

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA KNUPLEŽ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA KNUPLEŽ

PRISOTNOST GRELINSKEGA RECEPTORJA IN ENCIMA GRELIN *O*-  
ACILTRANSFERAZE V KERATINOCITNI CELIČNI LINIJI

THE PRESENCE OF GHRELIN RECEPTOR AND ENZYME GHRELIN  
*O*-ACYLTRANSFERASE IN A KERATINOCYTE CELL LINE

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder in na Inštitutu za predklinične vede na Veterinarski fakulteti v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Valentine Kubale Dvojmoč.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Mojci Lunder in somentorici doc. dr. Valentini Kubale Dvojmoč za vso pomoč in znanje, ki sta mi ga posredovali v zadnjih dveh letih. Hvala za vse strokovne in življenjske nasvete ter vajino podporo.

Prav tako se zahvaljujem asist. dr. Jerneju Luzarju za pomoč pri izvedbi prenosov western.

## **Izjava**

**Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Mojce Lunder in somentorice doc. dr. Valentine Kubale Dvojmoč.**

**Eva Knuplež**

**Predsednica magistrske komisije:** prof. dr. Mirjana Gašperlin

**Mentorica:** izr. prof. dr. Mojca Lunder

**Somentorica:** doc. dr. Valentina Kubale Dvojmoč

**Članica magistrske komisije:** asist. dr. Jasna Omersel

# VSEBINA

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. GRELIN .....	1
1.1.1. Protivnetno in antioksidativno delovanje grelina .....	3
1.2. GRELIN O- ACILTRANSFERAZA .....	4
1.3. GRELINSKI RECEPTOR .....	4
1.3.1. Alternativni grelinski receptorji .....	6
1.3.2. Aktivacija receptorja GHSR-1a in znotrajcelični prenos signala .....	6
1.4. KOŽA KOT IMUNSKI ORGAN .....	7
1.4.1. Keratinociti in vnetni odziv .....	8
1.4.2. Luskavica in metabolni status organizma .....	9
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>11</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>12</b>
3.1. MATERIALI .....	12
3.1.1. Celične linije, gojišča in biološki material .....	12
3.1.2. Pufri in raztopine .....	13
3.1.3. Indikatorji .....	16
3.2. METODE .....	17
3.2.1. Gojenje celic .....	17
3.2.2. Priprava celičnih lizatov .....	18
3.2.3. Membransko frakcioniranje .....	19
3.2.4. Priprava lizata mišjega diencefalona .....	19
3.2.5. Merjenje koncentracije proteinov v posameznih lizatih .....	20
3.2.6. Elektroforeza .....	21
3.2.7. Prenos western in detekcija iskanih proteinov .....	21
3.2.8. Merjenje koncentracije $Ca^{2+}$ v citosolu s čitalcem mikrotitrskih plošč .....	22
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>24</b>
4.1. DOLOČANJE PRISOTNOSTI RECEPTORJA GHSR-1A IN ENCIMA GOAT Z METODO PRENOSA WESTERN IN IMUNODETEKCIJO .....	24
4.1.1. Detekcija receptorja GHS-R-1a .....	24
4.1.2. Detekcija encima GOAT .....	26
4.2. MERJENJE KONCENTRACIJE $Ca^{2+}$ V CITOSOLU .....	30
<b>5. RAZPRAVA</b> .....	<b>32</b>
<b>6. SKLEPI</b> .....	<b>37</b>

<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>38</b>
<b>8. DODATEK.....</b>	<b>46</b>
PRILOGA I.....	46
8.1. KEMIKALIJE IN OPREMA.....	46

