodace CART (61-102)

CART(61-102) byl podle instrukcí výrobce jodován s Na^{125}I (MP Biomedicals, Illkirch, Francie) s použitím Iodo-Gen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) [80] v 0,1 M sodnofosfátovém pufru o pH 7,2, obsahující 0,15 M NaCl. Jodace probíhala 15 minut při laboratorní teplotě v laboratoři Radioizotopy, ÚOCHB, v.v.i., AVČR Praha.

Separace nejodovaného, mono-jodovaného a di-jodovaného peptidu CART (61-102) byla provedena na RP-HPLC s použitím kolony Luna 3 μ fenyl-hexyl 150x4.6mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) a 20 až 25 % gradientu acetonitrilu ve vodě obsahující 0,1% trifluoroctovou kyselinu a to po dobu 60 minut [62]. Molekulové hmotnosti jodovaných peptidů byly měřeny na MALDI-TOF, Reflex IV hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

Mono-jodovaný ^{125}I -CART(61-102) byl uchován v alikvotech při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a spotřebován pro vazebné experimenty a síťování do jednoho měsíce.

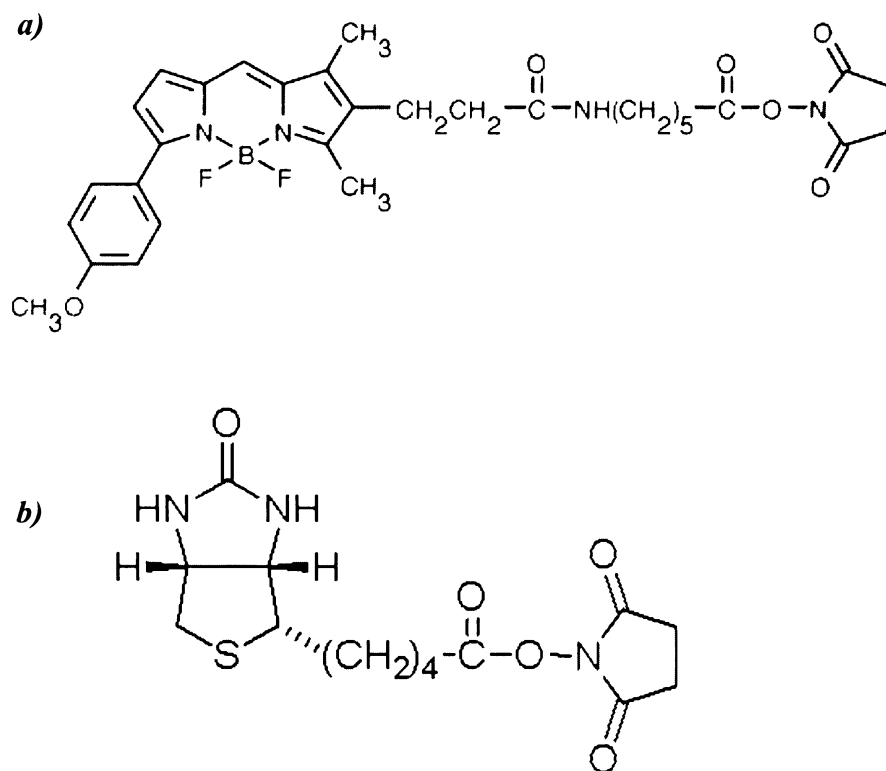
4.1.3. Biotinylace a fluorescenční značení peptidu CART (61-102)

Peptid CART(61-102) má ve své molekule 6 NH_2 skupin, které mohou být biotinylovány. K biotinylaci byl použit Biotin-NHS (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pro biotinylaci byl přidán trojnásobný přebytek biotinu. Biotinylace byla provedena ve 20 mM HEPES pufru o pH 7,4, reakce probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě za

třepání a byla ukončena přidáním 100 mM Tris/HCl o pH 7,6. Alikvoty byly uchovány při -20°C.

Při fluorescenčním značení peptidu CART(61-102) bylo použito činidlo BODIPY (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Opět byl použit trojnásobný přebytek tohoto činidla a ten byl přidán k roztoku CART (61-102). Reakce proběhla v 20 mM HEPES pufru o pH 7,4 za pokojové teploty po dobu 30 minut ve tmě a zastavena byla přidáním 100 mM Tris/HCl pufru o pH 7,6. Alikvoty byly uchovány při -20°C.

Molekulové hmotnosti značených peptidů byly měřeny a kontrola počtu navázaných skupin byla provedena na MALDI-TOF, Reflex IV hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Struktury činidel jsou znázorněny na obr. 7.



Obr. 7 Struktura a) fluorescenčního činidla BODIPY b) biotinylačního činidla biotin-NHS

4.2. BUNĚČNÁ LINIE PC12

4.2.1. Pěstování buněčné linie PC12

Potkaní feochromocytomální buňky PC12 byly zakoupeny u firmy ATCC (Manassas, VA, USA). Buňky byly vyživovány růstovým médiem RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), obsahující 10% koňského séra, 5% fetálního hovězího séra (FBS), 4,5 g/l glukózy, 1 mM pyruvátu sodného, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutaminu, 1,5 g/l uhličitanu sodného, o pH 7,4 a uchovávány v inkubátoru v atmosféře obsahující 5 % CO₂.

Pro dosažení exponenciálního růstu byla buněčná linie pasážována jednou týdně. Pro vazebné pokusy jsme použili 24-jamkové destičky (Nuclon, NUNC, Roskilde, Dánsko), potažené polyethyleniminem (PEI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) s průměrem jamky 15 mm.

Pro síťovací experimenty byly použity stejné destičky.

Vzorky pro metodu signalizace ERK v buňkách PC12 byly připraveny z lyzátu buněk, které byly napěstovány na 24-jamkových destičkách potažených PEI. Asi 16 hodin před pokusem bylo buňkám vyměněno médium se sérem za médium čisté obsahující jen 0,5% FBS.

Nediferencované buňky rostly dva dny, aby dosáhly hustoty 5×10^5 buněk na jamku (optimální hustota pro vazebné experimenty). Z nediferencovaných buněk PC12 bylo užitím NGF (50 ng/ml média) (Sigma, St. Louis, MO, USA) dosaženo diferenciac buněk v neurální síť. Médium bylo měněno vždy každý první, třetí a pátý den. Diferencované buňky byly použity sedmý den, kdy byla dosažena hustota přibližně 5×10^5 buněk na jamku destičky.

Počet buněk byl počítán před pokusem i po pokusu. Stav, kvalita a diferenciac buněk byla kontrolována před každým pokusem mikroskopicky.

4.3. KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ EXPERIMENTY

Vazebné pokusy jsou charakterizovány specifickou (B_{sp}) a nespecifickou (B_{nsp}) vazbou, jež dohromady tvoří vazebnou radioaktivitu, tedy celkové množství vázaného radioligandu B_t [72].

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

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

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

Kompetitivní vazba je založena na měření vazby při zachování jediné konstantní koncentrace radioligandu v přítomnosti různých koncentrací neznačeného ligandu, neboli kompetitoru a to při splnění rovnovážných podmínek. Kompetitivní vazbu charakterizuje celá řada konstant. IC_{50} značí koncentraci kompetitoru, při které je vytěsněna polovina radioligandu z vazebných míst. Mají-li radioligand a kompetitor stejnou afinitu, můžeme určit počet vazebných míst (B_{max}) a afinitu ligandu pro receptor, neboli rovnovážnou disociační konstantu (K_d) [72]. Bylo prokázáno, že jodace CART (61-102) nemění jeho biologickou aktivitu [62], tudíž můžeme říci, že podmínka zachování afinity je splněna.

K_i označuje rovnovážnou disociační konstantu kompetujícího ligandu a vypočte se podle rovnice *Chenga a Prusoffa* [81]:

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

kde IC_{50} je konstanta vycházející z podmínek daného pokusu, udávaná v jednotkách mol/l. V našich pokusech byla koncentrace radioligandu 0,1 nM a K_d (rovnovážná disociační konstanta radioligandu) byla použita z předchozích saturačních vazebných experimentů [62], kdy K_d pro nediferencované buňky činila $0,48 \pm 0,16$ nM a $1,90 \pm 0,27$ nM pro buňky diferencované.

4.3.1. Kompetitivní vazba na celé buňky na destičkách

Kompetitivní vazebné experimenty byly provedeny s použitím principů Motulského a Neubiga [72]. Metoda byla optimalizována dříve [62].

Byly použity následující pufrы:

- **Promývací**

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

- **Vazebný**

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

Provedení

Nejprve bylo odsáto médium ze všech jamek, dále byla každá jamka promyta 1 ml promývacího pufru o teplotě 37°C. Destičky byly inkubovány s 10^{-10} M ¹²⁵I-CART(61-102) a s fluorescenčně značeným peptidem fluoCART(61-102) nebo s biotinylovaným peptidem bioCART(61-102) nebo s peptidem CART(61-102) a nebo s peptidem CART(54-102) o koncentraci v rozmezí 10^{-11} – 10^{-6} M ve vazebném pufru o celkovém objemu 0,25 ml na jamku po 30 minut při 37°C. Po inkubaci byly buňky promyty promývacím pufrům a solubilizovány v 0,1 M NaOH po dobu 15 minut. Radioaktivita vázaná na buňky byla určena pomocí γ -čítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). Celková vazba (B_t) činila 2 až 5% z přidané radioaktivity. Nespecifická vazba (B_{nsp}) v kompetitivních vazebných experimentech činila méně než 15% celkové vazby. Pokusy byly provedeny v duplikátech alespoň třikrát pro danou látku. Všechny zkoumané peptidy byly rozpuštěny v deionizované vodě a uchovány v alikvotech zamražené předtím, než byly použity v samotném pokusu.

4.3.2. Kompetitivní vazba na buněčné membrány z nediferencovaných a diferencovaných buněk PC12

Izolace membrán z buněk PC12 diferencovaných a nediferencovaných

Byly použity následující pufrы

- **Izolační**

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

- **Homogenizační**

20 mM HEPES pufr o pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂

Provedení

Buněčné membrány nediferencovaných buněk PC12 byly izolovány z buněk zamražených při -70 °C. Při izolaci bylo nutno buňky suspendovat v 30 ml izolačního

pufru, homogenizovat pomocí skleněného homogenizátoru s teflonovým dříkem 30 sekund 10 krát, poté byla suspenze zředěna na 60 ml izolačním pufrem a opět homogenizována 30 sekund 6 krát. Centrifugace proběhla nejprve na centrifuze Jouan (Jouan centrifuge C3i/CR 3 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) při 1000 x g po dobu 10 minut při 4°C. Supernatant byl pak dále zpracován na ultracentrifuze Beckmann (Optima™ L-00XP-Ultracentrifuga, typ rotoru 90-TI), po dobu 45 minut při 4 °C a 100000 x g. Sediment byl resuspendován v homogenizačním pufru a alikvoty byly uchovány při -70 °C.

Stanovení množství bílkovin

Bílkoviny byly stanoveny podle Bradfordové [82]. Odpovídající koncentrace byla odečtena z kalibrační křivky s použitím hovězího sérového albuminu (BSA). Výsledná hodnota pak byla průměrem tří koncentrací proteinu.

Kompetitivní vazebné pokusy

Kompetitivní vazebné pokusy byly provedeny s 50 µg membránových proteinů podle podmínek optimalizovaných v předchozích experimentech [62] do celkového objemu 0,25 ml/zkumavku stejně, jak bylo popsáno v odstavci pro vazbu na celé buňky na destičkách, pouze do vazebného pufru nebyla přidána glukóza. Inkubace proběhla při teplotě 37 °C 30 minut. Filtry GF/C (Whatman, Maidstone, Velká Británie) byly předem namočený v promývacím pufru, do kterého byl ještě přidán PEI (1g PEI/200 ml promývacího pufru). Vazebný pokus byl ukončen rychlou filtrací na Brandlově přístroji (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). Celková vazba činila 3 až 10 % z celkové přidané radioaktivity. Nespecifická vazba v kompetitivních vazebných experimentech činila méně jak 15% z celkové vazby. Bylo použito duplikátů a pokusy byly provedeny alespoň třikrát pro každý peptid.

4.4. ANALÝZA DAT ZÍSKANÝCH Z VAZEBNÝCH POKUSŮ A STATISTIKA

Kompetitivní vazebné křivky byly vypočteny programem Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA), byl použit model pro vazbu k jednomu vazebnému místu (hodnoty IC₅₀ byly získány metodou nelineární regrese). Inhibiční konstanty (K_i) byly

spočítány dosazením IC_{50} do rovnice Chenga a Prusoffa [81]. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru (SEM). Statistika vazebných experimentů byla prováděna v programu one-way ANOVA. Rozdíly byly považovány za významné, pokud $P < 0,05$.

4.5. METODA SÍŤOVÁNÍ POMOCÍ SÍŤOVACÍCH ČINIDEL

Metoda, při níž se dvě nebo více molekul chemicky spojí kovalentní vazbou pomocí síťovacích činidel. **Síťovací činidla** mají reaktivní konce, které se váží ke specifickým funkčním skupinám (primární aminy, sulfhydryly, atd.) na proteinech nebo jiných molekulách. Síťovací činidla také mohou sloužit ke změně molekuly nukleových kyselin, léčiv a pevných povrchů molekul [83].

Význam [83]:

- pomáhají určit protein-proteinové interakce
- pomáhají určit 3D strukturu proteinů
- imobilizace na pevné fázi
- pochopení molekulárních mechanismů v buněčných membránách
- mohou sloužit k přípravě komplexů enzym-protilátka, imunotoxinů a dalších značených proteinů

Konformační změny mohou být analyzovány před i po interakci se síťovacím činidlem. Porovnání dvou síťovacích činidel s rozdílnou délkou raménka informuje o vzdálenosti mezi interagujícími molekulami. Použití síťovacích činidel se využívá při studiu povrchu receptorů, můžeme izolovat i ligand-receptorový komplex. V tomto případě je výhodou radioaktivní či jiné značení ligand-receptorového komplexu [83].

Výběr síťovacího činidla

O výběru síťovacího činidla rozhoduje povaha chemické reakce, např. specifita pro příslušné funkční skupiny a kompatibilita reakce s činidlem. Proto je nejlepším činidlem to, které již bylo empiricky vyzkoušeno [83].

Při výběru činidla se můžeme řídit těmito charakteristikami [83]:

- chemická povaha molekuly
- délka raménka
- rozpustnost ve vodě a propustnost přes membránu
- stejné (homobifunkční) nebo různé (heterobifunkční) reaktivní skupiny
- spontánně reaktivní nebo fotoreaktivní skupiny
- schopnost štěpení
- činidlo může mít chemické skupiny, které lze značit radiotivně i jinou chemickou značkou.

Funkční skupiny jsou většinou primární aminy, sulfhydryly, karbonyly, karbohydráty, karboxylové kyseliny.

Pro intramolekulární studie se vybírají spíše činidla s krátkým raménkem, pro intermolekulární spíše s dlouhým. Kompletní informaci o vazebných interakcích zjistíme použitím kombinace síťovacích činidel [83].

Reakční podmínky [83]

- většinou se požaduje nativní struktura komplexu, proto je důležité neutrální pH
- musí být určeny molární poměry mezi činidlem a ligandem, stupeň konjugace a počet funkčních skupin
- mělo by být co nejméně dalších komponent v reakční směsi.

4.5.1. Zesíťování ^{125}I -CART(61-102) a vazebného místa

Experiment má tři části:

1. A Kompetitivní vazba na buněčných membránách z nediferencovaných buněk PC12

Kompetitivní vazebné pokusy byly provedeny se 100 μg membránových proteinů podle podmínek optimalizovaných v předchozích experimentech [62] do celkového objemu 0,5 ml/zkumavku stejně, jak bylo popsáno v odstavci pro vazbu na celé buňky na destičkách, pouze do vazebného pufru nebyla přidána glukóza. Inkubace proběhla při teplotě 37 °C 30 minut. Koncentrace radionuklidu ^{125}I -CART(61-102) byla 10^{-9} M, byla použita pouze celková a nespecifická vazba a to v duplikátech. Celková vazba činila 2 až 5% z přidané radioaktivity. Nespecifická vazba činila méně než 15 % celkové vazby. Reakce byla ukončena přidáním promývacího pufru do zkumavky s reakční směsí. Suspenze byla po ukončené vazebné reakci stočena na centrifuze Jouan T40 po dobu 10 minut při 4000 otáčkách/min (3000xg) při teplotě 4°C. Supernatant byl opatrně odsán a celý postup byl od přidání promývacího pufru opakován. Radioaktivita výsledné pelety se změřila na γ -čítači.

1. B Kompetitivní vazba na celých buňkách na destičkách

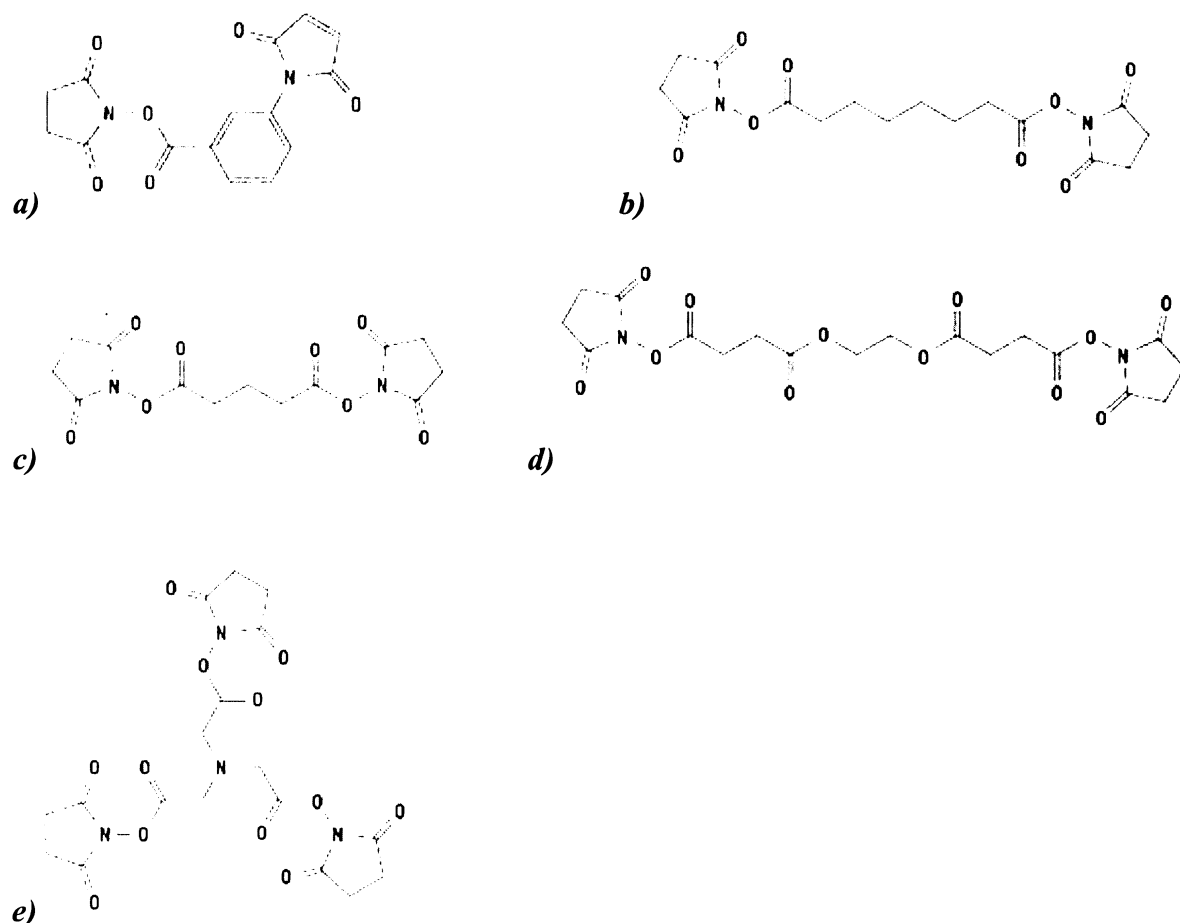
Postup byl stejný jako v odstavci pro vazbu na celé buňky na destičkách s tím rozdílem, že koncentrace radionuklidu ^{125}I -CART(61-102) byla 10^{-9} M, opět byla použita pouze celková a nespecifická vazba v duplikátech. Reakční směs byla po uplynutí doby inkubace odsáta a buňky byly třikrát promyty promývacím pufrem.

2. Proces zesíťování pomocí 5 síťovacích činidel

Síťovací činidla (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA):

- MBS (*N*-hydroxysukcinimid-3-naleimidobenzoát)
- DSS (Disukcinimidyl-suberát)
- DSG (Disukcinimidyl-glutarát)
- EGS (Ethylenglykol-bis[sukcinimidylsukcinát])
- TSAT (Tris-sukcinimidyl-aminotriacetát)

Kromě TSAT a MBS jsou všechna činidla homobifunkční, jejich reaktivní skupina je NHS-esterová. TSAT je homotrifunkční, reaktivní skupina je také NHS-esterová. MBS je heterobifunkční a využívalo jak NHS-esterovou vazbu, tak vazbu s SH skupinou síťovaného proteinu. Všechny se od sebe liší délkou raménka, jak je patrné z obr. 8.