## POVZETEK

Hormon grelin je edini do sedaj odkriti peptidni hormon, ki nastaja na periferiji in spodbuja občutek lakote ter vnos hrane v centralnem živčnem sistemu. Svoje učinke, ki so mnogoteri in niso omejeni le na centralni živčni sistem, grelin izvaja preko vezave na svoj receptor-receptor za sekretagoge rastnega hormona podtip 1a (GHS-R1a). Receptor in encim grelin *O*-aciltransferaza (GOAT), ki je odgovoren za pretvorbo grelina v aktivno obliko, se izražata v različnih tkivih, kjer grelin deluje. V nalogi smo si zadali cilj, da raziščemo prisotnost grelinskega receptorja in encima GOAT na modelu keratinocitne linije, in sicer v trajni celični liniji HaCaT. Prisotnost grelinskega receptorja in encima GOAT na keratinocitih bi odprla novo področje preučevanja vpliva grelina na delovanje keratinocitov, ki predstavljajo pglavitni del vrhnjice kože in sodelujejo pri njeni obrambni vlogi. Delovanje grelina na celice v koži bi lahko razložilo vzročno-posledično povezavo med povejšano telesno maso in pojavnostjo oziroma poslabšanjem nekaterih kroničnih vnetnih bolezni kože, kot je na primer luskavica. V prvem sklopu eksperimentalnega dela smo za dokazovanje prisotnosti obeh proteinov uporabili tehnike elektroforeze, prenosa western in detekcije s protitelesi z metodo izboljšane kemiluminiscence. V drugem delu smo za določanje aktivacije receptorja GHS-R1a uporabili metodo meritev porasta znotrajceličnega kalcija. V prvem delu receptorja in encima GOAT z izbranimi metodami nismo uspeli dokazati. Rezultati druge bolj občutljive metode so dodatno pokazali, da celična linija HaCaT grelinskega receptorja ne izraža. Prisotnosti receptorja na celični liniji HaCaT nismo dokazali, kar pa ne izključuje možnosti, da ga primarne linije keratinocitov pri patoloških pogojih, ki so prisotni ob kroničnih vnetnih bolezni, ne izražajo. Delo opravljeno v okviru magistrske naloge je, kljub začetnim negativnim rezultatom, odprlo nova vprašanja in ideje za preučevanje vpliva grelina na vnetne procese v koži.

## **ABSTRACT**

The hormone ghrelin is currently the only peptide peripherally produced hormone known to stimulate appetite and food intake in the central nervous system. Ghrelin carries out its many effects, that are not limited to the central nervous system, by binding to its receptor growth hormone secretagogue 1a (GHS-R1a). The receptor and enzyme (enzyme ghrelin O-acetyltransferase) GOAT, responsible for transforming ghrelin into an active form, are expressed in many different tissues where ghrelin exerts its effect. Our master thesis objective was to research the possible expression of the ghrelin receptor and GOAT enzyme in a model immortal keratinocyte cell line HaCaT. The presence of ghrelin receptor and GOAT enzyme in a model keratinocyte cell line would lead to investigations of ghrelin's mechanism of action on keratinocytes, which are the predominant cell type in skin and play an important part in the skin defense system. Ghrelin may be an important player acting on cells in the skin tissue and may have an important role in the manifestation or worsening of some chronic inflammatory skin diseases like psoriasis in obese patients. In the first part we used electrophoresis, western blot and immunoblotting with enhanced chemiluminescence method to detect both proteins. To measure activation of the receptor in the second part we used the method of measuring the rise of intracellular calcium concentration. The results of the first part of the master thesis showed no expression on the protein level. Similarly, the results of the second more sensitive method showed, that the HaCaT cell line does not express the receptor. We were unable to prove the presence of ghrelin receptor on the HaCaT cell line, which does not exclude the option of the receptor being expressed under inflammatory conditions, which are present during chronic inflammatory disorders. The work carried out for this master thesis has, despite preliminary negative results, lead to new questions and ideas for researching the possible effect of ghrelin on inflammatory processes in the skin.

## SEZNAM OKRAJŠAV

5-HT <sub>2C</sub>	serotoninski receptor tipa 2C (angl. 5- <b>hydroxytryptamine</b> 2C receptor)
7-TMR	sedem transmembranski receptor (angl. seven <b>transmembrane</b> receptor)
AMP	antimikrobni peptidi
BSA	goveji serumski albumin (okrajšano iz angl. <b>bovine serum albumin</b> )
Ca <sup>2+</sup>	kalcij
D1R	dopaminski receptor tipa 1
D2R	dopaminski receptor tipa 2
DMEM	Eaglov medij, modificiran po Dulbeccu (okrajšano iz angl. <b>Dulbecco's modified Eagle's medium</b> )
DMSO	dimetilsulfoksid (okrajšano iz angl. <b>dimethyl sulfoxide</b> )
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (angl. <b>ethylenediaminetetraacetic acid</b> )
ER	endoplazmatski retikulum
FBS	fetalni goveji serum (angl. <b>fetal bovine serum</b> )
GA	Golgijev aparat
GDP	gvanozin difosfat (okrajšano iz angl. <b>guanosine-diphosphate</b> )
GHS-R	receptor za sekretagoge rastnega hormona (angl. <b>growth hormone secretagogue receptor</b> )
GHSR-1a	receptor za sekretagoge rastnega hormona podtip 1a
GOAT	ghrelin O-acil transferaza (angl. <b>ghrelin O-acyltransferase</b> )
GPCR	receptor, sklopljen s proteinom G (angl. <b>G protein-coupled receptor</b> )
GTP	gvanozin trifosfat (angl. <b>guanosine-triphosphate</b> )
HEK 293 celice	humane embrionalne ledvične celice (angl. <b>human embryonic kidney</b> )
IL1 $\beta$ , IL1 $\alpha$	interlevkin 1 beta, interlevkin 1 alfa
IP <sub>3</sub>	inozitol trifosfat (angl. <b>inositol triphosphate</b> )
kDA	kKilodalton
MAPK	proteinska kinaza aktivirana z mitogenom (angl. <b>mitogen-activated protein kinase</b> )
MBOAT	membransko vezana O-acil transferaza (angl. <b>membrane bound O-acyltransferase</b> )



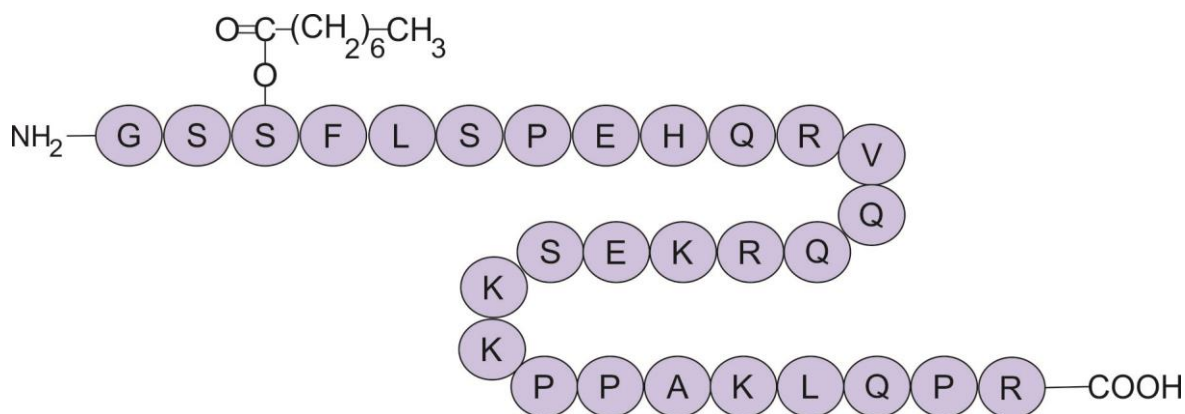
MC3R	melanokortinski receptor tipa 3
MHC	poglavitni kompleks tkivne skladnosti (angl. <b>m</b> ajor <b>h</b> istocompatibility <b>c</b> omplex)
MO	mikroorganizmi
mRNA	informacijska RNA (angl. <b>m</b> essenger RNA)
NaOH	natrijev hidroksid
NF- $\kappa$ B	jedrni transkripcijski element kapa B
NK	celice ubijalke (angl. <b>n</b> atural <b>k</b> iller cells)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PASI	indeks področja in resnosti luskavice (angl. <b>p</b> soriasis <b>a</b> rea and <b>s</b> everity <b>i</b> ndex)
PBS	fiziološka raztopina v fosfatnem pufru (angl. <b>p</b> hosphate <b>b</b> uffer <b>s</b> aline)
PVDF	poliviniliden difluorid
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. <b>s</b> odium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulfate)
TBS	tris pufer s fiziološko raztopino (angl. <b>t</b> ris <b>b</b> uffered <b>s</b> aline)
TBS-T	TBS pufer z dodatkom Tween-a
Th celice	T celice pomagalke (angl. <b>T</b> <b>h</b> elper cells)
TLR	Tollu podobni receptorji (angl. <b>T</b> oll <b>l</b> ike <b>r</b> eceptors)
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizirajoči faktor alfa (angl. <b>t</b> umor <b>n</b> ecrosis <b>f</b> actor <b>a</b> lfa)

# 1. UVOD

## 1.1. Grelin

Leta 1999 je Kojima s sodelavci odkril nov, telesu lasten ligand za receptor GHS-R (*iz angl. growth hormone secretagogue receptor*), ki ga je poimenoval grelin. Ime so skovali iz korenine glagola indoevropskega jezika "ghre", ki pomeni rasti, pri čemer so se navezali na njegovo delovanje - spodbujanje izločanja rastnega hormona (1).

Grelin v telesu nastane tako, da različne peptidaze v posttranslacijskih procesih cepijo njegov predhodnik preprogrelin na progrelin. Tega v Golgijevem aparatu (GA) peptidaze razcepijo na dva končna peptida: grelin in obestatin (2). Grelin je peptidni hormon, sestavljen iz 28 aminokislin (Slika 1). Na aminokislino serin na mestu 3 je v molekuli grelina pripeta oktanoilna maščobna veriga, ki je ključna za vezavo hormona na receptor in za njegovo delovanje (3). Vezavo maščobne verige na molekulo grelina opravlja membransko vezan encim, imenovan grelin *O*-aciltransferaza (GOAT) (4).