Obr. 8 *Struktury použitých síťovacích činidel*

a) *Struktura MBS. Molekulová hmotnost 314,25; délka raménka 7,3 Å.* b) *Struktura DSS. Molekulová hmotnost 368,35; délka raménka 11,4 Å.* c) *Struktura DSG. Molekulová hmotnost 326,26; délka raménka 7,7 Å.* d) *Struktura EGS. Molekulová hmotnost 456,36; délka raménka 16,1 Å.* e) *Struktura TSAT. Molekulová hmotnost 482,36; délka raménka 4,2 Å.*

Byly použity následující pufry:

- **Sít'ovací**
20 mM HEPES pufr o pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂
- **Pufr pro ukončení reakce (STOP pufr)**
50 mM Tris/HCl pufr o pH 7,6

Komplex ¹²⁵I-CART(61-102) a vazebného místa byl inkubován s 1 mM nebo s 0,1mM příslušným sít'ovacím činidlem (rozpuštěné v dimethylsulfoxidu), a to v sít'ovacím pufru o celkovém objemu 0,5 ml v případě celých buněk na destičkách nebo o celkovém objemu 1 ml v případě buněčných membrán po dobu 30 minut při 25°C a za třepání. Tyto reakce byly ukončeny v případě celých buněk na destičkách odsátím reakční směsi a promytím třikrát 1 ml promývacího pufru a v případě buněčných membrán PC12 přidáním 1 ml stop pufru při 4°C, centrifugací a odsátím supernatantu. Radioaktivita výsledné pelety byla opět změřena na γ -čítači.

3. SDS-PAGE elektroforéza [84] zesít'ovaného komplexu ¹²⁵I-CART(61-102) a vazebného místa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Byly použity následující pufry a roztoky

- Vzorkový pufr redukující (0,5 M Tris-HCl o pH 6,8, glycerol, 10% SDS, 0,5 % bromfenolová modř, destilovaná voda, β -merkaptoethanol)
- 1,5 M Tris-HCl o pH 8,8
- 0,5 M Tris-HCl o pH 6,8
- Bis-akrylamid
- 10 % dodecylsulfát sodný (SDS)
- 10 % amonium-perchlorosíran (APS)
- N,N,N',N'-tetrametyl-1,2-diaminometan (TEMED)

3. A Celé buňky na destičkách

Po odsátí reakční směsi bylo k buňkám přidáno 30 μ l vzorkového pufru a inkubace probíhala alespoň 30 minut při pokojové teplotě v digestoři. Lyzát byl odebrán do zkumavek a do jamek bylo přidáno dalších 20 μ l redukujícího vzorkového pufru, kterými byla jamka promyta.

3. B Buněčné membrány z nediferencovaných buněk PC12

K peletě bylo přidáno 20 µl redukujícího vzorkového pufru.

Příprava vzorků

Vzorky byly po dobu 15 vteřin sonikovány a po sonikaci zahřáty na 100 °C po dobu 2 minut. Zahřáté vzorky byly dány na 5 minut do mikrocentrifugy.

Takto připravené vzorky byly nanášeny na **15% SDS-polyakrylamidový gel** v duplikátech. Pro identifikaci molekulových hmotností byl použit standard dual color (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Elektroforéza probíhala pod konstantním napětím 130 V.

Výsledné gely byly vysušeny, standard molekulových hmotností byl radioaktivně označen a radioaktivita vysušených gelů detekována na přístroji Typhoon 9410 (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

4.6. FOSFORYLACE MAPK(ERK1/2) V BUŇKÁCH PC12

MAP kinázy fosforylují substrátové proteiny a nebo se mohou translokovat do jádra a fosforylovat řadu dalších proteinů, transkripčních faktorů aj., a tím regulovat expresi důležitých proteinů.

MAP kinázová rodina bývá rozřazována do 6 skupin [85]:

- ERK (extracellular signal-regulated kinase) typu 1 a 2. ERK1/2 bývají označovány jako klasické MAP kinázy a preferenčně bývají aktivovány růstovými faktory.
- JNK (c-Jun N-terminal kinase) nebo jinak MAPK8, MAPK9, MAPK10 označují skupinu kináz aktivované stresovým podnětem (cytokiny, UV, osmotický šok atd.)
- izoformy p38, též MAPK11, MAPK12, MAPK13, MAPK14. Taktéž aktivovány stresovým stimulem.
- ERK5 neboli MAPK7, objevená nedávno. Podílí se na buněčné proliferaci a může být aktivována jak růstovými faktory, tak stresovým podnětem.
- ERK3/4 neboli MAPK6/4 jsou strukturně netypickými kinázami, ERK4 je na rozdíl od ERK3 relativně stabilní.

- ERK7/8 neboli MAPK15 je taktéž netypická MAP kináza objevená nedávno.

Podstatné je, že kinázová kaskáda umožňuje multienzymovou regulaci a amplifikaci signálu.

Molekulová hmotnost MAPK (ERK1/2) je 44/42 kD.

4.6.1. Metoda fosforylace MAPK(ERK1/2) v buňkách PC12

Byly použity následující pufrы a roztoky:

- Čisté médium RPMI 1640 s 0,5% FBS
- Promývací pufr (viz str. 34)
- Vzorkový pufr redukující (viz str. 41)
- 10^{-6} M CART(61-102) v čistém médiu RPMI 1640 s 0,5% FBS
- NGF o koncentraci 50 ng/ml v čistém médiu RPMI 1640 s 0,5% FBS
- 10^{-6} M CART(61-102) a NGF o koncentraci 50 ng/ml v čistém médiu RPMI 1640 s 0,5% FBS

Provedení

Pro tento druh pokusu bylo důležité získat co největší počet buněk na jamku. Asi 16 hodin před pokusem bylo buňkám vyměněno médium se sérem za čisté médium s 0,5% FBS, jak bylo popsáno v kapitole pěstování buněčné linie na str. 32.

Další den bylo buňkám odsáto médium. V časových intervalech bylo do každé jamky přidáno buď 250 μ l čistého média RPMI 1640 s 0,5% FBS nebo 250 μ l 10^{-6} M CART(61-102) v čistém médiu RPMI 1640 s 0,5% FBS nebo 250 μ l NGF o koncentraci 50 ng/ml v čistém médiu RPMI 1640 s 0,5% FBS nebo 250 μ l roztoku obsahující 10^{-6} M CART(61-102) a NGF o koncentraci 50 ng/ml v čistém médiu RPMI 1640 s 0,5% FBS, to vše v duplikátech. Čisté médium RPMI 1640 bylo předem temperováno na 37°C. Obsah byl zamíchán a ponechán inkubovat podle rozpisu buď 5 nebo 20 minut. Po uplynutí doby inkubace byla reakční směs odsáta a promyta 1 ml promývacího pufru o pokojové teplotě. Solubilizace byla provedena přidáním 30 μ l vzorkového pufru a toto množství bylo v jamce ponecháno ještě minimálně 15 minut a po 15 minutách po promytí 20 μ l přemístěn do ependorfeek. Vzorky byly uchovávány na ledu. Poté byly po dobu 15 vteřin sonikovány, zahřáty na 100°C po dobu 4 minut a 5 minut mikrocentrifugovány. Vzorky

byly v duplikátech nanášeny na 10% SDS-polyakrylamidový gel [84]. Na tento gel byl nanesen i standard molekulových hmotností standard dual color (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a fosforylovaná MAPK z lyzátu buněk ERK2 (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA) jako pozitivní kontrolní protein. Metoda tzv. přenosu (z angl. „blotting“) proteinu z elektroforetického gelu na nitrocelulóзовou membránu se nazývá Western blot. Po provedení elektroforézy byly výsledné proužky z gelu přeneseny na nitrocelulóзовou membránu. Přenos (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) probíhal přes noc při 4°C za konstantního napětí 30 V v přenosovém pufru obsahující 25mM Tris, 192 mM glycin, 20% v/v methanol, pH 8,3. Druhý den byly membrány detekovány pomocí protilátek proti fosforylované MAPK (ERK1/2). Buňky byly počítány před pokusem i po pokusu.

Použité roztoky pro detekci:

- **10x Tris-buffered saline (TBS) o pH 7,6**
0,2 M Tris, 1,4 M NaCl
- **Blokující pufr s 5% netučným sušeným mlékem**
1x TBS, 0,1% Tween-20, 5% netučné sušené mléko
- **Blokující pufr s 3% BSA**
1x TBS, 0,1 % Tween-20, 3% BSA
- **Vymývací pufr TBS/T**
1x TBS, 0,1% Tween-20
- **Pufr pro primární a sekundární protilátku**
1x TBS, 0,1% Tween-20, 5% netučné sušené mléko
- **Pufr pro primární protilátku fluorescenčně značenou**
1x TBS, 0,1% Tween-20, 3% BSA
- **Primární protilátky**
 - Fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší mAB (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA)
 - Fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší mAB AlexaFluor (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA), protilátka fluorescenčně značená
- **Sekundární protilátka**
Protimyší IgG peroxidázový konjugát připravený v králíku (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Detekce membrán byla provedena dvěma způsoby

A. Detekce pomocí fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší mAB a peroxidázou konjugované protimyšší protilátky

Po provedení přenosu byly nitrocelulózkové membrány promyty ve 25 ml vymývacího pufru po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Poté byly membrány inkubovány s 25 ml blokujícího pufru s 5% netučným sušeným mlékem po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po inkubaci byly 3krát po 5 minutách promyty ve vymývacím pufru. Promyté membrány byly inkubovány s primární protilátkou v poměru 1:2000 v 10 ml pufru pro primární protilátku přes noc při 4°C a za mírného míchání. Druhý den byly membrány 3krát po 5 minutách promyty ve vymývacím pufru. Promyté membrány byly inkubovány se sekundární protilátkou v poměru 1:12000 v 10 ml blokujícího pufru po dobu 1 hodiny za pokojové teploty a mírného míchání. Následně byly membrány opět promyty 3krát po 5 minutách ve vymývacím pufru. Postup byl proveden podle doporučeného protokolu firmy Cell signalling technology (Beverly MA, USA), odkud byla dodána i primární protilátka a kontrolní pozitivní protein.

Detekce pomocí protilátek byla provedena pomocí činidla Femto Pierce SuperSignal (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Chemiluminiscence byla detekována v CCD kameře LAS-3000 (Fujifilm, GeneTiCa, Praha, ČR).

B. Detekce pomocí fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší mAB AlexaFluor

Po provedení přenosu byly nitrocelulózkové membrány promyty ve 25 ml vymývacího pufru po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Poté byly membrány inkubovány s 25 ml blokujícího pufru s 3% BSA po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po inkubaci byly 3krát po 5 minutách promyty ve vymývacím pufru. Promyté membrány byly inkubovány s primární protilátkou v poměru 1:20 v 1 ml pufru pro primární protilátku 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byly membrány 3krát po 5 minutách promyty ve vymývacím pufru.

Detekce pomocí fluorescenčně značené protilátky byla provedena na přístroji Typhoon 9410 (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

5. VÝSLEDKY

5.1. ZNAČENÍ PEPTIDU CART(61-102)

5.1.1. Jodace CART(61-102)

CART(61-102) byl jodován radioaktivním izotopem na oddělení Radioizotopy, ÚOCHB, v.v.i., AVČR Praha podle rutinního postupu, jak již bylo popsáno dříve [62, 67]. Hlavní produkt jodace mono-¹²⁵I-[Met⁶⁷ sulfoxid] CART(61-102), který má stejnou afinitu k buňkám PC12 a membránám z těchto buněk jako monojodovaný ¹²⁵I-CART(61-102) [67], byl použit pro účely vazebných a síťovacích pokusů. Výchozí peptid CART(61-102) se ve směsi po proběhnutí reakce nevyskytoval.

5.1.2. Biotinylační a fluorescenční značení peptidu CART(61-102)

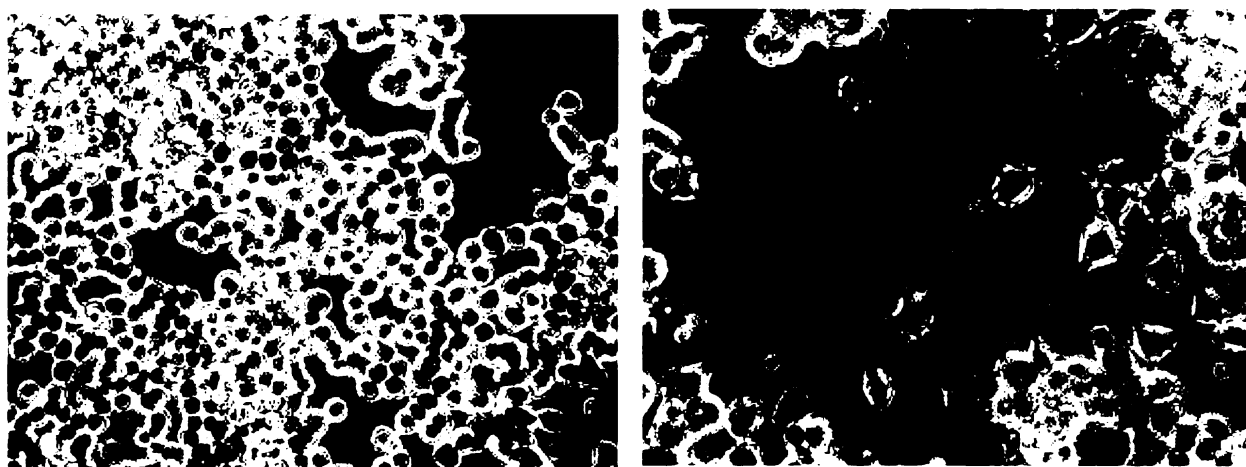
Kontrola značení peptidu CART(61-102) biotinem provedená na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF, Reflex IV ukázala, že směs peptidů CART(61-102) značených biotinem obsahovala při 3-6ti násobném přebytku biotinu 2-5 obsazených NH₂ skupin peptidu CART (molekulová hmotnost biotinu je 244).

Kontrola značení fluorescenční značkou BODIPY provedená na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF, Reflex IV ukázala, že směs peptidů CART(61-102) značených fluorescenčně obsahovala při 3 násobném přebytku pouze 1-2 obsazených NH₂ skupin peptidu CART (molekulová hmotnost fluorescenční značky BODIPY je 608,45).

5.2. BUNĚČNÁ LINIE PC12

5.2.1. Pěstování buněčné linie PC12

Buňky PC12 byly kulatého tvaru a měly tendenci tvořit shluky. Po přidání NGF tvořily axony a měnily se v neurální fenotyp. Buňky dobře přisedaly na destičky potažené PEI a pokusy byly provedeny za sterilních podmínek důležitých pro zachování buněčné linie. Obrázek 9 ukazuje buňky PC12 nediferencované a diferencované účinkem NGF v neurální fenotyp. Diferencované buňky tvoří typickou neurální síť.



(a)

(b)

Obr. 9 Buněčná linie PC12

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

5.2.2. Sklízení buněk na membrány

Nediferencované a diferencované buňky PC12 byly sbírány v delším časovém období, uchovány při -70 °C a z nich byly připraveny membrány, jak je popsáno v metodách (kap. 1.3.2).

5.3. KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ EXPERIMENTY S PEPTIDY CART

5.3.1. Kompetitivní vazba k nediferencovaným a diferencovaným buňkám PC12

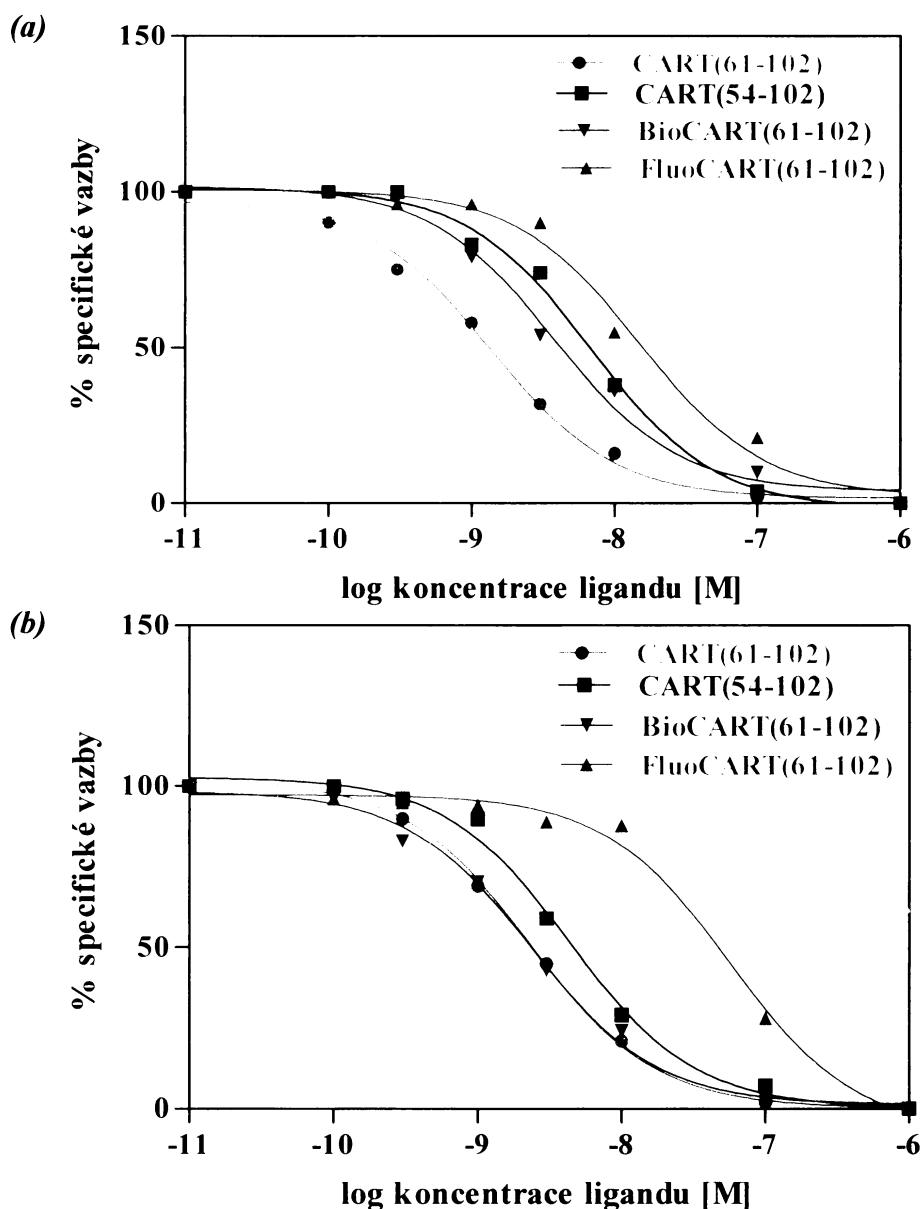
Optimalizace pro kompetitivní vazebné pokusy byla publikována již dříve [62].

Při kompetitivních vazebných pokusech byly zachovávány stále stejné podmínky, tedy inkubace po dobu 30 minut při 37 °C s 5×10^5 buněk/jamku. Vazebné křivky ^{125}I -CART(61-102) vytěšňovaného peptidy CART(61-102), CART(54-102) a modifikovanými peptidy CART k nediferencovaným a diferencovaným buňkám PC12 lze vidět v obr. 10 na následující straně.

K_i byla vypočítána podle rovnice Chenga a Prusoffa [81], kdy koncentrace radioligandu byla 0,1 nM a hodnota K_d byla použita ze saturačních vazebných experimentů [62], kdy pro nediferencované PC12 buňky byla 0,48 nM a pro diferencované PC12 buňky byla 1,90 nM.

Vytěsnění radioaktivního ^{125}I -CART(61-102) pomocí CART(61-102), CART(54-102) a značených peptidů bioCART(61-102) a fluoCART(61-102) je popsáno v tabulce 1 na straně 49. V kompetitivních vazebných pokusech u nediferencovaných buněk PC12 se CART(61-102) a CART(54-102) a bioCART(61-102) vázaly s inhibiční konstantou K_i v nízkých hodnotách v rozmezí 10^{-9} M a fluoCART(61-102) s nižší afinitou v rozmezí hodnot 10^{-9} až 10^{-8} M. FluoCART(61-102) měl statisticky sníženou afinitu vůči CART(61-102) ($p < 0,01$), statisticky sníženou afinitu vůči CART(54-102) ($p < 0,05$), statisticky sníženou afinitu vůči bioCART(61-102) ($p < 0,05$). Rozdíly v afinitě mezi CART(61-102), CART(54-102) a bioCART(61-102) nejsou statisticky významné.

Buněčná linie PC12 se po přidání NGF úspěšně diferencovala v neurální fenotyp, jak již bylo dříve popsáno [76]. CART (61-102), CART(54-102) a bioCART(61-102) se k diferencovaným buňkám vázaly s inhibiční konstantou K_i srovnatelnou s nediferencovanými buňkami, jak znázorňuje tabulka 1 na straně 49 a obr. 10 na str. 48. FluoCART(61-102) se k diferencovaným buňkám vázal s nižší afinitou v rozmezí hodnot 10^{-7} M. FluoCART(61-102) měl statisticky sníženou afinitu vůči CART(61-102), CART(54-102) a bioCART(61-102) ($p < 0,01$). Rozdíly v afinitě mezi CART(61-102), CART(54-102) a bioCART(61-102) nejsou statisticky významné.



Obr. 10 Kompetitivní vazebná křivka peptidů CART k a) nediferencovaným a b) diferencovaným buňkám PC12

a) Vytěsnění ^{125}I -CART(61-102) peptidem CART(61-102), CART(54-102) a biotinem a fluorescenčně značeným peptidem CART(61-102) (bioCART a fluoCART) v nediferencovaných buňkách PC12. (b) Vytěsnění ^{125}I -CART(61-102) peptidem CART(61-102), CART(54-102) a biotinem a fluorescenčně značeným peptidem CART(61-102) (bioCART a fluoCART) v diferencovaných buňkách PC12. Grafy jsou reprezentativními výsledky z nejméně 3 samostatných experimentů, vzorky byly měřeny vždy v duplikátech.