Slika 1: Aminokislinsko zaporedje grelina.

Grelin se v človeškem organizmu izraža v velikem številu različnih tkiv in organov, kar nakazuje na njegovo vpletenost v različne fiziološke procese. Glavno mesto nastanka grelina v telesu so enteroendokrine celice v sluznici želodca, od koder v največji meri prehaja v krvni obtok (5). V manjši meri se grelin izloča iz drugih tkiv, kot so npr. pljuča, tešče črevo, vito črevo (6), trebušna slinavka in hipotalamus (7).

Grelin ima poleg že zgoraj omenjene vloge spodbujanja izločanja ravnega hormona v človeškem organizmu še veliko drugih vlog. Je edini do sedaj odkriti periferni oreksigeni hormon (spodbuja vnos hrane). S svojim delovanjem v CŽS, natančneje v hipotalamusu, vpliva na povečanje apetita in posledično spodbuja vnos hrane (8). Prav tako vpliva na porabo energije v telesu tako, da zmanjša porabo maščob in poveča uporabo ogljikovih hidratov v presnovnih procesih. Dolgoročno kombinacija učinkov grelina povzroči pridobivanje telesne mase, ki je posledica kopičenja maščobnega tkiva (9). Vnos hrane grelin pogojuje tudi preko delovanja na holinergično dopaminergični (10) in opioidni sistem (11) nagrajevanja v možganih. Grelin tako motivira in spodbuja k vnosu energijsko bogate hrane ter povzroča vznburjenje čutnih zaznav v pričakovanju hranjenja (12, 13). V možganih deluje na amigdalo in hipokampus, kjer vnos hrane povezuje s področji odgovornimi za učenje, spomin, ter motivacijo (14, 15). Dokazano se v organizmu ob odzivu na akutni psihološki stres raven grelina poveča, kar posledično vodi v zvišan vnos energijsko bogate hrane (16).

Da je regulacija vnosa hrane in vpliv na energijski metabolizem najpomembnejša funkcija grelina, dokazuje regulacija izločanja hormona in njegov serumski nivo, ki natančno sovpada stanju prehranjenosti organizma. Najvišji serumski nivo grelin doseže med obdobji stradanja ali tik pred pričakovanim vnosom hrane, medtem ko njegov nivo po zaužitem obroku občutno pade (17). Serumski nivo grelina je kompenzatorno nižji pri posameznikih s prekomerno telesno težo in višji pri posameznikih obolelih za anoreksijo nervozo (18).

V možganih ima grelin ob vplivu na sistem nagrajevanja in vpletenosti v mehanizem nastanka odvisnosti (19, 20) še zaščitni učinek na dopaminske nevrone v substanci nigri (21), vpliv na anksioznost (22), depresijo (23) in na cirkadiani ritem (24). V prebavnem traktu grelin spodbuja izločanje želodčne kisline (25) in v kombinaciji s hormonom motilinom, ki prav tako nastaja v prebavnem traktu, spodbuja motiliteto želodca (26). V preostalih tkivih grelin kot pomemben člen v metabolični hormonski zanki vpliva na homeostazo glukoze (27), delovanje srčno žilnega sistema (28), razmnoževalne funkcije (29) in na kostno gostoto (30).

### 1.1.1. Protivnetno in antioksidativno delovanje grelina

Ne dolgo nazaj so odkrili, da igra periferni oreksigeni hormon grelin pomembno vlogo tudi v procesih vnetja in aktivaciji imunskega sistema. Receptorji za grelin so prisotni na nekaterih celicah imunskega sistema (T-limfociti, monociti). Prav tako nekatere izmed celic imunskega sistema v manjši meri same proizvajajo in izločajo grelin (dendritične celice, T-limfociti in monociti) (31). Količina izločenega grelina in ekspresija grelinskega receptorja neposredno korelirata z imunsko aktivacijo celic. Ob aktivaciji celic se sorazmerno poveša količina izločenega grelina in izraženega receptorja na površini T-limfocitov (32). Med procesi imunske aktivacije deluje grelin protivnetno tako, da po eni strani zavira ekspresijo provnetnih citokinov IL-6, IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$  v T-limfocitih, monocitih in dendritičnih celicah ter provnetni odgovor in aktivacijo jedrnega transkripcijskega elementa kappa B (NF- $\kappa$ B) v endotelijskih celicah (33). Po drugi strani grelin spodbuja izločanje protivnetnega citokina IL-10 (34). Ob tem grelin dokazano *in vitro* in *in vivo* vpliva na diferenciacijo Th17 celic, soudeleženih pri mnogih kroničnih vnetnih in avtoimunih vnetnih boleznih preko mTor / STAT3 signalne poti (35). Dodatno so *in vivo* dokazali, da aplikacija grelina pri nekaterih vnetnih stanjih, kot sta sepsa in kolitis, izboljša stanje pri bolnikih (32) in da aplikacija grelina izboljša potek bolezni pri nekaterih kroničnih vnetnih stanjih (36).

Zaščitno in protivnetno delovanje grelina lahko deloma pripišemo njegovemu antioksidativnemu delovanju. Grelina namreč zmanjšuje nastanek reaktivnih kisikovih spojin v mitohondrijih, jih tako ščiti pred poškodbami (37) in v nekaterih živalskih modelih spodbuja delovanje antioksidativnih encimov, kot sta na primer katalaza in superoksid dismutaza (38).

## 1.2. Grelin O- aciltransferaza

Encim grelin *O*-aciltransferaza (GOAT) spada v družino membransko-vezanih acil transferaz (MBOAT), ki so odgovorne za vezavo maščobnih verig na peptide in lipide (39). Družina encimov MBOAT je močno ohranjena med evkarionti in tudi prokarionti, kar kaže na pomembnost in vpletenost maščobnih modifikacij v biološke procese (40).

GOAT je do sedaj edini odkriti predstavnik družine MBOAT, ki opravlja vezavo srednje dolgih maščobnih verig (4) in hkrati edini, ki katalizira vezavo oktanoilne kisline pri višjih organizmih (41). Des-acil grelin je pri človeku edini do sedaj poznan substrat za encim GOAT (4). Za vezavo des-acil grelina v aktivno mesto encima je ključna ohranitev zaporedja štirih aminokislin na N-končnem mestu peptida. Čeprav je v človeškem organizmu dokazano aktivna le oktanoilirana oblika grelina, je encim na substrat *in vitro* sposoben pripeti še heksanoilno in dekanoilno skupino (42).

Encim GOAT se podobno kot grelin v največji meri izraža v želodcu, možganih in trebušni slinavki, ki so tkiva, odgovorna za procese uravnavanja vnosa hrane in za energijsko homeostazo (43). Znotraj celice se GOAT nahaja vezan na membrano endoplazematskega retikuluma (ER), kar so dokazali z obstojem oktanoiliranega progrelina, ki se šele po prihodu v GA razcepi na zrelo obliko grelina. (44) Encim sestavlja 11 transmembranskih domen in ena daljša zanka na citosolni strani s skupno molekulsko maso približno 50 kDA in aktivnim mestom na C-terminalnem citosolnem delu (45).

## 1.3. Grelinski receptor

Receptor GHS-R so odkrili in uspešno klonirali leta 1996, ko so iskali receptor preko katerega sintetizirani sekretagogi ravnega hormona spodbujajo izločanje ravnega hormona (46). Receptor je ob odkritju veljal za tako imenovan 'receptor siroto', saj njegov endogeni ligand ni bil poznan. Spada v družino membranskih receptorjev s sedmimi transmembranskimi zankami (7TM-R), včasih poimenovanih tudi s proteinom G sklopljeni receptorji, ki predstavljajo največjo superdružino receptorjev v človeškem organizmu (47).

Grelinski receptor obstaja v dveh izoformah – GHS-R1a in GHS-R1b, ki nastane z alternativnim izrezovanjem mRNA (48). Izoforma receptorja GHS-R1a izkazuje polno afiniteto do vezave hormona grelina in sekretagogov ravnega hormona. Sestavlja jo sedem trans-membranskih domen iz 366 aminokislin s skupno molekulksko maso 41 kDA (46). Receptor so glede na njegovo strukturo in lastnosti uvrstili v majhno družino receptorjev za peptide in neuropeptide, ki med drugim vključuje receptor za motilin, nevrotenzin 1 in nevrotenzin 2 (49). Zanj je za razliko od nekaterih pripadnikov te družine in ostalih 7TM-R značilna visoka konstitutivna aktivnost, to je aktivacija receptorja v odsotnosti liganda. Ta se giblje v okolici 50 % (50), kar pomeni, da je v fizioloških pogojih tudi v odsotnosti grelina prisotna določena aktivacija receptorja, preko katere se prenaša signal v celico. Izoforma receptorja GHS-R1a se v največji gostoti izraža v možganih, in sicer v anteriornem režnju hipofize, kjer grelin deluje na sproščanje ravnega hormona in v arkuatnem jedru hipotalamusa, kjer izkazuje svoj oreksigeni učinek. V perifernih tkivih se gen, ki kodira zapis za GHS-R1a izraža v ščitnici, vranici, trebušni slinavki, srčni mišici, nadledvičnih žlezah, spolnih žlezah in želodcu (49), kar sovpada z mnogimi ostalimi poznanimi funkcijami grelina.