Tab. 1 Vytěsnění ^{125}I -CART(61-102) pomocí CART(61-102), CART(54-102) a značených peptidů bioCART(61-102) a fluoCART(61-102)

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

Peptid	K_i (mol/l)			
	Membrány z nedif. buněk PC12	Membrány z dif. buněk PC12	Nedif. buňky PC12 na destičkách	Dif. buňky PC12 na destičkách
	$(5,92 \pm 0,76)10^{-10}$	$(5,99 \pm 0,91)10^{-10}$	$(2,36 \pm 0,94)10^{-9}$	$(2,28 \pm 0,92)10^{-9}$
CART (54-102)	$(1,81 \pm 0,81)10^{-9}$	$(7,16 \pm 0,86)10^{-10}$	$(3,58 \pm 0,72)10^{-9}$	$(5,00 \pm 0,93)10^{-9}$
BioCART (61-102)	$(7,07 \pm 0,75)10^{-10}$		$(2,99 \pm 1,02)10^{-9}$	$(3,09 \pm 0,94)10^{-9}$
FluoCART (61-102)	$(1,28 \pm 0,78)10^{-8}$		$(8,44 \pm 0,76)10^{-9}$	$(4,11 \pm 1,82)10^{-7}$

5.3.2. Kompetitivní vazba k membránám z nediferencovaných a diferencovaných buněk PC12

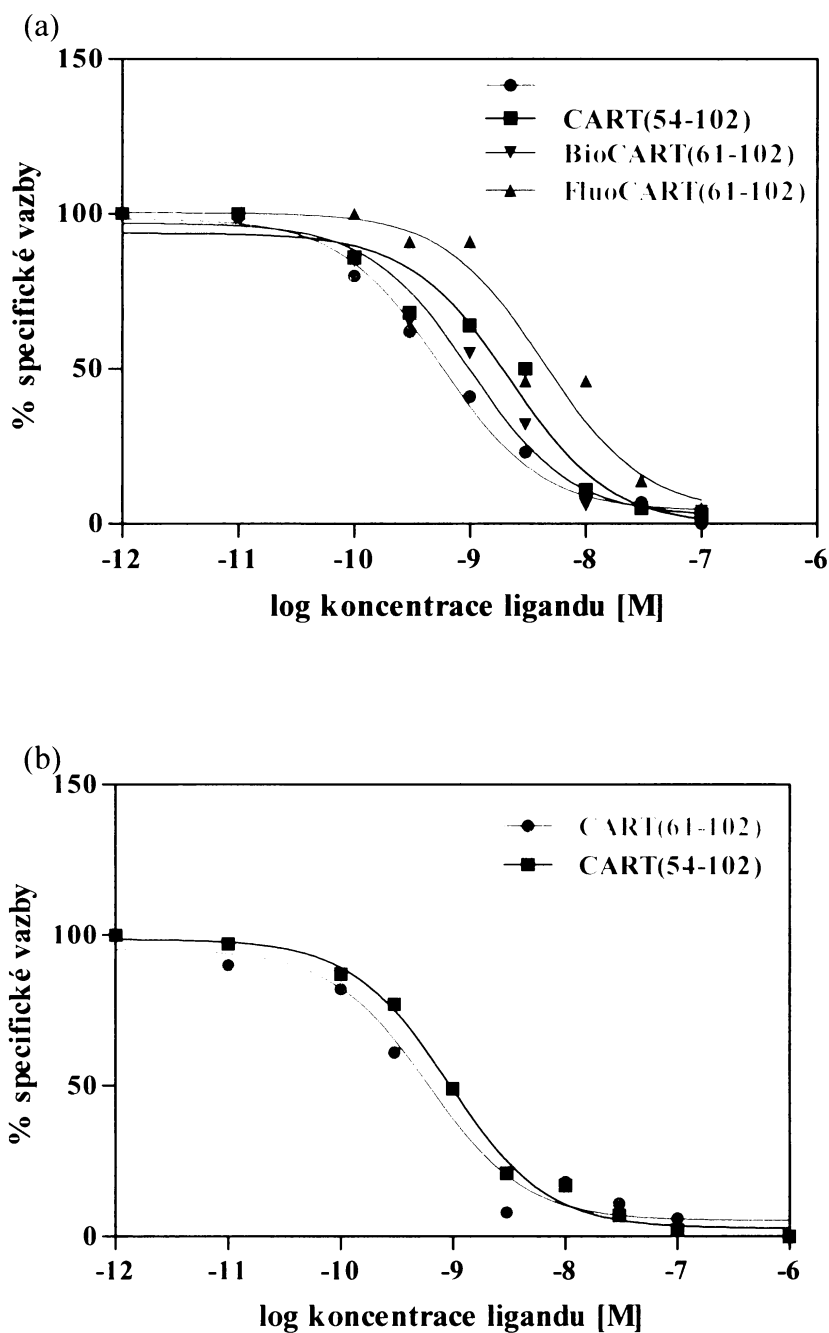
Membrány byly izolovány podle rutinního postupu, jak bylo již dříve popsáno [62]. Také optimalizace pro kompetitivní vazebné pokusy byla publikována již dříve [62].

Při kompetitivních vazebných pokusech byly zachovávány stále stejné podmínky, tedy inkubace po dobu 30 minut při 37 °C s 50 µg proteinu/zkumavku. Vazebné křivky ¹²⁵I-CART(61-102) vytěšňovaného peptidy CART(61-102), CART(54-102) a značenými peptidy CART(61-102) k membránám z nediferencovaným buněk PC12 lze vidět v obr. 11a na následující straně. Vazebné křivky ¹²⁵I-CART(61-102) vytěšňovaného peptidy CART(61-102), CART(54-102) k membránám z diferencovaným buněk PC12 lze vidět na obr. 11b na následující straně. FluoCART(61-102) a bioCART(61-102) u membrán z diferencovaných buněk PC12 nebyly testovány, neboť je velmi obtížné získat dostatečné množství membrán připravených z diferencovaných buněk PC12.

K_i byla vypočítána podle rovnice Chenga a Prusoffa [81], kdy koncentrace radioligandu byla 0,1 nM a hodnota K_d byla použita ze saturačních vazebných experimentů [62], kdy pro nediferencované PC12 buňky byla 0,48 nM a pro diferencované PC12 buňky byla 1,90 nM. U membrán z nediferencovaných buněk měl fluoCART(61-102) statisticky sníženou afinitu vůči CART(61-102) ($p < 0,001$), statisticky sníženou afinitu vůči CART(54-102) ($p < 0,01$), statisticky sníženou afinitu vůči bioCART(61-102) ($p < 0,001$). Rozdíly v afinitě mezi CART(61-102), CART(54-102) a bioCART(61-102) nejsou statisticky významné.

U membrán z diferencovaných buněk PC12 nebyly rozdíly v afinitě u CART(61-102) a CART(54-102) statisticky významné.

Vytěšnění radioaktivního ¹²⁵I-CART(61-102) pomocí CART(61-102), CART(54-102) a značených peptidů bioCART(61-102) a fluoCART(61-102) je popsáno v tabulce 1 na straně 49. V kompetitivních vazebných pokusech u membrán z nediferencovaných buněk PC12 se CART(61-102) a bioCART(61-102) vázaly s vysokou afinitou v rozmezí 10^{-10} M, CART(54-102) vázal s inhibiční konstantou K_i v nízkých hodnotách v rozmezí 10^{-9} M a fluoCART(61-102) s nižší afinitou v rozmezí 10^{-8} M. CART (61-102) a CART(54-102) se k membránám z diferencovaných buněk PC12 vázaly s inhibiční konstantou K_i srovnatelnou s membránami z nediferencovaných buněk PC12, jak znázorňuje tabulka 1 na straně 49 a obr. 10 na str. 48 a obr. 11 na str. 51.



Obr. 11 Kompetitivní vazebná křivka peptidů CART k membránám z nediferencovaných a diferencovaných buněk PC12

a) Vytěsnění ^{125}I -CART(61-102) peptidem CART(61-102), CART(54-102) a biotinem a fluorescenčně značeným peptidem CART(61-102) (bioCART a fluoCART) v membránách z nediferencovaných buněk PC12. (b) Vytěsnění ^{125}I -CART(61-102) peptidem CART(61-102), CART(54-102) v membránách z diferencovaných buněk PC12. Grafy jsou reprezentativními výsledky z nejméně 3 samostatných experimentů, vzorky byly měřeny vždy v duplikátech.

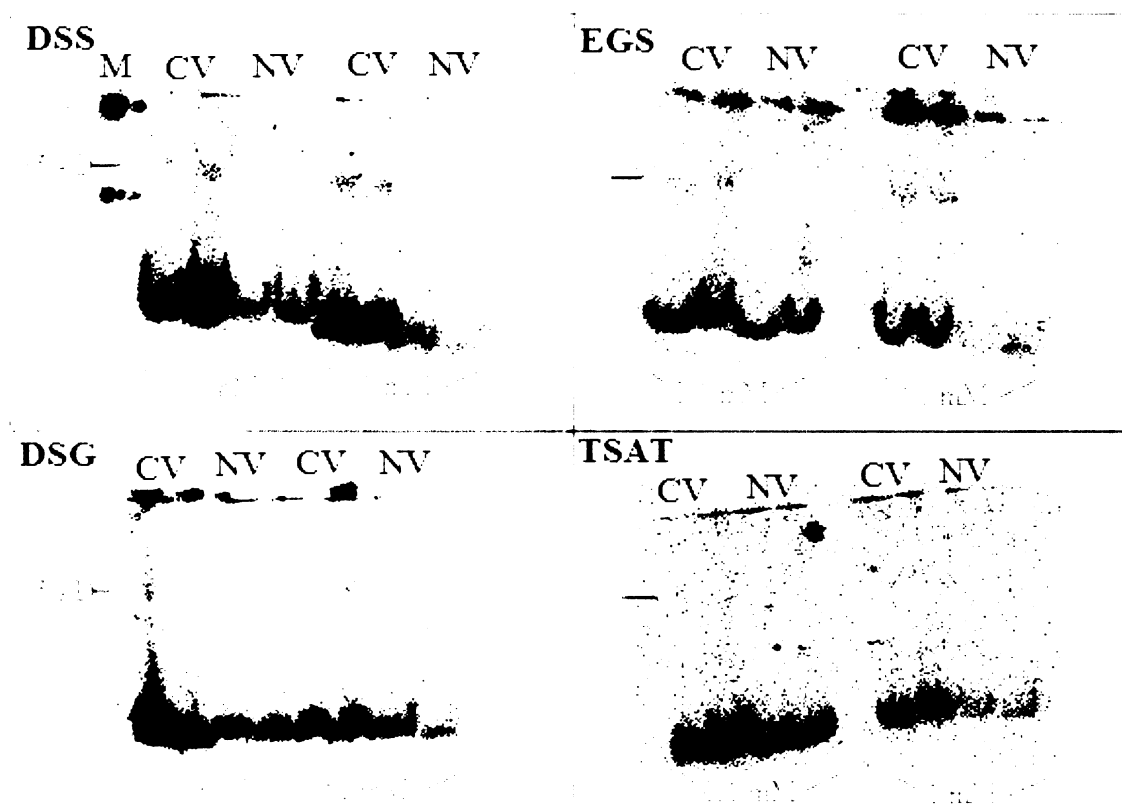
5.4. ZESÍŤOVÁNÍ ¹²⁵I-CART(61-102) A VAZEBNÉHO MÍSTA

Experimenty byly prováděny s membránami z nediferencovaných buněk a s celými nediferencovanými buňkami na destičkách.

Při vazebných pokusech byly zachovávány stále stejné podmínky, přičemž optimalizace těchto pokusů byla publikována dříve [62], viz kompetitivní vazebné experimenty. Metoda síťování byla provedena se 100 µg membránových proteinů nebo s hustotou 5.10⁵ buněk/jamku. Úspěšnost vazby peptidu ¹²⁵I-CART(61-102) k buňkám PC12 i k membránám z těchto buněk byla kontrolována během pokusu změřením radioaktivity vázané na celých buňkách či membránách z těchto buněk na γ čítači, kdy byla potvrzena celková a nespecifická vazba v přítomnosti neznačeného peptidu CART(61-102), a to vždy v duplikátech. Celková vazba činila 2 až 5% z přidané radioaktivity. Nespecifická vazba činila méně než 15% celkové vazby.

Zesíťování ¹²⁵I-CART(61-102) s vazebným místem pomocí MBS, DSS, DSG, EGS, TSAT bylo provedeno v koncentracích 0,1 mM a 1 mM v případě experimentů s buněčnými membránami a v koncentraci 0,1 mM v případě experimentů s celými buňkami.

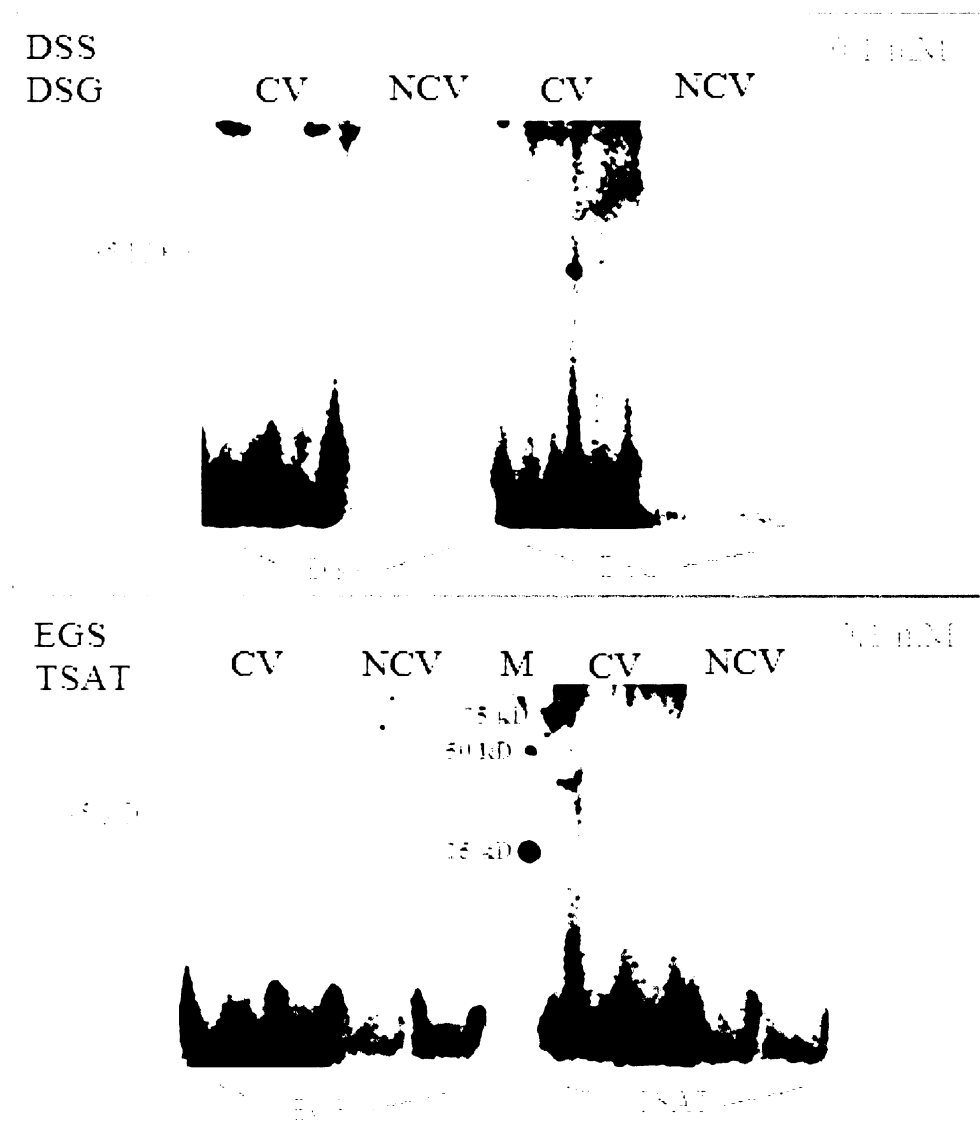
Zesíťované komplexy (promyty a rozpuštěny ve vzorkovém pufru) byly nanášeny v duplikátech na 15 % SDS-polyakrylamidový gel spolu se standardem molekulových hmotností. Po provedení elektroforézy byly gely vysušeny a standard molekulových hmotností byl na gelu radioaktivně označen. Výsledky autoradioografie lze vidět na následujícím obr. 12 na str. 53 a na obr. 13 na str. 54.



D-reakce: autoradiogram 125I-CART(61-102)

Obr. 12 Autoradioogram komplexu $^{125}\text{I-CART}(61-102)$ a vazebného místa v membránách z nediferencovaných buněk PC12 zesíťovaného pomocí DSS, EGS, DSG a TSAT

Jednotlivá písmena zkratk označují: M – standard molekulových hmotností, CV – celková vazba, NV – nespecifická vazba. Celková a nespecifická vazba byla provedena vždy v duplikátech. Zelená vodorovná čára v levé části každého gelu označuje molekulovou hmotnost 35 kD. Koncentrace jednotlivých síťovacích činidel 0,1 mM a 1 mM jsou pro každou sérii CV a NV uvedeny pod každým gelem. Gely představují reprezentativní výběr z nejméně 3 samostatných experimentů.



Obrazek je automaticky vygenerován z programu 41.000

Obr. 13 Autoradioogram komplexu ^{125}I -CART(61-102) a vazebného místa na celých nediferencovaných buňkách PC12 zesíťovaného pomocí DSS, EGS, DSG a TSAT

Jednotlivá písmena zkratk označujú: M – standard molekulových hmotností, CV – celková vazba, NV – nescifická vazba. Celková a nescifická vazba byla provedena vždy v duplikátech. Zelená vodorovná čára v levé části každého gelu označuje molekulovou hmotnost 35 kD. Koncentrace jednotlivých síťovacích činidel byla 0,1 mM. Druh použitého síťovacího činidla je uveden pod gely vždy pro každou sérii CV a NV. Gely představují reprezentativní výběr z nejméně 3 samostatných experimentů.

Množství vázané radioaktivity po změření na γ čítači bylo vyšší u ^{125}I -CART(61-102) vázaného k buňkám či membránám (celková vazba) než u nespecifické v přítomnosti 1000 násobného přebytku neznačeného peptidu CART(61-102). Rozdíl je zřejmý i na obr. 12 na str. 53 a na obr. 13 na str. 54.

Sítování ^{125}I -CART(61-102) a jeho vazebného místa pomocí sítovacích činidel bylo podle autoradiografie nejúčinnější při použití sítovacího činidla DSS, dále EGS, méně účinné při použití DSG a ještě méně při použití trifunkčního činidla TSAT, přičemž s pomocí činidla MBS se komplex ^{125}I -CART(61-102) a vazebného místa nepodařilo zesítovat. Koncentrace sítovacích činidel byly 0,1 mM a 1 mM v případě membrán z nediferencovaných buněk PC12 a 0,1 mM v případě celých nediferencovaných buněk PC12. Výsledky na membránách z nediferencovaných buněk odpovídaly výsledkům u celých nediferencovaných buněk PC12.

Autoradiografie výsledných gelů ukázala, že komplex ^{125}I -CART(61-102) a vazebného proteinu má molekulovou hmotnost 35 kD, stejnou při použití kteréhokoliv účinného sítovacího činidla.

5.5. FOSFORYLACE MAPK (ERK1/2) V BUŇKÁCH PC12

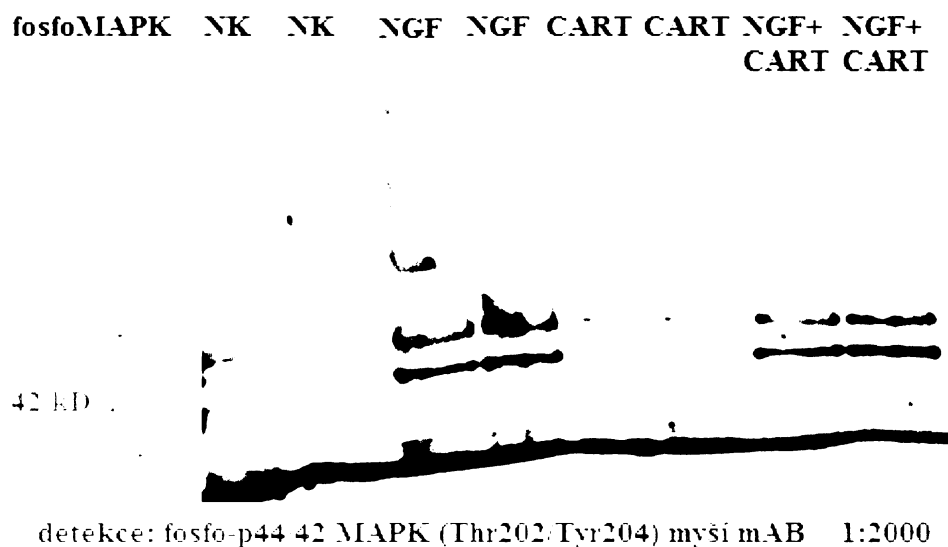
Stav a kvalita buněk byla kontrolována mikroskopicky při 4 násobném a 40ti násobném zvětšení jednak druhý den po vyměnění média se sérem za médium čisté s 0,5 % FBS a jednak byly buňky kontrolovány během každého pokusu. Výměnou média se sérem za médium čisté s 0,5 % FBS se docílilo snížení úrovně bazální hladiny fosforylace v buňkách.

Doba inkubace s peptidy byla dodržována podle přesně stanoveného intervalu 5 a 20 minut (čas byl zvolen podle literatury [70], fosforylace MAPK je největší po 5 minutách, přetrvává ještě 20 minut a dále klesá). Poté byly buňky lyzovány nejméně 15 minut ve vzorkovém redukujícím pufu. Vzorky byly rozděleny SDS-elektroforézou v 10 % polyakrylamidovém gelu a pak přeneseny na NC membrány.