Izoformo GHS-R1b sestavlja manjše število aminokislin kot GHS-R1a, in sicer le 298, ki tvorijo 5 transmembranskih domen (48). GHS-R1b je dolgo veljal za neaktivno obliko receptorja, saj grelin in sekretagogi ravnega hormona nimajo afinitete do vezave nanj in prav tako ob hkratni inkubaciji *in vitro* ne sprožijo zaznavnega učinka (51). Pred kratkim je K. Chow s sodelavci odkril, da je GHS-R1b na membrani ER sposoben tvoriti heterodimere z GHS-R1a. Ugotovili so, da GHS-R1b preko procesa oligomerizacije na membrani ER 'ujame' izoformo GHS-R1a, s tem zmanjša njeno izražanje na celični membrani in posledično zavira visoko konstitutivno aktivnost receptorja (52). Ker se GHS-R1b izraža v različnih perifernih tkivih, tudi neodvisno od GHS-R1a, predvidevajo, da ima izoforma GHS-R1b dodatne trenutno še neznane biološke funkcije (49).

GHS-R1a tvori heterodimere še z nekaterimi drugimi receptorji, na primer z receptorjem za adenzin (53), receptorjem za rastni hormon (51), dopaminskima receptorjema tipa 1 (D1R) (54) in tipa 2 (D2R) (55), serotoniniskim receptorjem 5-HT<sub>2C</sub> (54) in receptorjem za melanokortin MC3R (56). Aktivna oblika receptorja GHS-R dokazano tvori tudi homodimere tako na membrani ER, kot na citoplazemski membrani.

### **1.3.1. Alternativni grelinski receptorji.**

Zanimivo je dejstvo, da grelin in njegova neacilirana oblika, ki je dolgo veljala za neaktivno, dokazano inhibirata apoptozo kardiomiocitov in endotelijskih celic. Pri tem je pomembno to, da kardiomiociti in endotelijske celice ne izražajo receptorja GHS-R1a (57). Odkrili so, da grelin in v manjši meri tudi des-acilgrelin delujeta protivnetno v centralnem živčnem sistemu preko aktivacije do sedaj še neodkritih receptorjev (33). Tudi nekatera druga tkiva imajo dokazano afiniteto do vezave grelina, neaciliranega grelina ali obeh. Hormona naj bi svoje učinke tako lahko posredovala preko drugih receptorjev, ki še niso odkriti (49).

### **1.3.2. Aktivacija receptorja GHSR-1a in znotrajcelični prenos signala**

Grelin in drugi agonisti receptorja GHS-R1a po vezavi nanj povzročijo konformacijsko spremembo receptorja, ki olajša interakcijo z G-proteini (gvaninski nukleotidni regulatorni proteini). Ti so odgovorni za prenos znotrajceličnega signala med aktiviranim receptorjem in efektorjem ali sekundarnimi sporočevalci. Sestavljeni so iz treh podenot –  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$ . Aktivacija receptorja povzroči konformacijsko spremembo v podenoti  $\alpha$ , kar vodi do sproščanja gvanozin-difosfata (GDP) iz proteina in vezave gvanozin-trifosfata (GTP). Podenota  $\alpha$ , ki ima vezan GTP, se sprostí iz G-proteina in lahko aktivira različne G-proteine oziroma druge znotrajcelične prenašalce signala, hkrati pa deluje kot GTP-aza, kar pomeni, da lahko GTP hidrolizira nazaj do GDP ter se ponovno veže na  $\beta\gamma$  dimer (58). Za grelinski receptor so v različnih tkivih opisane različne znotrajcelične poti prenosa signala. Najbolj raziskana in najbolj opisana pot prenosa signala je aktivacija znotrajceličnih prenašalcev, ki preko nastanka inozitol trifosfata ( $IP_3$ ) vodi do povišane koncentracije znotrajceličnega kalcija v celicah hipofize in hipotalamusa. Med ostale poti prenosa signala preko receptorja GHS-R1a v celico prištevamo še aktivacijo AMP-aktivirane protein kinaze, modulacijo PI3K/AKT signalne poti, aktivacijo m-TOR signalne poti in aktivacijo MAP kinaze (59).

## 1.4. Koža kot imunski organ

Koža je največji organ človeškega telesa. Njena funkcija je predvsem zaščitna, saj pripomore k ohranjanju homeostaze organizma, tako da deluje kot ločnica med notranjim okoljem vsakega posameznika in njegovo okolico. Čeprav se kožo velikokrat enači s pojmom pregrada oziroma bariera, ta organ vseeno omogoča omejeno komunikacijo z okolico. Takšno dobro regulirano ravnotežje med zaščito in dvosmernim prenosom signala ji omogoča edinstvena sestava iz mreže specializiranih celic in ostalih strukturnih ter molekularnih gradnikov (60).