Detekce fosforylované MAPK na NC membráně byla provedena dvojím způsobem. Detekce byla provedena primární fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší monoklonální protilátkou a následně sekundární protilátkou (peroxidásový konjugát) a bylo detekováno luminiscenční záření. Druhým způsobem detekce byla detekce

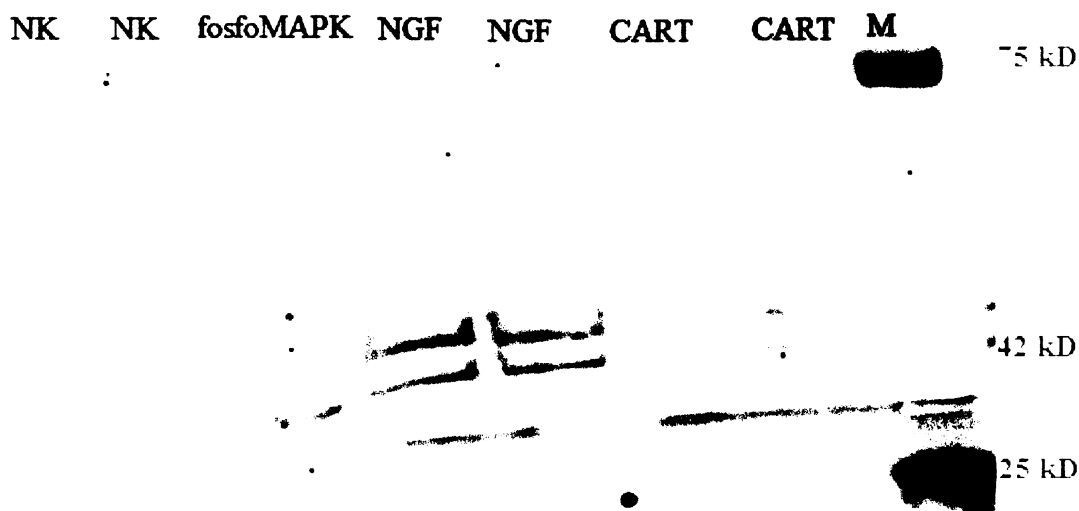
fosforylované MAPK na NC membráně fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Alexafluor myší monoklonální protilátkou (značená fluorescenčně). Při tomto způsobu detekce byla měřena intenzita fluorescenčního záření.

Jako kontrolní pozitivní protein byla používána fosforylovaná MAPK (ERK2) z lyzátu buněk.



Obr. 14 NC membrána po detekci luminiscenčního záření – detekce fosforylované MAPK (ERK1/2)

Zkratky označují: fosfoMAPK – kontrolní pozitivní protein fosfoMAPK (ERK2) s molekulovou hmotností 42 kD, NK – negativní kontrola (není přítomen žádný peptid), NGF – výsledek po inkubaci s nervovým růstovým faktorem (50 ng/ml), CART – výsledek po inkubaci s 10^{-6} M peptidem CART(61-102), NGF+CART – výsledek po inkubaci s nervovým růstovým faktorem (50 ng/ml) a s 10^{-6} M roztokem peptidu CART(61-102). Inkubace probíhala 5 minut a to vždy v duplikátech testovaných látek. Primární protilátka byla ředěna v poměru 1:2000 a detekce byla provedena pomocí činidla Femto Pierce SuperSignal.



detekce: fosfo-p44 42 MAPK (Thr202/Tyr204) myši mAB AlexaFluor 1:20

Obr. 15 NC membrána po detekci fluorescenčního záření – detekce fosforylované MAPK (ERK1/2)

Zkratky označují: NK – negativní kontrola (není přítomen žádný peptid), fosfoMAPK – kontrolní pozitivní protein fosfoMAPK (ERK2) s molekulovou hmotností 42 kD, NGF – výsledek po inkubaci s nervovým růstovým faktorem (50 ng/ml), CART – výsledek po inkubaci s 10^{-6} M roztokem peptidu CART(61-102), M – standard molekulových hmotností, označuje molekulové hmotnosti 75 kD a 25 kD. Inkubace probíhala 20 minut a to vždy v duplikátech testovaných látek. Primární protilátka byla ředěna v poměru 1:20 a byla měřena intenzita fluorescence fluorescenčně značené protilátky.

Fosforylovaná MAPK (ERK1/2) byla detekována narozdíl od negativní kontroly pouze u buněk po inkubaci s NGF. Obě metody detekce potvrdily stejný výsledek, jak je patrné z obr. 14 na str. 56 a z obr. 15 na str. 57. Inkubace buněk s NGF v koncentraci 50 ng/ml aktivovala fosforylaci MAPK (ERK1/2) a to po 5 i 20 minutách. V témže časovém intervalu 10^{-6} M peptid CART(61-102) neaktivoval fosforylaci MAPK (ERK1/2) a nebyl ani schopen potlačit fosforylaci MAPK (ERK1/2) vyvolanou NGF.

6. DISKUZE

6.1 Význam peptidů ovlivňujících příjem potravy pro možnou léčbu obezity

Objev leptinu v roce 1994 [86] odstartoval novou etapu ve výzkumu regulace příjmu potravy a vývoje obezity. Leptin, hormon produkovaný tukovou tkání a ovlivňující dlouhodobě energetický metabolismus působením v CNS, sice nesplnil původní očekávání a nestal se lékem proti obezitě, ale zahájil obrovský vzestup výzkumu složitých mechanismů regulace příjmu a výdeje energie v organismu a následně došlo k objevu celé řady nových látek účastnících se těchto dějů, zejména neuropeptidů [87, 88].

Epidemie obezity a s ní spojených dalších chorob (diabetes mellitus 2. typu, kardiovaskulární choroby, nádorová onemocnění a jiné) představuje v dnešní době závažný zdravotní problém vyskytující se již nejen v západní společnosti, který je důsledkem naší genetické predispozice a současného nevhodného životního stylu (přejídání, nevhodné složení stravy, nedostatek pohybu). Množství obézních lidí celosvětově stoupá nesmírně rychlým tempem, a to i v České republice. Stále je k dispozici velmi málo léků, které v kombinaci s úpravou diety a životního stylu pomáhají snižovat hmotnost – prozatím je to pouze orlistat, inhibitor lipázy, a sibutramin ovlivňující působení serotoninu, v USA a některých státech Evropy navíc rimonabant, nový lék, který je inhibitorem endokanabinoidního receptoru. Ani jeden z těchto léků ale není bez vedlejších účinků [89]. Výzkum mechanismů ovlivňujících příjem potravy a nových látek účastnících se těchto dějů, které by mohly být potenciálními antiobezitiky, je tedy velmi důležitý.

Jednou z takových látek je i před více než deseti lety objevený centrálně působící peptid CART [5]. Jak již bylo podrobně popsáno v úvodu, tato látka se hojně vyskytuje v CNS i periférii a má celou řadu fyziologických účinků v organismu [48]. Bylo také zjištěno, že mRNA pro CART se zvyšuje účinkem leptinu [5] a že peptid CART snižuje příjem potravy také v synergistické interakci s jinými peptidy (CCK, [90], GLP-1, [91]). Vývoj potenciálních léků proti obezitě založených na vývoji analogů peptidu CART však prozatím není možný, protože stále není znám receptor tohoto peptidu. Hledáním vazby peptidu CART k buňkám a tkáním a následné identifikaci receptoru se v minulých letech zabývala řada vědeckých týmů na celém světě, ale navzdory tomu receptor dosud nebyl identifikován. Naše skupina našla specifickou vazbu peptidu CART

k feochromocytomálním buňkám PC12 [62] a na základě těchto poznatků se snaží o identifikaci vazebného místa pro peptid CART. Téma mojí diplomové práce je součástí tohoto úsilí.

6.2 Značení peptidu CART a vazba analogů k buňkám PC12

V publikacích naší skupiny byla popsána radioaktivní jodace Tyr na N-konci peptidu CART(61-102) [62]. S úspěchem byl využit fakt, že CART(61-102) obsahuje pouze jeden Tyr a že jodace nemění afinitu peptidu k buňkám PC12 [62]. Dále byly také v naší publikaci [67] a mojí bakalářské práci [92] testovány kratší fragmenty peptidu CART, které ale měly afinitu k buňkám PC12 nízkou nebo nulovou v rozsahu testovaných koncentrací.

Ke značení peptidu je použit ^{125}I , jehož detekce má řadu výhod, zejména vzhledem k vysoké citlivosti detekce. Nicméně se radioligand ^{125}I -CART(61-102) nedá využít pro identifikaci molekuly potenciálního receptoru pro peptid CART, protože radioaktivně značený ligand je nevhodný pro použití v hmotnostní spektrometrii. Hledali jsme proto jiné možnosti značení, bylo využita biotinylace a fluorescenční značení jak N-koncové aminoskupiny, tak postranních aminoskupin lysinu v CART(61-102) (peptid obsahuje 5 lysinů). Zároveň bylo nutné, aby část aminoskupin zůstala volná a k dispozici pro následné síťování vazebného komplexu). Výsledné analogy obsahovaly vždy několik NH_2 navázaného biotinu nebo fluorescenční značky, jak potvrdila hmotnostní spektrometrie.

Dosud bylo publikováno jen velmi málo prací jiných skupin popisujících vazbu peptidu CART k tumorovým buněčným liniím nebo primárním buňkám. Byla popsána vazba komplexu CART(55-102) se zeleným fluorescenčním proteinem k disociovaným buňkám hypotalamu a hepatocytární buněčné linii HepG2 [75], vazba ^{125}I -CART(61-102) k myším hypofyzárním buňkám AtT20 [73,74] a nedávno také vazba peptidu ^{125}I -CART(61-102) k primární buněčné linii připravené z potkaního nucleu accumbens [76]. V naší laboratoři byla v minulých letech testována vazba ^{125}I -CART(61-102) jak k buněčným membránám z mozku a jiných orgánů i periferních tkání potkanů a morčat, tak buňkám izolovaným z potkaního nebo myšího hypotalamu, kortexu i celého mozku. Specifická vazba však nebyla nalezena (nepublikované výsledky). Pokusili jsme se také zopakovat experimenty zmíněné v předchozím odstavci popisující vazbu ^{125}I -CART(61-102) k lidským hepatocytárním buňkám HepG2 a k myší hypofyzární linii AtT20 za

podmínek, které byly publikované [73, 75]. Žádná specifická vazba však nebyla nalezena (nepublikované výsledky).

Ze všech dříve vyzkoušených buněčných linií v naší laboratoři (kromě buněk AtT20 a HepG2 také hypofyzární buňky GH3 a neurogliální buňky NG108) byla pouze buněčná linie PC12 vhodná pro studium kompetitivních vazeb s peptidy CART, neboť bylo zjištěno [62], že se peptid CART specificky vázal pouze k buněčné linii PC12.

Tato práce navázala na specifickou vazbu radioaktivně značeného ^{125}I -CART(61-102) k buňkám PC12 i tím, že byly testovány neradioaktivně značené analogy peptidu CART a to biotinylovaný a fluorescenčně značený analog CART(61-102) k buňkám PC12 a jejich afinita byla srovnávána s afinitou standardních peptidů CART(61-102) a CART(54-102). Z pozorování buněčné linie pod mikroskopem, kdy byl do růstového média přidán NGF o koncentraci 50 ng/ml média, se potvrdilo, že se buňky PC12 diferencují v neurony a tvoří nervové výběžky. Potažení dna jamek destičky PEI zvyšuje schopnost buněk přisedat k buněčným destičkám, zajistí se homogenní rozmístění buněk na destičce a silnější buněčnou adhezí se zvýší odolnost při vazebných pokusech [93].

Kompetitivní vazebné experimenty s CART(54-102), CART(61-102), bioCART(61-102) a fluoCART(61-102) vázající se k nediferencovaným a diferencovaným buňkám PC12 a buněčným membránám z diferencovaných a nediferencovaných buněk PC12 proběhly za stejných podmínek, jež byly popsány dříve pro radioaktivně značený peptid CART [62]. CART(61-102) a CART(54-102) se vázaly k buněčným membránám z diferencovaných a nediferencovaných buněk s vyšší afinitou než k nediferencovaným buňkám a diferencovaným buňkám PC12 a to v nízkém nM rozmezí. Biotinylovaný CART(61-102) se vázal k diferencovaným i nediferencovaným buňkám PC12 a membránám z nediferencovaných buněk s podobnou afinitou jako CART(61-102) a CART(54-102). FluoCART(61-102) se vázal k diferencovaným a nediferencovaným buňkám PC12 a membránám z nediferencovaných buněk s afinitou o řád nižší než CART(61-102), CART(54-102) a bioCART(61-102). Vzhledem ke své struktuře a velké molekulové hmotnosti (608,45) má fluorescenční značka BODIPY negativní vliv na schopnost vazby (afinitu) k PC12 buňkám a membránám z těchto buněk a tudíž snižuje schopnost vytěšňovat ^{125}I -CART(61-102). Proto tento analog není vhodný pro sítování a další analýzy. Naopak biotinylace peptidu CART neměla vliv na afinitu peptidu k receptoru, a proto pro účely dalších plánovaných pokusů bude analog bioCART(61-102) vhodný.

6.3 Zesíťování vazebného místa s CART(61-102)

Metoda síťování může sloužit jako první metoda pro charakterizaci vazebného místa, zvláště je-li ligand-receptorový komplex radioaktivně označen. Navíc lze sledovat výtěžek během pokusu, neboť radioaktivita ligand-receptorového komplexu může být měřena na γ -čítači během pokusu i po něm. Lze pozorovat i specifitu použitím celkové a nespecifické vazby.

Firma Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) nabízí velké množství síťovacích činidel [83]. Výběr síťovacího činidla byl volen podle dříve publikovaných studií [94, 95, 96, 97] a také byla volena rozdílná délka raménka 4.2 – 16.1 Å. Většina činidel byla homobifunkční (DSS, DSG, EGS) využívající NHS-esterovou vazbu, činidlo TSAT bylo trifunkční a využívalo k síťování stejnou vazbu, činidlo MBS bylo heterobifunkční a využívalo jak NHS-esterovou vazbu, tak vazbu s SH skupinou síťovaného proteinu.

Při použití činidla MBS pro síťování komplexu ^{125}I -CART(61-102) s vazebným místem nebylo žádné zesíťování detekováno. V literatuře je popsána identifikace CCK-A receptoru cholecystokininu pomocí tohoto činidla [97], v tomto případě bylo činidlo nevhodné.

Jako vhodná z hlediska výtěžku a nespecifické vazby se ukázala NHS-esterová vazba homobifunkčních nebo trifunkčního síťovacího činidla. Činidlo DSS s délkou raménka 11,4 Å se osvědčilo jako první, proto byla hledána další síťovací činidla s délkou raménka kratší (DSG), s délkou raménka delší (EGS) a bylo vyzkoušeno také trifunkční činidlo s krátkými raménky (TSAT). Metoda síťování s 5 různými síťovacími činidly byla úspěšná pro 4 z nich (DSS, DSG, EGS, TSAT) a to v koncentracích 0,1 mM a 1 mM u membrán z nediferencovaných buněk PC12 a v koncentraci 0,1 mM v případě celých buněk na destičkách. To znamená, že po separaci komplexu pomocí SDS-PAGE byl autoradiograficky detekován komplex o molekulové hmotnosti 35 kDa (v případě celkové vazby ^{125}I -CART(61-102) k buňkám nebo membránám), a naopak v případě nespecifické vazby (po inkubaci buněk či membrán jak s ^{125}I -CART(61-102), tak s CART(61-102) v koncentraci 1000x vyšší) nebyl komplex detekovatelný.

Vyšší koncentrace činidla rozpuštěného v dimethylsulfoxidu u celých buněk na destičkách způsobovala odlepení buněk od svého povrchu v jamce, proto byla použita pouze nižší koncentrace síťovacího činidla. Jako první byly provedeny síťovací pokusy na

membránách z nediferencovaných buněk. Výhoda použití celých buněk na destičkách oproti membránám je v tom, že lze síťovat pouze ligand-receptorový komplex na povrchu celých buněk, kdežto v druhém případě se izolují všechny membrány dané buňky, proto byla metoda síťování použita i pro celé buňky na destičkách. Ačkoliv se délka ramének u síťovacích činidel lišila, ve všech případech byla výsledná molekulová hmotnost ligand-receptorového komplexu asi 35 kD.

Jednou významnou nevýhodou při metodě síťování je fakt, že v průběhu reakce, kdy se komplex peptid-receptor síťuje, dochází zároveň k disociaci tohoto komplexu a obě reakce jsou v rovnováze. To potom způsobuje snížení výtěžku reakce, v našem případě klesla radioaktivita komplexu asi o 2 třetiny po síťování v porovnání s radioaktivitou po vazebném pokusu. Přesto jsme však po optimalizaci podmínek dosáhli koncentrace komplexu, která byla dostatečná pro detekci. Pro izolaci a identifikaci komplexu bude ale nutné větší množství.

6.4 Signalizace peptidu CART v nediferencovaných buňkách PC12

Vazebné místo pro peptidy CART jsme dále plánovali charakterizovat pomocí signalizace peptidu do buňky. Lakatos a kol. [70] již dříve zveřejnili studii, ve které CART(55-102) vyvolával fosforylaci MAPK (ERK1/2) v myších hypofyzárních buňkách AtT20, ve kterých byla následně pozorována specifická vazba peptidu CART(61-102) k této hypofyzární buněčné linii [73,74]. V naší studii jsme vyzkoušeli podobnou strategii v buňkách PC12.

Metoda fosforylace MAPK (ERK1/2) byla provedena 2 způsoby. Detekce pomocí primární fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší monoklonální protilátky a sekundární HRP konjugované protimýší monoklonální protilátky, kdy bylo k vizualizaci proteinu použito činidlo Femto Pierce SuperSignal, byla citlivější než detekce proteinu na NC membráně pomocí primární fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) Alexafluor myší monoklonální protilátky, značené fluorescenčně, kdy byla měřena intenzita fluorescenčního záření. Nicméně výsledek byl obdobný u obou použitých metod – fosforylace ERK1/2 pomocí peptidu CART nebyla pozorována. Fosforylovaná MAPK (ERK1/2) byla aktivována pouze inkubací buněk PC12 s nervovým růstovým faktorem. Je obecně známo, že růstové faktory aktivují signalizační kaskády uvnitř buněk a NGF aktivuje fosforylaci MAPK (ERK1/2) [77, 78]. V naší práci se nejen nepotvrdilo, že by peptid CART(61-102) aktivoval fosforylaci MAPK (ERK1/2) v buňkách PC12, u kterých

byla pozorována specifická vazba tohoto peptidu, ale ani nebyl schopný potlačovat fosforylaci MAPK (ERK1/2) vyvolanou NGF a to v koncentraci 1000x větší než byla koncentrace NGF. Existuje však hypotéza, že receptorů pro peptidy CART může být více typů, neboť dva odlišné přirozené biologicky aktivní fragmenty CART(55-102) a CART(61-102) vykazují odlišné biologické aktivity [15, 98], a proto i buněčné signalizace mohou být odlišného typu v závislosti na charakteru použitých buněk (dřeň nadledvin u PC12, hypofyzární buňky AtT20) a živočišném druhu (potkaní PC12, myší AtT20).

6.5 Další plánované studie

Poznatky získané v této práci budou využity k následnému výzkumu a formulování další metodiky v hledání receptoru pro peptid CART.

Z této práce vyplývá, že další možností v charakterizaci vazebného místa pro peptidy CART může být využití peptidu CART(61-102) značeného biotinem, jeho zesíťování s vazebným místem nejlépe s pomocí síťovacího činidla DSS či DSG, případně EGS. Takto zesíťovaný komplex by mohl být dále purifikován s použitím metody imunoprecipitace (s využitím protilátek proti peptidu CART) a s využitím metody afinitní chromatografie založené na vazbě biotin-avidin (využití Streptavidin-Agarosy). Detekce tohoto komplexu po separaci pomocí SDS-PAGE a následná identifikace tohoto komplexu pomocí chymotrypsického štěpení a hmotnostní spektrometrie by měly být dalšími kroky. Identifikace receptoru pro peptid CART by pak umožnila hledání biologicky aktivního analogu tohoto peptidu s anorexigenními účinky jak in vitro, tak poté in vivo, směřujícího k nalezení potenciálního antiobezitního léčiva.

7. SOUHRN

Značení peptidu CART a vazba těchto analogů k potkaním feochromocytomálním buňkám PC12

Peptid CART(61-102) byl značen biotinem (bioCART(61-102)) a fluorescenčně (fluoCART(61-102)). Hmotnostní spektrometrie prokázala u obou analogů různý počet modifikovaných NH₂ skupin peptidu: v případě biotinylace to bylo 2-5 skupin, v případě fluorescenčního značení 1-2 skupiny.

V kompetitivních vazebných testech k buňkám PC12 nediferencovaným a diferencovaným pomocí nervového růstového faktoru (NGF) se biotinem značený peptid vázal k celým buňkám i membránám z těchto buněk s afinitou srovnatelnou s peptidy CART(61-102) a CART(54-102). Fluorescenčně značený peptid se vázal k buňkám PC12 a membránám s afinitou o jeden řád nižší ve srovnání s peptidy CART(61-102), CART(54-102).

Zesíťování vazebného místa s peptidem CART

Komplex vazebného místa s radioaktivně značeným peptidem ¹²⁵I-CART(61-102) byl úspěšně zesíťován pomocí 4 síťovacích činidel s rozdílnou délkou raménka, přičemž autoradiografie tohoto komplexu ukázala molekulovou hmotnost komplexu shodnou při použití kteréhokoli činidla: přibližně 35 kD.

Buněčná signalizace peptidu CART v nediferencovaných buňkách PC12

Peptid CART(61-102) po inkubaci s buňkami PC12 (5 a 20 minut) neaktivoval fosforylaci mitogen activated protein kinase (MAPK), konkrétně extracelular regulated kinase (ERK1/2) a nebyl ani schopen potlačit fosforylaci MAPK (ERK1/2) vyvolanou NGF.