Sestavne plasti kože tvorijo mehansko pregrado (celice epitelija) in so hkrati sposobni imunskega odziva (Langerhansove celice, makrofagi, mastociti, limfociti, ...). Le-ta je lahko del prirojenega imunskega sistema (hiter in nespecifičen) ali pridobljenega imunskega sistema (specifičen, a počasnejši). Pri obrambni funkciji kože ne smemo zanemariti vloge nekaterih komenzalnih bakterij, ki poseljujejo površino kože in tako ovirajo dostop patogenim bakterijam ter razrast oportunističnih bakterij, hkrati pa so sposobne izločati lastne antimikrobne peptide (61).

Prirojeni imunski sistem kože sestavljajo poleg mehanske pregrade še levkociti, kot so na primer celice ubijalke (celice NK), dendritične celice, fagociti in monociti ter topni antimikrobni peptidi (AMP), kemokini, citokini in sistem komplementa. Prirojen imunski odziv prav tako pogojuje jakost in vrsto pridobljenega imunskega odziva, čigar pričetek je običajno aktivacija antigen predstavitvenih celic v epidermisu (Langerhansove celice) in dendritičnih celic v dermisu ter se zaključi z T-limfociti oziroma protitelesi, ki jih izločajo B-limfociti (62). Tako pri prirojenem, kot pri pridobljenem imunskem odzivu sodelujejo tudi osnovni gradniki epidermisa kože - keratinociti (63). Aktivacija imunskega odziva v koži je tesno reguliran proces, ki temelji na ravnotežju med več sestavinami kože in sposobnostjo razlikovanja med škodljivimi patogeni in neškodljivimi mikroorganizmi (MO), ki poseljujejo površino kože ter med telesu lastnimi snovmi. Kadar se to ravnotežje podre, lahko neuravnana imunska aktivacija vodi v okužbo oziroma kronično vnetno stanje in patogenezo nekaterih bolezni, kot je na primer luskavica (62).



#### 1.4.1. Keratinociti in vnetni odziv

Keratinociti sestavljajo večinski del vrhnjice kože (epidermisa) (64). Kombinacija različno diferenciranih keratinocitov in kisla hidro-lipofilna narava kože, ki je posledica prisotnosti sebuma, znoja in različnih AMP ter lipidov tvorijo mehansko pregrado kože. Spremembe v lipidni sestavi kože ali diferenciaciji keratinocitov vodijo v poškodbo mehanske pregrade kože in so odgovorne za nekatera patološka stanja kot na primer atopični dermatitis in *ichthyosis vulgaris* (ihtioza) (61).

Svojo vlogo v prirojenem imunskem odzivu keratinociti opravljajo tako, da izločajo sestavne dele sistema komplementa, citokine, kemokine, antimikrobne peptide in metabolite arahidonske kisline in tako posredujejo informacije iz okolja do imunskih celic v nižjih plasteh kože (60). Keratinociti na svoji površini in v svojih endosomih izražajo receptorje, ki prepoznajo s patogeni povezane molekulske vzorce PAMP (iz angl. *pathogen-associated molecular patterns*) (61). Večja podskupina teh receptorjev so Tollu podobni receptorji TLR (iz angl. *toll like receptors*), ki prepoznajo značilne in ohranjene elemente patogenov, med drugim tudi sestavino celične stene gramnegativnih bakterij – lipopolisaharide (63). Ustrezna prepoznavna potencialno patogenih elementov jim omogoča aktivacijo NF- $\kappa$ B in regulatornega faktorja za interferon, ki naprej inducirata sintezo TNF in interferonov tipa 1 (60). Le- ti so v večjih količinah v nezrelih oblikah IL-1 $\beta$  in IL-1 $\alpha$  nakopičeni znotraj keratinocitnih celic in lahko hitro po ustreznem dražljaju posredujejo svoje učinke in aktivirajo kaskado vnetnih reakcij (65). Aktivirani keratinociti so v 'stresnih pogojih' sposobni izločati več kot 15 različnih mediatorjev vnetja, ki regulirajo tako avtokrini kot parakrini vnetni odziv (66).

Avtokrino keratinociti delujejo na lastne citokinske receptorje, ki jih izražajo na svoji površini, kar spodbudi nastanek novih citokinov in okrepitev vnetnega odgovora. Citokini in kemokini, ki nastanejo v keratinocitih, prav tako delujejo parakrino, in sicer so odgovorni za spodbujanje migracije levkocitov na področje poškodbe oziroma vnetja in aktivacijo dendritičnih antigen predstavitev celic ter Langerhansovih celic (65).