Tato studie prověřila biotinylovaný CART(61-102) jako analog s afinitou plně srovnatelnou s původním peptidem a určila molekulovou hmotnost zesíťovaného komplexu vazebného místa s peptidem CART. Na základě těchto informací bude možné v budoucnu izolovat komplex bioCART(61-102) s vazebným místem pomocí

imunoprecipitace nebo s využitím vazby biotin-avidin a následně identifikovat vazebné místo pomocí hmotnostní spektrometrie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Douglass, J., McKinzie, A.A., Couceyro, P.: *J. Neurosci.* 15, 2471-2481 (1995)
2. Spiess, J., Villarreal, J., Vale, W.: *Biochemistry* 20, 1982-1988 (1981)
3. Thim, L., Nielsen, P.F., Judge, M.E., Andersen, A.S., Diers, I., Egel-Mitani, M., Hastrup, S.: *FEBS Lett.* 428, 263-268 (1998)
4. Jensen, P.B., Kristensen, P., Clausen, J.T., Judge, M.E., Hastrup, S., Thim, L., Wulff, B.S., Foged, C., Jensen, J., Holst, J.J., Madsen, O.D.: *FEBS Lett.* 447, 139-143 (1999)
5. Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J., Hastrup, S.: *Nature* 393, 72-76 (1998)
6. Dominguez, G.: *Peptides* 27, 1913-1918 (2006)
7. Stein, J., Steiner, D.F., Dey, A.: *Peptides* 27, 1919-1925 (2006)
8. Ludvigsen, S., Thim, L., Blom, A.M., Wulff, B.S.: *Biochemistry* 40, 9082-9088 (2001)
9. Gautvik, K.M., de Lecca, L., Gautvik, V.T., Danielson, P.E., Tranque, P., Dopazo, A., Bloom, F.E., Sutcliffe, J.G.: *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93, 8733-8738 (1996)
10. Koylu E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., Kuhar, M.J.: *J. Comp. Neurol.* 391, 115-132 (1998)
11. Vrang, N.: *Peptides* 27, 1970-1980 (2006)
12. Fekete, C., Lechan, R.M.: *Peptides* 27, 2012-2018 (2006)
13. Murphy, K.G., Abbot, C.R., Mahmoudi, M., Hunter, R., Gardiner, J.V., Rossi, M., Stanley, S.A., Ghatel, M.A., Kuhar, M.J., Bloom, S.R.: *J. Endocrinol.* 166, 659-668 (2000)
14. Vicentic, A.: *Peptides* 27, 1942-1948 (2006)
15. Thim, L., Kristensen, P., Nielsen, P.F., Wulff, B.S., Clausen, J.T.: *Biochemistry* 96, 2722-2727 (1999)
16. Hunter, R.G., Philpot, K., Vicentic, A., Dominguez G., Hubert, G.W., Kuhar, M.J.: *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 454-459 (2004)
17. Broberger, C.: *Drug Dev. Res.* 51, 124-142 (2000)
18. Damaj, M.I., Zheng, J., Martin, B.R., Kuhar, M.J.: *Peptides* 27, 2019-2023 (2006)

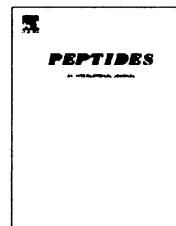
19. Wierup, N., Sundler, F.: Peptides 27, 2031-2036 (2005)
20. Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., Ling, N.C., deSouza, E.B., Kuhar, M.J.: J. Neuroendocrinol. 9, 823-833 (1997)
21. Fekete, C., Mihály, E., Luo, L.G., Kelly, J., Clausen, J.T., Mao, Q., Rand, W.M., Moss, L.G., Kuhar, M.J., Emerson, Ch., Jackson, I.M., Lechan, R.M.: J. Neurosci. 20, 9224-9234 (2000)
22. Dun, S.L., Brailoiu, C.G., Yang, J., Chang, J.K., Dun, N.J.: Peptides 27, 1949-1955 (2006)
23. Couceyro, P., Paquet, M., Koylu, E., Kuhar, M.J., Smith, Y.: Synapse 30, 1-8 (1998)
24. Wierup, N., Gunnarsdottir, A., Ekblad, E., Sundler, F.: BMC Neurosci 8, 51 (2007)
25. Ekblad, E., Kuhar, M.J., Wierup, N., Sandler, F.: Neurogastroenterol. Motil. 15, 545-557 (2003)
26. Lambert, P.D., Couceyro, P.R., McGirr, K.M., Dall Vechia, S.E., Smith, Y., Kuhar, M.J.: Synapse 29, 293-298 (1998)
27. Lambert, P., Couceyro, E., Koylu, N., Ling, E., deSouza, Kuhar, M.J.: Neuropeptides 31, 620-621 (1997)
28. Porte, D., Baskin, D.G., Schwartz, M.W.: Nutr. Rev. 60, 20-29 (2002)
29. Olney, J.W.: Science 164, 719-721 (1969)
30. Železná, B., Maixnerová, J., Matyšková, R., Haugvicová, R., Blokešová, D., Maletínská, L.: v tisku Physiol. Res. (2009)
31. Ekblad, E.: Peptides 27, 2024-2030 (2006)
32. Kuhar, M.J., Yoho, L.L.: Synapse 33, 163-171 (1999)
33. de Lartigue, G., Dimaline, R., Varro, A., Dockray, G.J.: J. Neurosci. 27, 2876-2882 (2007)
34. Broberger, C., Holmberg, K., Kuhar, M.J., Hokfelt, T.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13506-13511 (1999)
35. Okomura, T., Yamada, H., Motomura, W., Kohgo, Y.: Endocrinology 141, 2854-2860 (2000)
36. Jean, A., Conductier, G., Manrique, C., Bouras, C., Berta, P., Hen, R., Charnay, Y., Bockaert, J., Compan, V.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 16335-16340 (2007)
37. Vrang, N., Tang-Christensen, M., Larsen, P.J., Kristensen, P.: Brain Res. 818, 499-509 (1999)
38. Larsen, P.J., Vrang, N., Petersen, P.C., Kristensen, P.: Obes. Res. 8, 590-596 (2000)

39. Asnicar, M.A., Smith, D.P., Yang, D.D., Heiman, M.L., Fox, N., Chen, Y.F., Hsiung, H.M., Koster, A.: *Endocrinology* 142, 4394-4400 (2001)
40. Tian, D.R., Li, X.D., Wan, Y., Wang, X.M., Chang, J.K., Yang, J., Han, J.S.: *Peptides* 25, 2147-2153 (2004)
41. Adam, C.L., Archer, Z.A., Findlay, P.A., Thomas, L., Marie, M.: *Neuroendocrinology* 75, 250-256 (2002)
42. Vrang, N., Kristensen, P., Tang-Christensen, M., Larsen, P.J.: *J. Neuroendocrinol.* 14, 880-886 (2002)
43. Stanek, L.M.: *Peptides* 27, 2005-2011 (2006)
44. Osei-Hyiaman, D., Depetrillo, M., Harvey-White, J., Bannon, A.W., Cravatt, B.F., Kuhar, M.J., Mackie, K., Palkovits, M., Kunos, G.: *Neuroendocrinology* 81, 273-282 (2005)
45. Yanik, T., Dominguez, G., Kuhar, M.J., Del Giudice, E.M., Loh, Y.P.: *Endocrinology* 147, 39-43 (2006)
46. Yamada, K., Yuan, X., Otabe, S., Koyanagi, A., Koyama, W., Makita, Z.: *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 132-136 (2002)
47. Guerardel, A., Barat-Mouari, M., Vasseur, F., Dina, Ch., Vatin, V., Clément, K., Eberlé, D., Vasseur-Decannoy, V., Bell, Ch.G., Galan, P., Hercberg, S., Helbecque, N., Potoczna, N., Horber, F.F., Bobin, P., Froguel, P.: *BMC Genet.* 6, 19 (2005)
48. Rogge, G., Jones, D., Hubert, G.W., Lin, Y., Kuhar, M.J.: *Nature reviews* 9, 747-758 (2008)
49. Hunter, R.G., Kuhar, M.J.: *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 2, 201-205 (2003)
50. Jaworski, J.N., Jones, D.C.: *Peptides* 27, 1993-2004 (2006)
51. Albertson, D.N., Pruetz, B., Schmidt, C.J., Kuhn, D.M., Kapatos, G., Bannon, M.J.: *J. Neurochem.* 88, 1211-1219 (2004)
52. Tang, W.X., Fasuko, W.H., Mash, D.C., Hembry, S.E.: *J. Neurochem* 85, 911-924 (2003)
53. Beaudry, G., Zekki, H., Rouillard, C., Levesque, D.: *Synapse* 51, 233-240 (2004)
54. Hubert, G.W., Kuhar, M.J.: *Neuropeptides* 40, 409-415 (2006)
55. Salinas, A., Wilde, J.D., Maldve, R.E.: *J. Neurochem.* 97, 408-415 (2006)
56. Wierup, N., Sundler, F.: *Peptides* 27, 2031-2036 (2006)

57. Jensen, P.B., Kristensen, P., Clausen, J.T., Judge, M.E., Hastrup, S., Thim, L., Wulff, B.S., Foged, Ch., Jensen, J., Holst, J.J., Madsen, O.D.: *FEBS Lett.* **447**, 139-143 (1999)
58. Wierup, N., Bjorkqvist, M., Kuhar, M.J., Mulder, H., Sundler, F.: *Diabetes* **55**, 305-311 (2006)
59. Silbernagl, S., Despopoulos, A.: Hormony, reprodukce, v knize *Atlas fyziologie člověka*, Grada, Praha, str. 266-309 (2004)
60. Koylu, E.O., Balkan, B., Kuhar, M.J., Pogun, S.: *Peptides* **27**, 1956-1969 (2006)
61. <http://speakingoffaith.publicradio.org/programs/stress/images/stressresponse.jpg>
62. Maletínská, L., Maixnerová, J., Matyšková, R., Haugvicová, R., Šloncová, E., Elbert, T., Slaninová, J., Železná, B.: *Eur. J. Pharmacol.* **559**, 109-114 (2007)
63. Dylag, T., Kotlinska, J., Rafalski, P., Pachuta, A., Silberring, J.: *Peptides* **27**, 1926-1933 (2006)
64. Kask, A., Schioth, H.B., Mutulis, F., Wikberg, J.E.S., Rago, L.: *Brain Res.* **857**, 283-285 (2000)
65. Jaworski, J.N., Kozel, M.A., Philpot, K.B., Kuhar, M.J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**, 1038-1044 (2003)
66. Kim, J.H., Creekmore, E., Vezina, P.: *Neuropeptides* **37**, 369-373 (2003)
67. Maixnerová, J., Hlaváček, J., Blokešová, D., Kowalczyk, W., Elbert, T., Šanda, M., Blechová, M., Železná, B., Slaninová, J., Maletínská, L.: *Peptides* **28**, 1-9 (2007)
68. Yermolaieva, O., Chen, J., Couceyro, P.R., Hoshi, T.: *J. Neurosci.* **21**, 7474-7480 (2001)
69. Sarkar, S., Wittmann, G., Fekete, C., Lechan, R.M.: *Brain Res.* **999**, 181-192 (2004)
70. Lakatos, A., Prinster, S., Vicentic, A., Hall, R.A., Kuhar, M.J.: *Neurosci. Lett.* **384**, 198-202 (2005)
71. Yoon, M.S., Seungwoo, K., Park, H.K., Kim, J.: *Neuropharmacology* **53**, 344-351 (2007)
72. Motulsky H., Neubig R.: *Current. Protoc. Neurosci.* **19**, 7.5.1-7.5.56 (1997)
73. Vicentic, A., Lakatos, A., Jones, D.: *Peptides* **27**, 1934-1937 (2006)
74. Vicentic, A., Lakatos, A., Kuhar, M.J.: *Eur. J. Pharmacol.* **528**, 188-189 (2005)
75. Keller, P.A., Compan, V., Bockaert, J., Giacobino, J.P., Charnay, Y., Bouras, C., Assimacopoulos-Jeannet, F.: *Peptides* **27**, 1328-1334 (2006)
76. Jones, D.C., Kuhar, M.J.: *Synapse* **62**, 122-127 (2008)

77. Greene, L.A., Tischler, A.S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2424-2428 (1976)
78. Vaudry, D., Stork, P.J.S., Lazarovici, P., Eiden, L.E.: Science 296, 1648-1649 (2002)
79. Adler, E.M., Gough, N.R., Blundon, J.A.: Science Signalling 351, 1-9 (2006)
80. Fraker, P.J., Speck, J.C.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849-857 (1978);
81. Chang, C.H., Cheng, Y.C.: Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3188 (1978)
82. Bradford, M.M.: Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)
83. Crosslinking Reagents, Technical Handbook, dostupné z:
<http://www.piercenet.com/files/1601361Crosslink.pdf>
84. Laemmli, U.K.: Nature 227, 680-685 (1970)
85. Voet, D., Voet, J.G.: MAP Kinase Signaling Cascades, v knize Biochemistry, (Fitzgerald, P., Harris, D. ed.) John Wiley & Sons, Inc., New York, str. 697-699 (2004)
86. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M.: Nature 372, 406-407 (1994)
87. Coll, A.P., Farooqi, S., O'Rahilly, S.: Cell 129, 251-262 (2007)
88. Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., Schwartz, M.W.: Nature 443, 289-295 (2006)
89. Matyšková, R., Maixnerová, J., Maletínská, L.: Vesmír 87, 410-413 (2008)
90. Maletínská, L., Maixnerová, J., Matyšková, R., Haugvicová, R., Pírník, Z., Kiss, A., Železná, B.: BMC Neurosci. 9, 101 (2008)
91. Aja, S., Ewing, C., Lin, J., Hyun, J., Moran, T.H.: Peptides 27, 157-164 (2006)
92. Blokešová, D.: Vazba fragmentů peptidů CART k feochromocytomálním buňkám PC12: Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2007)
93. Vancha, A.R., Govindaraju, S., Parsa, K.V.L., Jasti, M., González-García, M., Ballester, R.P.: BMC biotechnology 4, 1472-6750 (2004)
94. Inui, A., Sano, K., Miura, M., Hirose, Y., Nakajima, M., Okita, M., Baba, S., Kasuga, M.: Endocrinology 131, 2090-2096 (2007)
95. Miyazaki, H., Kondoh, M., Watanabe, H., Masuda, Y., Murakami, K., Takahashi, M., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K., Masaki, T.: Eur. J. Biochem. 187, 125-129 (1990)
96. Kristensen, C., Wiberg, F.C., Schäfer, L., Andersen, A.S.: Biol. Chem. 273, 17780-17786 (1998)
97. Shaw, M.J., Hadac, E.M., Miller, L.J.: Biol. Chem. 262, 14313-14318 (1987)

98. Bannon, A.W., Seda, J., Carmouche, M., Francis, J.M., Jarosinski, M.A., Douglass, J.:
J. Pharmacol. Exp. Ther. 299, 1021-1026 (2001)

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Structure–activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments

Jana Maixnerová^a, Jan Hlaváček^a, Darja Blokešová^a, Wioleta Kowalczyk^b,
Tomáš Elbert^a, Miloslav Šanda^a, Miroslava Blechová^a, Blanka Železná^a,
Jiřina Slaninová^a, Lenka Maletínská^{a,*}

^a Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic,
Flemingovo nam. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic

^b Faculty of Chemistry, University of Gdansk, Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdansk 6, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2007

Received in revised form

20 July 2007

Accepted 20 July 2007

Published on line 27 July 2007

Keywords:

CART peptide

Fragments

Binding

PC12 cells

Food intake

Mice

ABSTRACT

CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides are neuropeptides abundant in the central nervous system and periphery found to be involved in the regulation of food intake behavior and other physiological processes. Recently, we reported specific binding of ¹²⁵I-CART(61–102) to the rat adrenal pheochromocytoma cell line PC12, both intact cells and cell membranes. In this study, several fragments of CART(61–102) corresponding to its structural loops were synthesized and tested for their potency in binding experiments using PC12 intact cells and cell membranes and in feeding test with fasted mice. From all shorter peptides tested, only CART(74–86) and CART(62–86) containing disulfide bridges kept partial binding potency of the original molecule with K_i in 10^{-5} and 10^{-4} M range. However, these fragments were not able to inhibit food intake after their central administration up to a dose of 4 nmol/mouse. The results showed that a compact structure containing three disulfide bridges is necessary for preservation of full biological activity of CART peptides.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides were discovered by Douglass et al. [6,7] and since that they have been found to be expressed in specific parts of the central nervous system such as hypothalamus and pituitary [4,20], as well as in periphery (in adrenal medulla [8], islets of Langerhans [16,32], or gut [11]). CART peptides are involved in

the regulation of feeding and energy expenditure, reward and reinforcement processes, stress, endocrine regulation, and sympathetic nerve-regulated activities (for reviews, see [2,14] and the entire issue of Peptides [19]).

ProCART of rat and mouse is identical, consists of 102 amino acids and is processed to two main biologically active CART peptides, i.e. to CART(55–102) and CART(61–102), containing three disulfide bonds between cysteins in positions

* Corresponding author. Tel.: +420 220183525; fax: +420 220183571.

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

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; Abu, 2-aminobutyric acid; AcM, acetamidomethyl; AP, anterior-posterior; CART, cocaine- and amphetamine-regulated transcript; DCC, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide; DCM, dichloromethane; DIC, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide; DMF, dimethylformamide; DVB, divinylbenzene; EDT, ethanedithiol; HOBT, *N*-hydroxybenzotriazole; i.c.v., intracerebroventricular; i.p., intraperitoneal; MBHA, methylbenzhydramine; NGF, nerve growth factor; NMP, *N*-methylpyrrolidinone; TBTU, 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate; TEA, triethylamine; TFA, trifluoroacetic acid; TIS, triisopropylsilane; V, ventricular.

0196-9781/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2007.07.022

68 and 86, 74 and 94, and 88 and 101 [29]. Reduction of the disulfide bridges not only deteriorated anorexigenic effect of the peptide, but also changed its character into an orexigenic one [5]. As determined by NMR spectroscopy, CART(55-102) contains a compact core stabilized by disulfide bonds and disordered N-terminus [25].

The central nervous system contains both CART(55-102) and (62-102) peptides, whose biological activity differs in specific tests [1,9,29]. In the periphery, longer CART peptides, namely CART(1-89) and (10-89), were isolated from adrenal glands [29].

Peptides of the pro-part of CART(1-102) are considered biologically inactive. CART(1-27) failed to attenuate food intake in freely fed rats [24], activate cell signaling [23] and displace ^{125}I -CART(61-102) binding to mouse pituitary cell line AtT20 [31].

N-terminal fragments of CART(55-102), i.e. CART(55-76) and (62-76) were found active in feeding and behavioral tests in rats [17,24]. C-terminal peptide CART(85-102) was also synthesized and its ability to attenuate sensitization to morphine-induced hyperlocomotion was reported [9,10].

Despite enormous effort, no receptors for CART have been isolated and cloned to date. Specific binding of ^{125}I -CART(61-102) to the AtT20 tumor cell line has been reported [30,31]. Besides, binding of a fusion protein consisting of CART(55-102) and green fluorescent protein to dissociated hypothalamic cells and HepG2 cells was described by Keller et al. [18]. Recently, we have reported specific binding of ^{125}I -CART(61-102) to PC12 cells, both non-differentiated and differentiated into a neuronal phenotype [26].

PC12 is single cell clonal line from rat adrenal pheochromocytoma which responds reversibly to nerve growth factor (NGF). By exposure to NGF, the PC12 cells cease to multiply and begin to extend branching processes similar to those produced by sympathetic neurons in primary cell culture [13]. The findings from our previous studies point to a possible role of CART in the sympatho-adreno-medullar system [8].

In this study, we present synthesis of several new peptide fragments corresponding to structural loops of CART(61-102). We report their binding to PC12 cells both non-differentiated and differentiated. The anorexigenic effect of selected fragments after intracerebroventricular (i.c.v.) administration in fasted mice was also determined.

Previously studied peptides CART(62-76) [17] and C-terminal [$\text{Abu}^{86,94}$]CART(85-102) [10] were also resynthesized in order to evaluate their binding to PC12 cells and their anorexigenic activity under our experimental conditions.

2. Materials and methods

2.1. Peptides

Peptides CART(61-102) and (55-102) were obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Structures of their shortened analogs 1-14 are described in Table 1. Peptides 2, 4, 5 and 7 were synthesized at the University of Gdansk, Poland. Peptides 1, 3, 6 and 8-14 were synthesized in the Institute of

Table 1 – Structure of CART peptide fragments

	55	61	68	74	86	88	94	101
CART (55-102)	VPIYEK	YGQVPM	CDAGEQ	CAVRK	GARIGK	LCDCPR	GTSCNS	SFLLKCL
			┌──────────┐		┌──────────┐		┌──────────┐	
CART (61-102)								
			┌──────────┐		┌──────────┐		┌──────────┐	
1		YGQVPM	-NH ₂					
2			GDAGEQ	-NH ₂				
3				GAVRK	GARIGK	-NH ₂		
4					GPRGT	-NH ₂		
5						GNSFLL	-OH	
6				CAVRK	GARIGK	-NH ₂		
7				CAVRK	GARIGK	-OH		
8		YGQVPM	CDAGEQ	(Acm)	AVRK	GARIGK	-NH ₂	
9		YGQVPM	CDAGEQ	(Acm)	AVRK	GARIGK	-NH ₂	
10		YGQVPM	(Acm)	DAGEQ	CAVRK	GARIGK	-NH ₂	
11		YGQVPM	CDAGEQ	CAV	-OH			
12		YGQVPM	(Acm)	DAGQ	C(Acm)	-OH		
13		LAbu	DCPRGT	SAbu	NSFLL	-OH		
14		LAbu	DCPRGT	SAbu	NSFLL	-OH		

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

2.1.1. Synthesis of peptides 2, 4, 5 and 7

The peptides were synthesized manually by the solid-phase method, by stepwise coupling of Boc-amino acids to the growing peptide chain on MBHA resin (Senn Chemicals AG, 1% DVB, 200–400 mesh, 0.67 mmol/g) or on Boc-Cys(MeOBzl)-Merrifield Resin (GL Biochem Ltd. (Shanghai) 1% DVB, 100–180 mesh, 0.7 mmol/g). Fully protected peptide resins were synthesized according to standard procedures involving (i) deprotection steps using 33% TFA in the presence of anisole (1%), 5 and 25 min; (ii) neutralization with 10% TEA/DCM, 3 and 7 min and (iii) couplings mediated by the DCC/HOBt or TBTU/HOBt reagents. On completion of the syntheses, the protected peptide resins were treated with liquid HF in the presence of anisole at 0 °C and free peptides oxidized with I₂ in methanol. The crude products were desalted on a Sephadex G-15 column and eluted with aqueous acetic acid (30%) at a flow rate of 3 ml/h. After freeze-drying, the fractions comprising the major peak were purified by preparative RP-HPLC using a Waters instrument (Milford, MA, USA).

2.1.2. Synthesis of peptides 1, 3, 6 and 8–14

The peptide sequences were assembled either in a solid-phase synthesizer ALADIN II (Development Workshops, IOCB, Prague, Czech Republic, peptides 1, 3, 6, and 10–12) or ABI433A (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, peptides 8, 9, 13, and 14) by stepwise coupling of the corresponding Fmoc-amino acids to the growing chain on Rink amide resin (1% DVB, 200–400 mesh, 0.65 mmol/g) or on Wang resin (1% DVB, 100–200 mesh, 0.82 mmol/g), both from IRIS, Biotech GmbH, Marktredwitz, Germany. Fully protected peptide resins were synthesized according to a standard procedure involving (i)

cleavage of the N^α-Fmoc protecting group with 20% piperidine in DMF, (ii) coupling, mediated by mixtures of coupling reagents DIC/HOBt in DMF or TBTU/HOBt in NMP. On completion of syntheses, the deprotection and detachment of linear peptides from the resins were carried out simultaneously, using a TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2.5:2.5:2) cleaving mixture. Each of the resins was washed with a TFA/H₂O (96:4) mixture and the combined TFA filtrates were evaporated at room temperature. The precipitated residues were triturated with cold *tert*-butyl-methylether, collected by suction and dried in vacuum at 30 °C. The linear peptides were purified by HPLC using a Spectra Physics instrument with SP 8800 pump, SP4290 integrator and Thermo Separation Products Spectra 100 UV detector. The disulfide bonds were closed by oxidation with pure oxygen in 0.1 M pyridine-acetate buffer (pH 6.8). The resulting peptides were purified by HPLC using a Spectra Physics instrument (San Jose, CA, USA).

The purity and identity of all peptides was determined by analytical HPLC, amino acid analysis, and by the FAB MS technique (Micromass, Manchester, UK) (Table 2).

2.2. Iodination of CART(61–102)

CART(61–102) was iodinated at Tyr⁶² either with Na ¹²⁵I (MP Biomedicals, Illkirch, France) or non-radioactive NaI (Sigma, St. Louis, MO, USA) using Iodo-Gen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) [12] in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.15 M NaCl for 15 min at room temperature according to manufacturer's instructions. Both radioactive and non-radioactive iodinations were performed under identical conditions (i.e. 5 equiv. of the peptide were used for 1 equiv. of non-radioactive NaI or Na ¹²⁵I). Non-, mono- and di-iodinated CART(61–102) were separated by RP-HPLC using an Luna 3 μ phenyl-hexyl 150 mm × 4.6 mm column (Phenom-

Table 2 – Analytical data of CART peptide fragments

Peptide	Formula ^a	MW/(M + 1) ⁺	HPLC ^b RT
1 CART(62–67)-NH ₂	C ₃₁ H ₄₈ N ₈ O ₈ S	692.8/693.2	10.94 ^g
2 [Gly ^{68,74}]CART(68–74)-NH ₂	C ₂₃ H ₃₆ N ₁₂ O ₉	631.6/632.3	10.58 ^c
3 [Gly ^{74,86}]CART(74–86)-NH ₂	C ₅₅ H ₁₀₄ N ₂₂ O ₁₃	1281.6/1281.8	9.91 ^d
4 [Gly ^{88,94}]CART(88–94)-NH ₂	C ₂₄ H ₄₄ N ₁₁ O ₉	629.7/630.3	10.50 ^e
5 [Gly ⁹⁴ , Ala ¹⁰¹]CART(94–102)-OH	C ₄₅ H ₇₅ N ₁₁ O ₁₂	962.2/962.8	15.62 ^f
6 CART(74–86)-NH ₂ (S–S, 74–86)	C ₅₇ H ₁₀₆ N ₂₂ O ₁₃ S ₂	1371.8/1371.7	19.02 ^g
7 CART(74–86)-OH(S–S, 74–86)	C ₅₇ H ₁₀₅ N ₂₁ O ₁₄ S ₂	1372.7/1372.8	8.00 ^h
8 [Cys(Acm) ⁷⁴ , Cys(H) ^{68,86}]CART(62–86)-NH ₂	C ₁₁₃ H ₁₉₇ N ₃₇ O ₃₀ S ₄	2724.3/2723.3	20.52 ⁱ
9 [Cys(Acm) ⁷⁴]CART(62–86)-NH ₂ (S–S, 68–86)	C ₁₁₃ H ₁₈₉ N ₃₇ O ₃₃ S ₄	2722.3/2721.3	20.05 ⁱ
10 [Cys(Acm) ⁶⁸]CART(62–86)-NH ₂ (S–S, 74–86)	C ₁₁₃ H ₁₈₉ N ₃₇ O ₃₃ S ₄	2722.3/2721.3	25.59 ^g
11 [Cys(H) ^{68,74}]CART(62–76)-OH	C ₆₄ H ₉₉ N ₁₇ O ₂₃ S ₃	1569.8/1569.6	28.79 ^g
12 [Cys(Acm) ^{68,74}]CART(62–76)-OH	C ₇₀ H ₁₀₉ N ₁₉ O ₂₅ S ₃	1712.0/1711.7	24.22 ^g
13 [Abu ^{86,94} , Cys(H) ^{88,101}]CART(85–102)-OH	C ₈₄ H ₁₄₁ N ₂₃ O ₂₅ S ₂	1937.3/1937.0	31.27 ^d
14 [Abu ^{86,94}]CART(85–102)-OH(S–S 88–101)	C ₈₄ H ₁₃₉ N ₂₃ O ₂₅ S ₂	1935.3/1935.1	29.80 ^d

^a Determined with FAB MS technique (Micromass, Manchester, England).

^b Retention time in minutes, 25 cm × 0.4 cm column, 5 μm (Vydac, Separations Group, Hesperia, USA), detection at 220 nm.

^c Gradient 40% ACN in 0.1% aqueous TFA, 20 min, flow 1 ml/min.

^d Gradient 0–100% of ACN in 0.05% aqueous TFA, 40 min, flow 1 ml/min.

^e Gradient 5–70% ACN in 0.05% aqueous TFA, 60 min, flow 1 ml/min.

^f Gradient 30–90% ACN in 0.1% aqueous TFA, 20 min, flow 1 ml/min.

^g Gradient 0–50% ACN in 0.05% aqueous TFA, 50 min, flow 1 ml/min.

^h Gradient 10–70% ACN in 0.1% aqueous TFA, 20 min, flow 1 ml/min.

ⁱ Gradient 10–60% ACN in 0.1% aqueous TFA, 20 min, flow 1 ml/min.

enex, Torrance, CA, USA) applying 20–25% gradient of acetonitrile in H₂O with 0.1% trifluoroacetic acid in 60 min (flow rate 1 ml/min, UV detection at 215 and 275 nm and gamma detection of the radioactive peptide (Radio-HPLC detector Ramona Star, raytest Isotopenmess geräte GmbH, Straubenhardt, Germany, equipped with BGO cell)). The molecular weights of the iodinated peptides were determined by MALDI-TOF, Reflex IV mass spectrometry (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Identification of methionine⁶⁷ oxidation was accomplished by LC-MS/MS (2D CapLC chromatograph with Q-TOF micromass spectrometer (Waters-Micromass, Milford, MA, USA)) after tryptic digestion. The iodinated or non-iodinated CART(61–102) was digested with trypsin (0.03 µg/µl) for 8 h at 37 °C in 50 mM ethylmorpholine acetate buffer pH 8.1, 10% acetonitrile and 0.01% β-mercaptoethanol [28].

Specific activity of ¹²⁵I-CART(61–102) was about 2000 Ci/mmol. The peptide was kept in aliquots at –20 °C and used for binding studies within 1 month.

2.3. Cell culture

Rat pheochromocytoma cell line PC12 was obtained from ATCC (Manassas, VA, USA). The cells were grown in RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, 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, 1.5 g/l sodium bicarbonate, pH 7.4, and passaged once a week to maintain the cells in exponential growth. For binding studies, cells were seeded on polyethylene imine-coated 24-well plates (Corning, NY, USA). To reach the density of 5 × 10⁵ cells/well, which was found optimal for binding experiments, non-differentiated cells were allowed to grow for 2 days. Differentiation of cells was performed by addition of the nerve growth factor (50 ng/ml) to the fresh medium on days 1, 3, and 5. On day 7, the cells at a density of 5 × 10⁵ cells/well were used in the experiment. The differentiation was checked microscopically and the number of cells per well was counted before and after the experiment.

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 ¹²⁵I-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. Non-specific binding was determined using CART(61–102) in concentration 10⁻⁶ M.

After incubation, cells were washed with washing buffer (20 mM HEPES buffer pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose) and then solubilized in 0.1N NaOH. Bound radioactivity was determined by γ-counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). The total binding (about 2000 cpm per tube for binding to non-differentiated cells, about 5000 cpm per tube for binding to differentiated cells) amounted to 2–5% of the radioactivity added, the non-specific binding to less than 15% of the total binding. Experiments were carried out in

duplicates at least three times. All compounds tested were dissolved in water and stored frozen in aliquots until used in the experiment.

Linearity (i.e. free Cys residues without disulfide bridges) of peptides 8, 11 and 13 was determined before and after binding experiments by MALDI-TOF mass spectrometry.

2.5. Binding to cell membranes

Cell membranes from non-differentiated PC12 cells were isolated as described earlier [26]. Binding experiments were performed with 50 µg of membrane protein in a total volume of 0.25 ml under conditions optimized previously [26] and described for plated cells. Binding was terminated by quick filtration using a Brandel cell harvester (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). The total binding (about 8000 cpm per tube) was less than 10% of the radioactivity added, the non-specific binding amounted to less than 15% of the total binding. The assays were performed in duplicates at least three times.

2.6. Food intake experiments

Male C57Bl/6 mice from the Institute of Molecular Genetics (Prague, Czech Republic) were housed at a temperature of 23 °C and a daily cycle of 12 h light and dark (light from 6:00 h). They were given ad libitum water and standard chow diet (St-1, Velaz, Koleč, Czech Republic). All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the Act of the Czech Republic Nr. 246/1992.

At the age of 16 weeks, mice were implanted with cannulas into the third ventricle (AP 2 mm, V 3 mm) as described earlier [26]. Animals were placed into separate cages and allowed to recover from surgery for at least 7 days before being used in the experiment. For 3 days before the food intake experiment, the mice had access to food only from 8:00 to 15:00 h and free access to water for 24 h. The amount of food consumed was monitored.

On the day of the experiment at 8:00, fasted mice were injected i.c.v. with 5 µl of either saline or CART(61–102) or CART(55–102) at a dose of 0.5 µg/5 µl, i.e. 0.1 nmol/mouse (dissolved in saline) or CART peptide fragments 6, 9, 11 and 13 at a dose of 4 nmol/mouse (n = 6–8).

Fifteen minutes after i.c.v. injection, mice were given weighed food pellets. Food consumption was followed 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. Analysis of binding data and statistics

Data are presented as mean ± 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 non-linear regression analysis). Inhibition constants (K_i) were calculated from IC₅₀ using Cheng-Prusoff equation [3].

Food intake data were analyzed by one-way ANOVA (analysis of variance) followed by Tukey post hoc test using

Graph-Pad Software; $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Synthesis of CART peptide fragments

Structures of CART peptide fragments used in this study are given in Table 1. Physicochemical properties of the peptides are presented in Table 2.

Linear sequences of the peptides were assembled on solid support using common protocols of peptide synthesis and disulfide bonds were closed by pure oxygen in 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 6.8) as described in the Section 2. The purity of all peptides was higher than 90%.

Peptide 1 is N-terminal hexapeptide of CART(61-102). Peptides 2-5 are sequences of CART(61-102) between cysteines 68-74, 74-86, 88-94, 94-101, where cysteines were replaced by glycines (peptides 2-4) or Gly and Ala (peptide 5) (see Table 1 and structure of CART peptide in Thim et al. [29]). Peptides 6 and 7 with cysteines both on the N- and C-terminus are cyclic analogs of peptide 3, they differ only in their C-terminal group that is either an amide or a free carboxyl, respectively. Compounds 9 and 10 correspond to sequence 62-86, and contain three Cys residues with one of them blocked by Acm, i.e. Cys(Acm)⁶⁸ in peptide 10 and Cys(Acm)⁷⁴ in peptide 9, which enables formation of disulfide bridges in two different positions (Table 1). Peptide 8 is a linear precursor of peptide 9.

Linear peptides 11 and 12 consist of 15 amino acids, compound 11 contains two free cysteines, protection of these cysteines^{68,74} by Acm groups secures linearity of peptide 12.

Finally, linear peptide 13 and its cyclic derivative 14 corresponds to the C-terminal part of CART(61-102); both have been already reported by Dylag et al. [9,10] and were re-synthesized by us.

3.2. Iodination of CART(61-102)

CART(61-102) was mono-iodinated with both radioactive and stable isotope. Under reaction conditions described in Section 2, four major peaks were found both in radioactive and non-radioactive preparations by means of HPLC with retention times of 40.7, 41.7, 44.4 and 45.8 min (not shown). The peaks were identified as mono-iodinated peptide with oxidized Met⁶⁷ (MW/M + H⁺ 4657 expected/4657.770 found), mono-iodinated peptide (4641 expected/4643.078 found), di-iodinated peptide with oxidized Met⁶⁷ (4783 expected/4785.382 found) and di-iodinated peptide (4767 expected/4768.467 found) by mass spectrometry. Typically, mono-iodinated CART(61-102) made about 50% of peptide content. The original peptide CART(61-102) was not present in the peptide mixture after the iodination procedure.

LC-MS/MS analysis of tryptic digests of iodinated CART (61-102) and non-iodinated CART (61-102) confirmed oxidation of methionine in position 67 of the iodinated peptide (results not shown).

3.3. Competitive binding to non-differentiated PC12 cells and cell membranes

For competitive binding studies, 30 min incubation at 37 °C using 50 µg of protein (cell membranes) or 5×10^5 cells (plated intact cells) was routinely used. Typical binding curves to cell

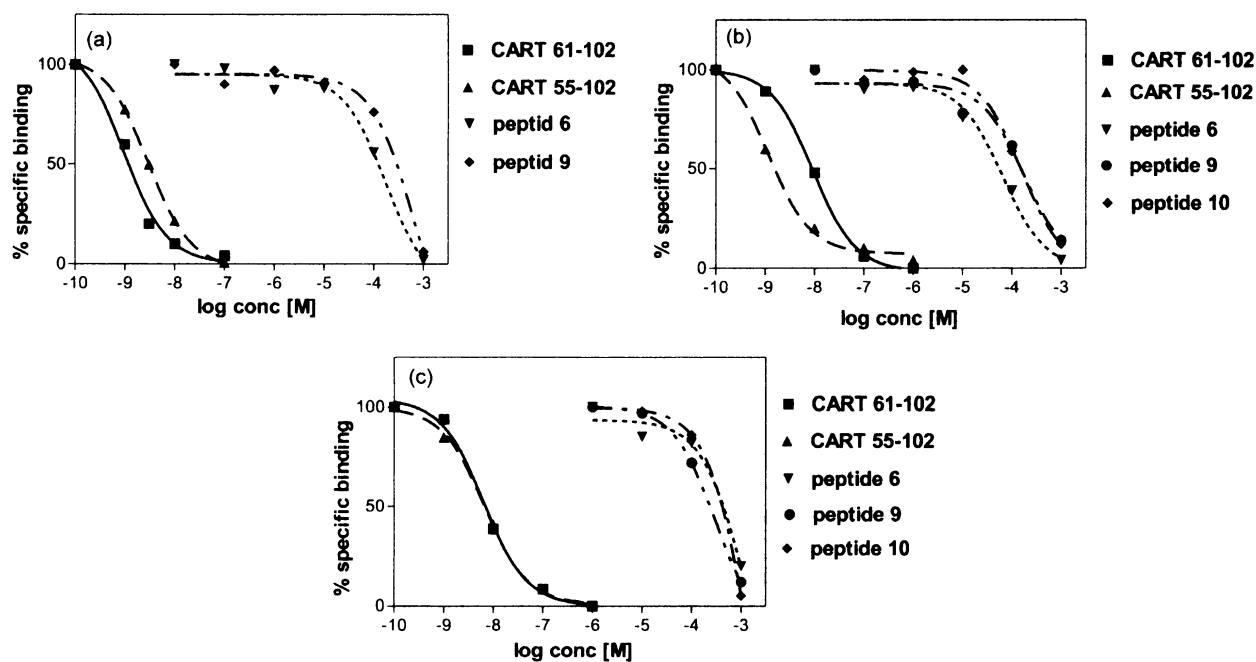


Fig. 1 – Displacement of ¹²⁵I-CART(61-102) binding to (a) membranes from non-differentiated PC12 cells, (b) non-differentiated PC12 cells and (c) NGF-differentiated PC12 cells. ¹²⁵I-CART(61-102) at a concentration of 0.1 nM was displaced by increasing concentrations of CART(61-102), CART(55-102) and CART peptide fragments (30 min incubation at 37 °C). The results are expressed as % of specific binding (after subtraction of non-specific binding in the presence of 10⁻⁶ M CART(61-102)). A representative example of at least three independent experiments carried out in duplicates.

Table 3 – Displacement of ^{125}I -CART(61-102) binding by CART peptide fragments on PC12 cells

Peptide	K_i (M)		
	Membranes from non-differentiated cells	Non-differentiated cells on plates	Differentiated cells on plates
CART(61-102)	$(2.99 \pm 0.65) \times 10^{-9}$	$(1.36 \pm 2.62) \times 10^{-8}$	$(8.01 \pm 2.14) \times 10^{-9}$
CART(55-102)	$(2.98 \pm 0.33) \times 10^{-9}$	$(1.29 \pm 1.65) \times 10^{-8}$	$(5.40 \pm 0.44) \times 10^{-9}$
1	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
2	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
3	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
4	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
5	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
6	$(1.08 \pm 0.38) \times 10^{-5}$	$(7.29 \pm 2.64) \times 10^{-5}$	$(5.00 \pm 0.26) \times 10^{-4}$
7	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
8	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
9	$(3.98 \pm 0.49) \times 10^{-4}$	$(3.96 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	$(4.09 \pm 0.06) \times 10^{-4}$
10	$(4.14 \pm 0.56) \times 10^{-4}$	$(1.62 \pm 0.49) \times 10^{-4}$	$(1.26 \pm 0.35) \times 10^{-4}$
11	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
12	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
13	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
14	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$

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 [26]).

membranes, non-differentiated cells and differentiated cells are shown in Fig. 1a-c.

Results of displacement experiments of ^{125}I -CART(61-102) binding by CART(61-102), CART(55-102) and the synthetic CART fragments 1-14 are summarized in Table 3. CART(61-102) and CART(55-102) have K_i in low 10^{-8} range, peptide 6 in 10^{-5} M range and peptides 9 and 10 in 10^{-4} M range (see Table 3, Fig. 1a and b). The rest of the analogs tested did not displace ^{125}I -CART(61-102) binding even at a concentration of 10^{-4} M (Table 3).

Formation of disulfide bridges due to spontaneous oxidation was checked by mass spectroscopy before and after the experiment; after the incubation, compounds 8 and 11 contained about 10% of oxidized form and compound 13 about 20% (results not shown).

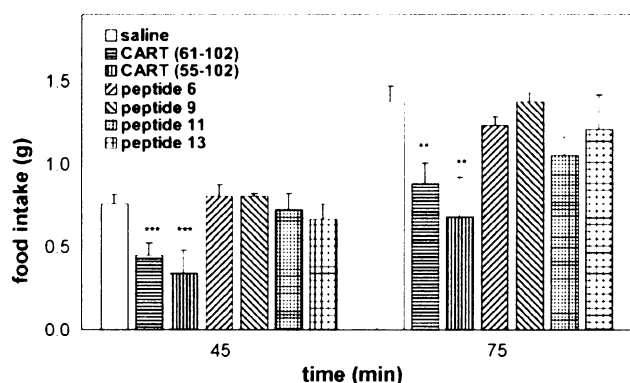


Fig. 2 – Effect of CART(61-102) and CART(55-102) and selected fragments on food intake of fasted mice. CART(61-102) and CART(55-102) were administered i.c.v. in a dose of 0.1 nmol/mouse, peptides 6, 9, 11 and 13 in a dose of 4 nmol/mouse. Food intake was monitored 45 and 75 min after injection and is expressed in grams of food consumed per mouse. Significance is $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ vs. the respective saline-treated group ($n = 6-8$).

3.4. Competitive binding to differentiated PC12 cells

The PC12 cell line was successfully differentiated using NGF treatment to the neuronal phenotype, as described earlier [13]. CART(61-102), CART(55-102) and peptides 9 and 10 were bound to differentiated cells with K_i comparable with that of non-differentiated cells (Table 3, Fig. 1c). Peptide 6 competed with ^{125}I -CART(61-102) for binding to differentiated cells with K_i one order of magnitude higher than to non-differentiated cells (Table 3).

3.5. Food intake experiments

The course of food intake after i.c.v. administration of CART(61-102), CART(55-102) and CART peptide fragments 6, 9, 11 and 13 is shown in Fig. 2. The decrease in food intake after administration of the standard CART(61-102), corresponded to the published values [26], but none of the fragments tested showed any anorexigenic activity even at the 40 times higher dose, i.e. 4 nmol/mouse.

4. Discussion

Most of the in vivo studies with CART peptides have reported on naturally occurring CART(55-102) and/or CART(62-102) with the focus on feeding behavior after i.c.v. injection [9,14,22,29]. Thim et al. [29] first published that CART(54-102), CART(55-102), CART(61-102) and CART(62-102) administered i.c.v. to fasted mice produced a similar dose-dependent decrease in food intake, with CART(55-102) being slightly more potent than the other peptides. Another extensive study comparing effects of i.c.v. injected CART(55-102) and CART(62-102) in fasted mice showed CART(62-102) as five times more potent than CART(55-102) in inhibition of food intake [1].

In our food intake test, i.c.v. administered CART(61-102) lowered food intake in fasted C57 mice significantly and dose-

dependently as described earlier [26]. In this study, an i.c.v. dose (0.1 nmol/mouse) of both CART(55–102) and CART(61–102) resulted in equivalent decrease in food intake, which was statistically significant compared to that of the saline treated controls ($P < 0.001$).

Recently, specific binding of ^{125}I -CART(61–102) to mouse pituitary tumor AtT20 cells [30] and to mouse pheochromocytoma PC12 cells [26] was reported. Non-related peptides such as cholecystokinin, α -melanocyte-stimulated hormone, thyroxin releasing hormone, angiotensin II, neurotensin, and leptin did not displace ^{125}I -CART(61–102) binding to the cell membranes even at a concentration of 10^{-5} M [26]. Binding studies with fragments of the CART peptides can be a powerful tool for comparing affinity of different parts of the molecule and looking for the minimal biologically active structure of the CART peptide.

A comprehensive structure–activity study of various CART peptide fragments in different pharmacological assays conducted under comparable experimental conditions has not been performed yet. Here, for the first time we present the synthesis of series of peptide fragments covering stepwise the structure of the CART(61–102) molecule and describe their binding to pheochromocytoma cells PC12. Peptides that showed affinity to the PC12 cells were tested in the food intake experiment.

Shortened fragments of CART peptides corresponding to sequences of structural loops were tested in order to search for the minimal structure that would still preserve biological activity of the CART peptide.

CART(61–102) was iodinated with a radioactive and a stable isotope. Four peaks were separated by means of HPLC under conditions of narrow gradient of acetonitrile (20–25%) in 60 min; they corresponded to mono- and di-iodinated peptides with unmodified or oxidized Met⁶⁷ (methionine sulfoxide). Mass spectroscopy confirmed that partial oxidation occurs during iodination. In competitive binding experiments to non-differentiated PC12 plated cells, four above-mentioned peptides were displaced identically by increasing concentrations of CART(61–102) (D.B., L.M., unpublished results). This is in agreement with our previously published results showing that iodination of CART(61–102) did not alter affinity of the peptide to PC12 cells [26]. Di-iodinated CART(61–102) was bound to PC12 cells and cell membranes with an affinity similar to that of CART(61–102). We also confirmed partial preservation of the anorexigenic activity of CART(61–102) after its iodination [26]. All competitive binding studies with CART fragments were performed using mono-iodinated ^{125}I -CART(61–102) that formed the major fraction of the iodinated CART(61–102) preparation.

N-terminal peptide 1 and peptides 2–5 corresponding to amino acid sequences between Cys residues of CART(61–102), where cysteines were replaced by glycines (or Ala in position 101) (Table 1), did not bind to PC12 cells or cell membranes in the range of concentrations tested (Table 3).

Peptides 6 and 7 are cyclic analogs of peptide 3; both contain Cys residues at the N- and C-terminus. Even though they differed only in their C-terminal group, they behaved differently. While compound 7 with the COOH group at the C-terminus did not displace ^{125}I -CART(61–102) binding to PC12 cells, compound 6 with the amide group at the C-terminus

was bound to non-differentiated cells and cell membranes with K_i in 10^{-5} M range and to the differentiated ones with K_i in 10^{-4} M range (Table 3, Fig. 1). Affinity of peptide 6 to differentiated cells was 7 times lower compared to non-differentiated ones. The possible reason is that after differentiation to neuronal phenotype, environment of binding site could be altered and/or the CART binding molecule might be modified. However, the receptor for CART peptide has not been characterized yet and therefore, further studies are needed.

Compounds 9 and 10 are elongated versions of compound 6; they differed only in the position of their disulphide bridges (positions 68–86 and 74–86, respectively (Table 1)). They showed comparable binding affinity to both non-differentiated and differentiated cells that was slightly lower than that of peptide 6. Peptide 8, which is the linear analog of 9 and 10, was devoid of any affinity in the range of concentrations tested (Table 3). These findings point to enormous importance of compact cystine knot structure for preservation of binding to putative receptor on PC12 cells.

It was therefore not surprising that in the feeding test, CART peptide fragments 6 and 9 did not inhibit the food intake at the dose of 4 nmol/mouse, i.e. 40 times higher than that used for CART(61–102) and CART(55–102) (Fig. 2). The dose corresponded to the highest doses of CART fragments that were found to affect significantly food intake in the previous studies [17,24]. Regarding peptides 6 and 9, we cannot exclude their possible antagonistic, i.e. orexiogenic character. Couceyro and Fritz [5] showed that unfolded CART(55–102) increased food intake in non-fasted rats. However, we found no significant increase in food intake up to a dose of 4 nmol/mouse (Fig. 2). Further in vitro functional studies with PC12 cells are under investigation.

Linear peptide 11 and its derivative 12 were deduced from already reported CART(62–76) [17,24]. According to these authors, linear peptides CART(55–76) and (62–76), if administered i.c.v. to freely fed rats, attenuated both unstimulated and neuropeptide Y-stimulated food intake. However, in the reports mentioned above, it was not stated clearly whether SH groups in the peptides were oxidized during the experiment or not. In this study, CART(62–76), i.e. compound 11 contained free cysteines while peptide 12 had cysteines^{68,74} protected by Ac groups. Linearity of peptide 11 was confirmed after the binding experiment by mass spectroscopy. As shown in Table 3, neither peptide 11 nor 12 displaced ^{125}I -CART binding to plated PC12 cells and their membranes up to the concentration of 10^{-4} M. Besides, peptide 11 failed to inhibit food intake after its i.c.v. administration to fasted mice (Fig. 2). The discrepancy between our feeding test results and those of Lambert et al. [24] and Kask et al. [17] could be attributed to different animal species (mice versus rats) and experimental design used (fasted versus freely fed animals). However, our feeding test results are in agreement with the data from binding experiments.

Last year, Dylag et al. [9,10] reported synthesis and biological activity of C-terminal derivatives of CART(55–102) with reduced thiol groups, such as linear and cyclic form of [$\text{Abu}^{86,94}$]CART(85–102), and [$\text{Abu}^{86,88,94,101}$]CART(85–102). Both linear CART peptide analogs were able to inhibit ampheta-

mine- and cocaine-induced locomotor activity after their i.c.v. administration into mice [10]. Also, naturally occurring CART(55-102) is known to reduce cocaine- [15] or amphetamine- [21] induced locomotion when injected into nucleus accumbens of rats. However, it is difficult to compare the potency of CART(55-102) with that of [Abu^{86,94}]CART(85-102) and [Abu^{86,88,94,101}]CART(85-102), because the authors used different animal models and administration into different brain areas.

We re-synthesized [Abu^{86,94}]CART(85-102) both as a linear peptide **13** and its cyclic derivative **14** (Table 1). Linearity of peptide **13** was checked during binding tests since this peptide is especially susceptible to spontaneous oxidation. The content of oxidized, i.e. cyclic form amounted to about 20% after the binding experiment. Table 3 shows binding of fragments **13** and **14** to PC12 cells and membranes. Both peptides were not able to displace ¹²⁵I-CART(61-102) binding even at 10⁻⁴ M concentrations. Besides, linear peptide **13** did not show any activity in the feeding test at a dose of 4 nmol/mouse (Fig. 2). In the study of Dylag et al. [9,10] the importance of the C-terminal part of CART peptide molecule for interaction with the opioid system is suggested. However, we propose that the part of CART(61-102) containing all three disulfide bridges is necessary for preservation of the anorexigenic effect.

In conclusion, a series of CART peptide fragments representing different parts of the CART(61-102) molecule were characterized by their binding to non-differentiated and differentiated PC12 cells and cell membranes and by the feeding test in mice. The results showed that a compact structure containing three disulfide bridges is necessary for high affinity binding to PC 12 cells and anorexigenic activity. From all peptides tested, only CART(74-86) and CART(62-86) containing disulfide bridges in positions 74-86 or 68-86 showed low affinity to PC12 cells (about 3 orders of magnitude lower than CART (61-102)). These peptides failed to inhibit food intake after their i.c.v. administration up to a dose of 4 nmol/mouse. As the peptides mentioned correspond to the sequences at the N-terminus of CART (61-102), which seems to form outer loops of the molecule, we conclude that the biological activity of CART peptides is connected rather with the outer N-terminal loops of the molecule than the inner C-terminal ones.

The abundance and wide distribution of CART peptides in the central nervous system and periphery suggest multiple roles of these peptides and the existence of several putative receptors in the mammalian organism. Binding to specific tumor cells with possibly over expressed CART receptor(s), as well as the use of CART peptide fragments for CART research may help to identify CART receptors and further elucidate the physiological role of the CART peptides.

Acknowledgements

The study was supported by grants 303/05/0614 of the Grant Agency of the Czech Republic and Z40550506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic. We gratefully acknowledge the excellent technical assistance of H. Hulačová, A. Vytejčková and H. Vysušilová.

REFERENCES

- [1] Bannon AW, Seda J, Carmouche M, Francis JM, Jarosinski MA, 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.
- [2] Broberger C. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and food intake: behavior in search of anatomy. *Drug Dev Res* 2000;51:124-42.
- [3] Chang CH, Cheng YC. Ribonucleotide reductase isolated from human cells. *Biochem Pharmacol* 1978;22:3099-108.
- [4] Couceyro PR, Koyle EO, Kuhar MJ. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat* 1997;12:229-31.
- [5] Couceyro PR, Fritz T. Production of recombinant CART peptides in *Escherichia coli* with agonist and antagonist effects on food intake in rats. *Protein Expr Purif* 2003;32:193-5.
- [6] Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 1995;15:2471-81.
- [7] 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.
- [8] Dun SL, Brailoiu CG, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and sympatho-adrenal axis. *Peptides* 2006;27:1949-55.
- [9] Dylag T, Kotlinska J, Rafalski P, Pachuta A, Silberring J. The activity of CART peptide fragments. *Peptides* 2006;27:1926-33.
- [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. CART in the enteric nervous system. *Peptides* 2006;27:2024-30.
- [12] Fraker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;80:849-57.
- [13] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2424-8.
- [14] Hunter RG, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert GW, Kuhar MJ. CART in feeding and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:454-9.
- [15] Jaworski JN, Kozel MA, Philpot KB, Kuhar MJ. Intra-accumbal injection of CART (cocaine-amphetamine regulated transcript) peptide reduces cocaine-induced locomotor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:1038-44.
- [16] Jensen PB, Kristensen P, Clausen JT, Judge ME, 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 HB, Mutulis F, Wikberg JES, Rago L. Anorexigenic cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide intensifies fear reactions in rats. *Brain Res* 2000;857:283-5.
- [18] Keller PA, Compan V, Bockaert J, Giacobino JP, Charnay Y, Bouras C, et al. Characterization and localization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) binding sites. *Peptides* 2006;27:1328-34.
- [19] Kuhar MJ, editor. *Peptides*. 2006. p. 1911-2.

- [20] Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Ling NC, DeSouza EB, Kuhar MJ. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary, and adrenal gland. *J Neuroendocrinol* 1997;9:823–33.
- [21] Kim JH, Creekmore E, Vezina P. Microinjection of CART peptide 55–102 into the nucleus accumbens blocks amphetamine-induced locomotion. *Neuropeptides* 2003;37:369–73.
- [22] Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Chrisriansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1995;39:72–6.
- [23] Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall RA, Kuhar MJ. 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* 2005;384:198–202.
- [24] Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 1998;29:293–8.
- [25] Ludvigsen S, Thim L, Blom AM, Wulff BS. Solution structure of the satiety factor, CART, reveals new functionality of a well-known fold. *Biochemistry* 2001;40:9082–8.
- [26] Maletinská L, Maixnerová J, Matyšková R, Haugvicová R, Šloncová 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.
- [27] Motulsky H, Neubig R. Analyzing radioligand binding data. *Curr Protoc Neurosci* 1997;Suppl 19:7.5.1–7.5.55.
- [28] Selicharová I, Smutná K, Šanda M, Ůbik K, Matoušková E, Bursíková E, et al. 2-DE analysis of a new human cell line EM-G36 derived from breast cancer progenitor cells and comparison with normal mammary epithelial cells. *Proteomics* 2007;7:1549–59.
- [29] Thim L, Nielsen PF, Judge ME, Andersen AS, Diers I, Egel-Mitani M, et al. Purification and characterization of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast. *FEBS Lett* 1998;428:263–8.
- [30] Vicentic A, Lakatos A, Kuhar MJ. CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells. *Eur J Pharmacol* 2005;528:188–9.
- [31] Vicentic A, Lakatos A, Jones D. The CART receptors: background and recent advances. *Peptides* 2006;27: 1934–7.
- [32] Wierup N, Bjorkqvist M, Kuhar MJ, Mulder H, Sundler F. CART regulates islet hormone secretion and is expressed in the β -cells of type 2 diabetic rats. *Diabetes* 2006;55:305–11.

Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice

Blanka Železná¹, Jana Maixnerová¹, Resha Matyšková¹, Renata Haugvicová², Darja Blokešová¹ and Lenka Maletínská¹

¹Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, ²Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Running title: CCK and CART peptide in MSG obese mice

Corresponding author:

Dr. Lenka Maletínská

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry

Flemingovo nám. 2

166 10 Prague 6

Czech Republic

Tel. +420 220183525

Fax +420 220183571

e-mail: maletin@uochb.cas.cz

Summary

Monosodium glutamate (MSG) treatment of neonatal mice results in a selective damage to the arcuate nucleus (ARC) and development of obesity with increased adiposity at sustained body weight in the adulthood. Feeding pattern of the MSG obese mice is unusual; as our previous results showed, after 24-hour fasting, MSG mice consumed negligible amount of food in several hours and therefore, it was impossible to register effect of peptides attenuating food intake such as cholecystokinin (CCK) or cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide. To overcome this problem, two findings were used: firstly, orexigenic effect of neuropeptide Y (NPY) was attenuated both by CCK or CART peptide in lean fed mice and secondly, orexigenic effect of NPY was preserved in fed rats with MSG obesity. In this study, short-term food intake in fed lean and MSG obese C57BL/6 male mice was measured after simultaneous central administration of orexigenic NPY with either CART peptide or peripherally administered CCK. Anorexigenic action of exogenous CART peptide was preserved in MSG obese mice. On the other hand, satiety effect of exogenous CCK was completely lost in MSG obese mice; in conclusion, effective leptin signaling in ARC is necessary for satiety effect of CCK.

Key words: monosodium glutamate (MSG) obesity; neuropeptide Y (NPY); cholecystokinin (CCK), cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide

Introduction

The prevalence of obesity is increasing worldwide, which indicates that the primary cause of obesity lies in environmental and behavioral changes rather than in genetic modifications (for reviews, see Coll *et al.*, 2007 and Cawthorne, 2007). Among the environmental influences that disrupt body weight regulation, two factors play a major role: the passive overconsumption of energy-dense, high-fat diets and the decline in physical activity. It is important to emphasize that even a minor imbalance between energy intake and energy expenditure may lead to severe obesity. Obesity is accompanied with high risk of type 2 diabetes, cholelithiasis, hypertension and coronary heart disease. The scale of the obesity problems and the increasing understanding of the complex systems regulating body weight have led to a renewed effort to identify possible explanation of the mechanisms regulating food intake and treatment of obesity, metabolic syndrome, and diabetes.

Information on the metabolic status of the organism enters and is processed in the hypothalamus and in the nucleus tractus solitarii (NTS) of the brainstem, which are interconnected reciprocally by hypothalamic neurons projecting to the brainstem and the NTS projections directed to the hypothalamus (for reviews, see Broberger 2005, Broberger and Hokfelt 2001, McMinn *et al.* 2000).

In the hypothalamic arcuate nucleus (ARC), adiposity signals leptin and insulin enhance expression and secretion of anorexigenic proopiomelanocortin (POMC) and of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide by one type of neurons and attenuate production of of orexigenic neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (AgRP) by another neuron type (for review, see Broberger and Hokfelt 2001; Elmquist *et al.* 1999; King 2005; Coll *et al.* 2007). POMC/CART and NPY/AgRP first order neurons with cell bodies in ARC project to the paraventricular

nucleus of hypothalamus (PVN) where reduction in energy intake is mediated and to the lateral hypothalamic area (LHA), the “feeding” center of the brain (Broberger 2005; Broberger et al.1999b). From PVN and LHA, second order neurons project to the brainstem where gastrointestinal satiety signals such as cholecystokinin (CCK) are processed (McMinn et a., 2000).

NPY is the most powerful regulator of food intake (Lambert et al. 1998). However, its orexigenic effect could be eliminated by anorexigenic peptides such as centrally administered CART peptide (Kristensen et al. 1998) or peripherally injected CCK (Rowland 1988; McMinn et al. 2000).

Pathogenesis and therapy of obesity are studied using appropriate animal models. Models of monogenic (such as *ob/ob* or *db/db* mice, deficient in leptin or its receptor), chemically induced (such as monosodium glutamate-induced (MSG) obesity) or diet-induced obesity (DIO) were established (for review, see Butler and Cone 2001, Buettner et al. 2007, Casper et al., 2008).

MSG obesity results from treatment of rodents in their first days of life. Specific lesions occur in ARC (Olney 1969) leaving most cells of ARC damaged and those of other hypothalamic nuclei untouched (Eleftheriou *et al.* 2003; Maletínská *et al.* 2006). Subsequent changes show the importance of ARC in the regulation of metabolism. In the MSG treated animals, ARC area is shrunk, third ventricle widened, and median eminence thinned (Broberger *et al.* 1998). MSG treatment lowers production of growth-hormone releasing hormone (Tamura *et al.* 2002) that results in shortened body length, and atrophy of pituitaries, gonads, and optical nerves. In ARC of MSG rodents, leptin and insulin signaling is impaired (Maletínská et al. 2006; Dawson et al.1997) and production of anorexigenic CART peptide and orexigenic NPY is inhibited (Broberger et al. 1998, Broberger 1999a). Both NPY and CART are

produced also in other hypothalamic areas such as PVN and LHA. NPY immunoreactivity was preserved in the PVN of MSG mice (Broberger *et al.* 2000), probably by local NPY expression (Kerkerian and Pelletier 1986). Besides, CART is expressed in half of cell bodies of nodose ganglion in the vagus nerve also express CART (Broberger 2000, Broberger 2005). The extra-ARC sources of NPY and CART are preserved after the MSG treatment.

MSG treated rodents do not differentiate feeding at light and dark because of their deteriorated retina cells (Edelstein *et al.* 1995; Mistlberger *et al.* 1999), and develop obesity with increased adiposity at sustained body weight (Djazayery *et al.* 1979), which results rather from a lower metabolic rate than from elevated food intake (Morris *et al.* 1998). The possible reason could be a reduced effect of anorexigenic peptides that are produced or processed in ARC. After 24-hour-long fasting, the MSG obese NMRI mice showed substantially attenuated food intake compared with their lean controls which made impossible to follow their response either to peripherally administered satiety hormone cholecystokinin octapeptide (CCK-8) (Maletínská *et al.* 2006) or to centrally injected anorexigenic CART peptide (our preliminary experiments).

Two previous findings inspired us how to overcome this problem: a) in lean fed mice, both CCK and CART peptide inhibited orexigenic effect of NPY (Rowland 1988; Lambert *et al.* 1998; Kristensen *et al.* 1998), b) the MSG treated rats had preserved orexigenic effect of NPY (Tang-Christensen *et al.* 1998). In this study, food intake in freely fed MSG obese C57BL/6 mice after parallel administration of orexigenic NPY with either CART peptide or CCK was followed. The aim was to find out whether anorexigenic CART peptide and satiety peptide CCK take part in food intake

regulation of mice with MSG obesity and whether functioning ARC is necessary for anorexigenic effect of CCK or CART peptide generally.

Research Methods and Procedures

Experimental animals

Male C57BL/6 mice (Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic) were housed at a temperature of 23°C and a daily cycle of 12 h light and dark (light from 6:00). They were given *ad libitum* water and standard chow diet that contained 25, 9, and 66% calories as protein, fat and carbohydrate, with energy of 3.4 kcal/g (St-1, Velaz, Koleč, Czech Republic). Daily food intake (24 hour food intake) was determined regularly every week from 6 to 16 weeks of age. All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the law of the Czech Republic Nr. 246/1992.

For MSG obesity, newborn mice were subcutaneously (SC) administered with L-glutamic acid sodium salt hydrate (Sigma, St. Louis, USA) (4 mg/g body weight) daily from postnatal day 2 to 8.

MSG treated mice at 16 weeks of age and their age-related controls were used in feeding experiments. After completing food intake experiments, mice were sacrificed next morning between 8:00 and 9:00 a.m. (n=20-25). In their blood sera, leptin, and glucose levels were determined. White adipose tissue (subcutaneous, abdominal, and gonadal) of all mice were dissected and weighed.

Brain histology

Three controls and three MSG-treated mice, 16 week-old, were perfused as described in Maletínská *et al.* 2006. Coronal sections from the whole hypothalamus

were collected and lesions in the arcuate nucleus were inspected (Maletínská *et al.* 2006).

Blood serum components

Leptin concentrations in sera were quantified by ELISA assay (BioVendor, Brno, Czech Republic). Serum glucose levels were measured by a glucometer (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan).

Food intake experiments

Cannula placement

At the age of 16 weeks, lean or MSG mice were implanted with cannulas (Plastics One, Roanoke, USA) into their third ventricle (AP 2mm, V 3mm) as described earlier (Maletínská *et al.* 2007). Animals were placed into separate cages and allowed at least seven days to recover from surgery with free access to food and water before being used in the experiment.

Peptides

Porcine NPY and cholecystokinin octapeptide (CCK-8, Asp-Tyr(SO₃H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) were obtained from NeMPS (Strasbourg, France). CART(61-102) was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland).

Feeding test

Between 8:00 and 9:00 a.m., each individual group of 6-8 mice underwent one of the following treatments: 1) intracerebroventricular (ICV) injection of saline using an infusion pump, 2) ICV injection of NPY at a dose of 5 µg per mouse, 3) ICV injection of CART(61-102) peptide at doses a/ 0.1 and b/ 0.5 µg per mouse, 4) ICV co-injection of NPY at a dose of 5 µg plus CART(61-102) peptide at doses a/ 0.1 and b/ 0.5 µg per mouse, 5) intraperitoneal (IP) injection of CCK-8 at a dose of a/ 4 and b/ 40 µg/kg, 6) ICV injection of NPY at a dose of 5 µg per mouse followed 45 min later

by IP injection of CCK-8 at a dose of a/ 4 and b/ 40 µg/kg. All peptides were dissolved in saline. Volume of IP injected solutions was 0.2 ml/mouse; that of ICV injected solutions was 5 µl per mouse. All ICV administered solutions were infused in 20 s and the infusion cannula was left in place for further 20 s to prevent reflux. Each animal was used only once; the experiment was repeated with a new set of mice.

Fifteen min after the ICV injection, mice were given weighed food pellets. Food intake was registered every 30 min and followed for 6 hours. Animals had free access to water during the experiment. The results were expressed in grams of food consumed. The placement of cannula was verified histologically after the experiment.

Statistics

Data are presented as means ± SEM for the number of animals indicated in the Figures and Table. They were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

C57BL/6 mice treated in their neonatal period with MSG developed severe obesity at the age of 16 weeks even though their average daily food intake was lower than that of lean untreated controls ($3,62 \pm 0,23$ g versus $4,07 \pm 0,16$ g). The ratio of fat weight (subcutaneous, abdominal, plus epididymal) to body weight was about 8 times enhanced and leptin level was very substantially increased in MSG mice compared with lean controls. On the other hand, glucose level of the MSG mice did not differ from that of lean controls (see Table 1). Analysis of serial coronal sections of the hypothalamus showed an obvious disappearance of neurons in ARC of MSG treated

mice (Fig. 1) while adjacent hypothalamic nuclei did not show any sign of damage similarly as in our previous study with NMRI mice (Maletínská *et al.* 2006).

In freely fed lean controls and MSG obese mice, cumulative food intake was negligible after the ICV injection of saline and so was that after two different doses of either IP injected CCK-8 (4 or 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or ICV administered CART peptide (0.1 or 0.5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) (results not shown). NPY at a dose of 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ substantially increased food intake in freely fed lean mice up to 2 hours after its administration, its action in the MSG obese mice was slower, but persisted longer (Fig. 2a,b).

To determine whether NPY pretreatment attenuates the feeding response to CCK, mice received 5 μg ICV of NPY, followed 45 min later (at a time of the first food intake measurement) by IP injection of CCK, similarly as in the study of McMinn *et al.* (2000). In lean controls, orexigenic action of NPY was completely abolished by CCK-8, which acted in a dose-dependent way (Fig. 2a, 3); similarly, it was lowered by co-administration of CART peptide also in a dose-dependent way (Fig. 2b, 3). In MSG obese mice, CCK-8 did not affect orexigenic effect of NPY at all; CART peptide attenuated the NPY induced feeding to a lower extent than in lean controls (Fig.2a, b, 3).

Discussion

NPY exerts effects on food intake at the level of the PVN and LHA which receives a dense projection from the arcuate nucleus and where NPY Y1 receptors are expressed (Broberger and Hokfelt 2001). MSG treatment of neonatal rodents cut virtually all projections from ARC but disabled neither the orexigenic effect of exogenous NPY nor the anorexigenic effect of exogenous CART peptide in the MSG obese C57BL/6 mice (Fig. 3a, b). In this study, exogenous CART peptide attenuated

orexigenic effect of NPY most probably through specific binding sites for CART peptide (Maletínská *et al.* 2007) that are located outside ARC. Until now, molecular character of CART peptide receptors has not been elucidated. It is possible that in MSG obese mice, exogenous NPY and CART peptide can act through PVN or LHA *via* their intact neurons and preserved neuronal circuits.

Anorexigenic effect of CCK is mediated by CCK-A receptors that are located both in central nervous system and periphery. CCK produces satiety in two different brain areas: in nucleus tractus solitarius (NTS) of the brainstem and in medial-basal hypothalamus (Luckman and Lawrence 2003; Cummings and Overduin, 2007). Even though none of these areas was damaged by the MSG treatment, CCK-8 did not affect NPY-induced feeding in MSG obese mice in this study which was in concordance with our previous results using NMRI mice (Maletínská *et al.* 2006). It was shown previously that MSG obese rodents responded neither to systemic nor central leptin administration (Dawson *et al.* 1997, Tang-Christensen *et al.* 1999) similarly as did Koletsky obese *fa^k/fa^k* rats (Takaya *et al.* 1996, Morton *et al.* 2003) or obese *db/db* mice (Morton *et al.* 2003), from a common reason - lack of functional leptin receptors, which was restricted to ARC in the MSG obese rodents or was total in Koletsky rats or *db/db* mice. Interestingly, both MSG obese mice and rodents with impaired leptin receptor did not provide satiety response to CCK (Morton *et al.* 2005, Maletínská *et al.* 2006). After leptin signaling had been restored in ARC of Koletsky rats using ARC directed injection of human *lepr^b* adenovirus, effect of CCK on the activation of neurons of NTS and area postrema, where satiety-related inputs are processed, was re-constituted (Morton *et al.* 2005). It shows that ARC-based leptin receptors are necessary for CCK-induced satiety and explains irresponsiveness to CCK-8 in MSG obese mice.

In MSG obese mice, CART peptide production in their damaged ARC is disabled, but anorexigenic action of exogenous CART peptide is preserved. On the other hand, CCK production is untouched in MSG obese mice, but CCK satiety effect is lost; possibly due to a non-functional leptin signaling in the ARC, which is crucial for mediating satiety response to CCK.

Acknowledgements

The study was supported by grants 303/05/0614 and 305/06/0427 of the Grant Agency of the Czech Republic and Z4 055 0506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

We are indebted to A. Vytejčková and H. Vysušilová for their excellent technical assistance, and Dr. Z. Pirník and Dr. A. Kiss (Institute of Experimental Endocrinology, Bratislava, Slovak Republic) for brain histology.

References

- BROBERGER C, JOHANSEN J, JOHANSSON C, SCHALLING M, HOKFELT T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15043-15048, 1998.
- BROBERGER C. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* **848**: 101-113, 1999a.
- BROBERGER C, VISSER TJ, KUCHAR MJ, HOKFELT T. Neuropeptide Y innervation

and neuropeptide-Y-Y1-receptor-expressing neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of the mouse. *Neuroendocrinology* **70**: 295-305, 1999b.

BROBERGER C, HOKFELT T: Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol Behav* **74**: 669-682, 2001.

BROBERGER C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med* **258**: 301-327, 2005.

BUETTNER R, SCHOLMERICH J, BOLLHEIMER LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* **15**: 798-808, 2007.

BUTLER AA, CONE RD. Knockout models resulting in the development of obesity. *TRENDS Genetics* **17**: S50-54, 2001.

CASPER R, SULLIVAN EL, TECOTT L. Relevance of animal models to human eating disorders and obesity. *Psychopharmacology* **199**: 313-329, 2008.

CAWTHORNE MA. Opportunities and challenges for the development of pharmacological therapies for obesity treatment. *Obes Rev* **8 (suppl. 1)**: 131-136, 2007.

COLL AP, FAROOQI S, O'RAHILLY SO. The hormonal control of food intake. *Cell* **129**: 251-262, 2007.

CUMMINGS DE, OVERDUIN J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* **117**: 13-23, 2007.

DAWSON R, PELLEYMOUNTER MA, MIILLARD WJ, LIU S, EPPLER B. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *Am J Physiol* **273**: E202-206, 1997.

DJAZAYERY A, MILLER DS, STOCK MJ. Energy balances in obese mice. *Nutr Metab.* **23**: 357-367, 1979.

EDELSTEIN K, PFAUS JG, RUSAK B, AMIR S. Neonatal monosodium glutamate

treatment prevents effects of constant light on circadian temperature rhythms of adult rats. *Brain Res* **675**: 135-142, 1995.

ELEFTERIOU F, TAKEDA S, LIU X, ARMSTRONG D, KARSENTY G. Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass. *Endocrinology* **144**: 3842-3847, 2003.

ELMQUIST JK, ELIAS CF, SAPER CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* **22**: 221-232, 1999.

HARRIS RB, MITCHEL TD, YAN X, SIMPSON JS, REDMANN SM JR. Metabolic responses to leptin in obese db/db mice are strain dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **281**: R115-132, 2001.

KERKÉRIAN L, PELLETIER G. Effects of monosodium L-glutamate administration on neuropeptide Y-containing neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res* **369**: 388-390, 1986.

KING PJ: The hypothalamus and obesity. *Curr Drug Targets* **6**: 225-240, 2005.

LAMBERT PD, COUCEYRO PR, MC GIRR KM, DALL VECHIA SE, SMITH Y, KUHAR MJ: CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* **29**: 293-298, 1998.

KRISTENSEN P, JUDGE ME, THIM L, RIBEL U, CHRISTIANSEN KN, WULFF BS, CLAUSEN JT, JENSEN PB, MADSEN OD, VRANG N, LARSEN PJ, HASTRUP S: Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* **393**: 72-76, 1998.

LUCKMAN SM, LAWRENCE CB. Anorectic brainstem peptides: more pieces to the puzzle. *TRENDS Endocrin Metab* **14**: 60-65, 2003.

MALETÍNSKÁ L, SHAMAS TOMA R, PIRNIK Z, KISS A, SLANINOVÁ J, HALUZÍK M, ŽELEZNÁ B. Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium

glutamate obese mice. *Reg Peptides* **136**: 58-63, 2006.

MALETÍNSKÁ L, MAIXNEROVÁ J, MATYŠKOVÁ R, HAUGVICOVÁ R, ŠLONCOVÁ E, ELBERT T, SLANINOVÁ J, ŽELEZNÁ B. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol* **559**:109-104, 2007.

MCMINN JE, BASKIN DG, SCHWARTZ MW. Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. *Obesity Rev.* 1: 37-46, 2000.

MCMINN JE, SINDELAR DK, HAVEL PJ, SCHWARTZ MW. Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin. *Endocrinology* **141**: 4442-4448, 2000.

MISTLBERGER RE, ANTHE MC. Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat. *Brain Res* **842**:73-83, 1999.

MORRIS MJ, TORTELLI CF, FILIPPIS A, PROIETTO J. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. *Reg Peptides* **75-76**: 441-447, 1998.

MORTON GJ, NISWENDER KD, RHODES CJ, MYERS, JR. MG, BLEVINS JE, BASKIN DG, SCHWARTZ MW. Arcuate nucleus-specific leptin receptor gene therapy attenuates the obesity phenotype of Koletsky (fa^k/fa^k) rats. *Endocrinology* **144**: 2016-2024, 2003.

MORTON GJ, BLEVINS JE, WILLIAMS DL, NISWENDER KD, GELLING RW, RHODES CJ, BASKIN DG, SCHWARTZ MW. Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *J Clin Invest* **115**:703-10, 2005.

OLNEY JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**: 719-721, 1969.

ROWLAND NE. Peripheral and central satiety factors in neuropeptide Y-induced feeding in rats. *Peptides* **9**: 989-992, 1988.

TAKAYA K, OGAWA Y, HIRAOKA J, HOSODA K, YAMORI Y, NAKAO K, KOLETSKY RJ. Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Nat Genet* **14**:130-131, 1996.

TAMURA H, KAMEGAI J, SHIMIZU T, ISHII S, SUGIHARA H, OIKAWA S. Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. *Endocrinology* **143**: 3268-3275, 2002.

TANG-CHRISTENSEN M, VRANG N, LARSEN PJ. Glucagon-like peptide 1(7-36) amide's central inhibition of feeding and peripheral inhibition of drinking are abolished by neonatal monosodium glutamate treatment. *Diabetes* **47**:530-537, 1998.

TANG-CHRISTENSEN M, HOLST JJ, HARTMANN B, VRANG N. The arcuate nucleus is pivotal in mediating the anorectic effects of centrally administered leptin. *Neuroreport* **10**:1183-1187, 1999.

Table 1

Metabolic parameters of freely fed 16-week-old lean and MSG male C57BL/6 mice

Characterization	Rate of fat/body weight	Glucose (mmol/l)	Leptin (ng/ml)
Control	1.41 ± 0.41	8.20 ± 0.64	7.00 ± 1.21
MSG	13.48 ± 0.99 ***	7.88 ± 0.62	45.55 ± 6.54 ***

All values are expressed as the mean ± SEM (n=20-25). Significance was ***p<0.001 *versus* controls.

Figure legends

Fig. 1

MSG lesions in hypothalamic arcuate nucleus (ARC). Coronal sections of the hypothalamus of MSG-treated mice stained with 0.1% cresyl violet acetate show disappearance of neurons in ARC compared with control mice (3V – third ventricle) (n=3 per group).

Fig. 2

a/ Cumulative food intake response of freely fed lean and MSG mice to NPY at a dose of 5 µg/mouse and NPY at a dose of 5 µg/mouse plus CCK-8 (dose 40 µg/kg);

b/ cumulative food intake response of freely fed lean and MSG mice to NPY at a dose of 5 µg/mouse and NPY (5 µg/mouse) plus CART(61-102) at a dose of 0.5 µg/kg. Food intake is expressed in grams of food consumed (n = 6-8 mice per group).

*** p< 0.001 *versus* respective group treated by NPY at a dose of 5. µg/mouse.

Fig. 3

Inhibition of NPY-induced food intake (dose 5 µg/mouse) by CART(61-102) (0.1 and 0.5 µg/mouse) or CCK-8 (4 and 40 µg/kg), 195 min after administration of NPY in lean and MSG mice. Food intake is expressed in grams of food consumed per 180 min (n=6-8 mice per group). * p< 0.05, ** p< 0.01, *** p< 0.001 *versus* respective group treated by NPY at a dose of 5 µg/mouse.

Fig 1

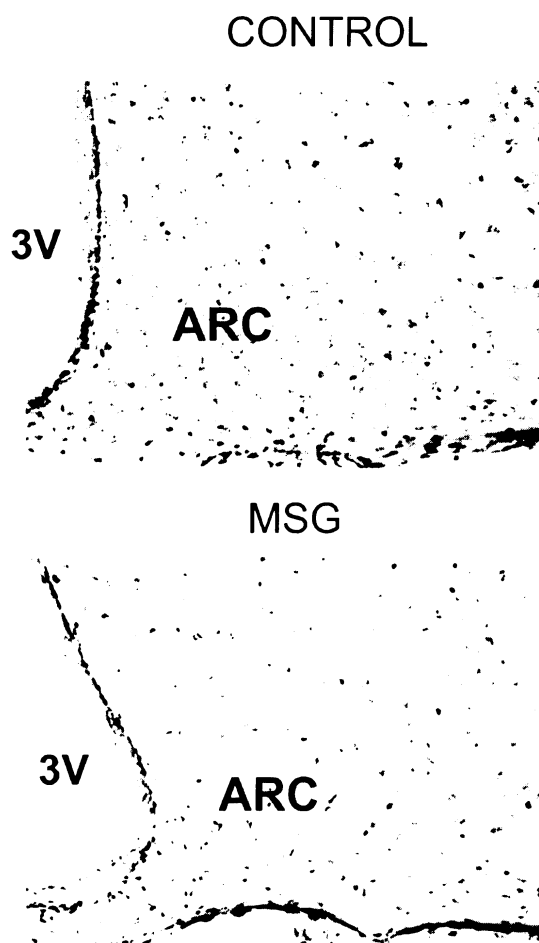


Fig. 2a

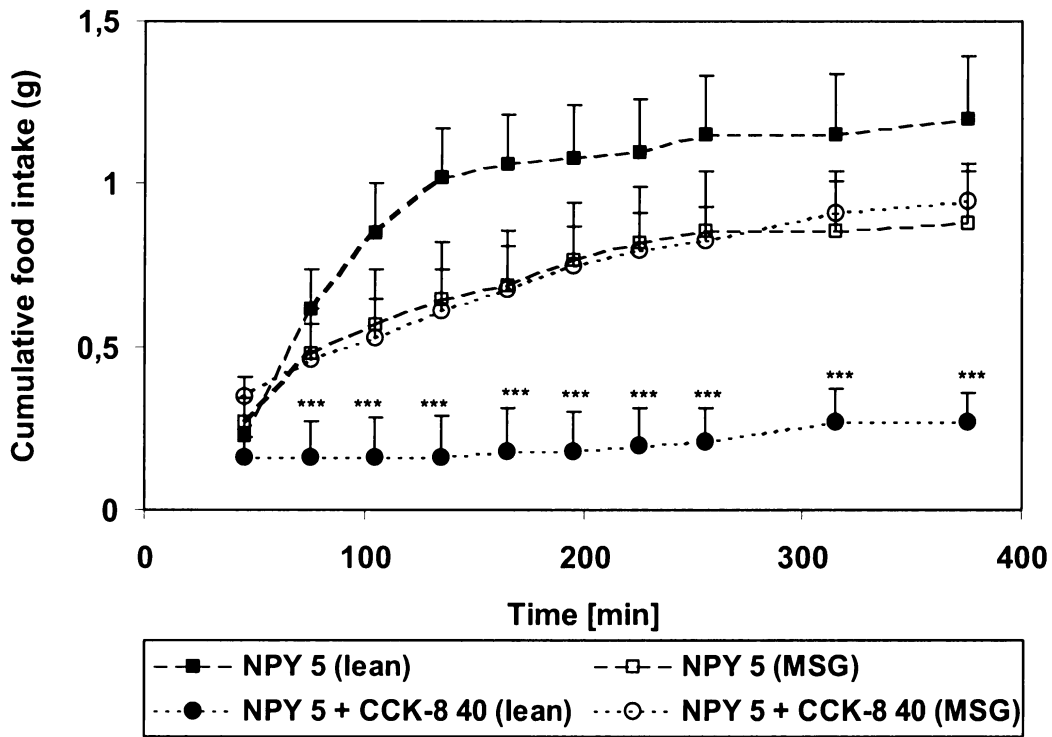


Fig. 2b

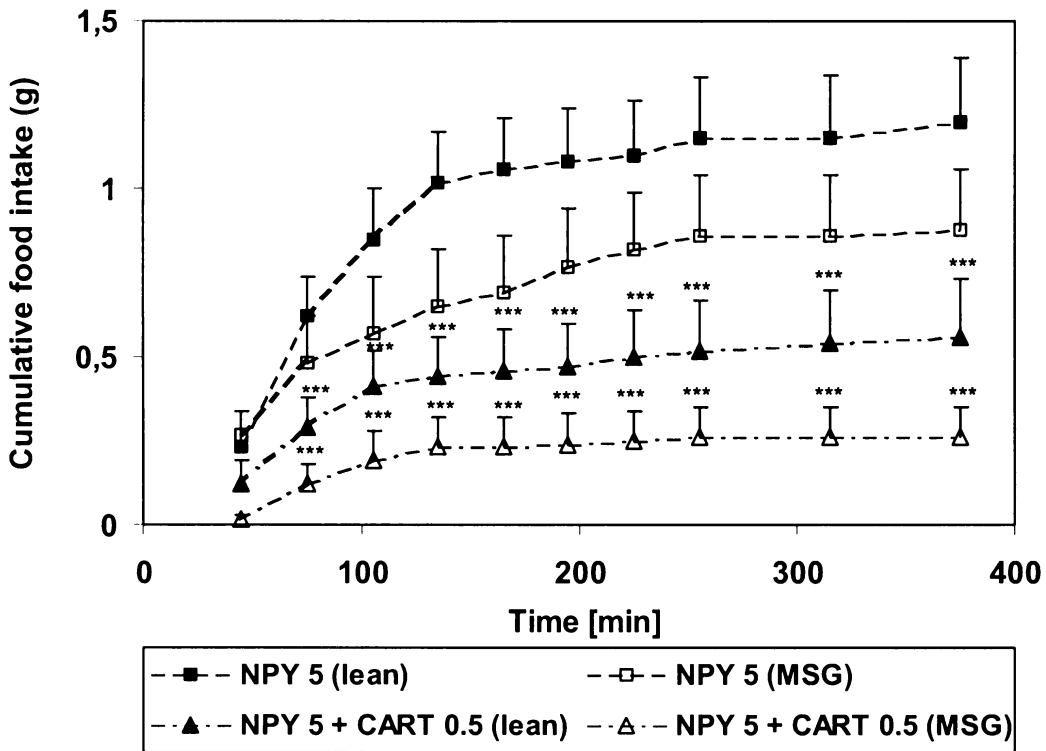


Fig. 3