Keratinociti pa naj bi med vnetnimi stanji tudi sami delovali kot antigen predstavitevne celice, saj so v patoloških pogojih sposobni izražati poglobljeni kompleks tkivne skladnosti II (MHC – iz *angl. major histocompatibility complex*), ki je na površini celice odgovoren za predstavitev antigena T-limfocitom (67). V posebnih okoliščinah, ki vključuje obsežne poškodbe kože, na primer pri hudih sončnih opeklinah, lahko vnetne mediatorje, ki izvirajo iz keratinocitov, zaznamo tudi v sistemske krvnem obtoku (68).

#### **1.4.2. Luskavica in metabolni status organizma**

Luskavica je kronična vnetna bolezen kože, ki se pojavlja v zagonih (izboljšanja, poslabšanja) in se izraža v obliki čezmernega luščenja in obnavljanja keratinocitov in hiperkeratoze. Zanj je značilen vdor imunskih celic v plasti kože in razrast krvnih žil (69). Med boleznijo se v večji meri izražajo celice Th1, Th17 in Th22, ki v tkivu kože proizvajajo pro-vnetne citokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 in IL-22 (70). Natančni vzroki za pojav bolezni za zdaj ostajajo neznani, vendar naj bi pri tveganju za pojav bolezni imeli vlogo tako genetski kot okoljski dejavniki. Med dražljaje, ki vplivajo na odziv imunskega sistema in so posledično lahko udeleženi pri izbruhu bolezni, prištevamo dejavnike, kot so kajenje, okužbe, stres in debelost (71). Osebe, pri katerih se razvije luskavica, so nato podvržene večjemu tveganju za kardiovaskularne zaplete, saj le-ta predstavlja neodvisen dejavnik tveganja za miokardni infarkt (72).

Povezavo med luskavico oziroma indeksom področja in resnosti luskavice PASI (iz *angl. psoriasis area and severity index*) ter telesno maso so dokazali na več različnih primerih. Študija izvedena v bolnišnici na Kitajskem dokazuje, da zvečan indeks telesne mase negativno vpliva na indeks PASI (73). Indeks telesne mase večji kot 25 naj bi spadal med napovedne dejavnike za slabše klinične izide poteka bolezni luskavice (74). Povezavo med debelostjo in luskavico prav tako prikazujejo študije, ki dokazujejo zmanjšanje indeksa PASI in števila zagonov bolezni po gastričnem obvodu (75).

Podobno kot pri luskavici je pri debelosti prisotno kronično vnetno stanje v telesu, ki naj bi prispevalo ne samo pri tveganju za zagon luskavice, marveč tudi povečalo stopnjo PASI (69).

Belo maščobno tkivo in adipociti, ki ga sestavljajo, tvorijo endokrini organ, saj so sposobni izločati citokine - adipokine, med katerimi je najbolj znan leptin. Gre za hormon, ki podobno kot grelin, igra vlogo pri uravnavanju energijskega ravnovesja v telesu (76). Leptin v organizmu izkazuje grelinu nasprotne učinke, in sicer je najbolj poznan po tem, da zmanjšuje občutek lakote in vnos hrane (77). Leptin deluje tudi v imunskem sistemu, saj spodbuja proliferacijo Th1 in Th17 celic ter drugih vnetnih mediatorjev, udeleženih v vnetnih procesih (78). Skupaj s svojim neposrednim delovanjem na proliferacijo keratinocitov, se tako leptin vedno bolj uveljavlja kot pomemben povezovalni dejavnik med debelostjo in stopnjo PASI ter pojavnostjo zagonov luskavice.

Neposredni dokazi o vplivu grelina na luskavico in njegovo udeležbo pri poteku bolezni za zdaj še niso objavljeni. Negativno korelacijo med serumskim nivojem grelina in stopnjo PASI so dokazali v manjši klinični študiji. Ko so iste posameznike zdravili z imunosupresivnim ciklosporinom, so izginile razlike v serumskih nivojih grelina med njimi in zdravimi posamezniki (79). Podobno je v slabše zastavljeni klinični študiji odkril Ucak s sodelavci, ki je ob tem dokazal, da imajo bolniki, oboleli z luskavico višji serumski nivo grelina kot zdrave osebe (80). V predhodnih raziskavah na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani so odkrili, da celična linija keratinocitov HaCaT izraža mRNA za GHS-R1a in encim GOAT, česar do sedaj v keratinocitni liniji še niso dokazali (81). To odkritje dodatno spodbuja raziskovanje do sedaj še neznanega delovanja grelina v vnetnih procesih kože.

## 2. NAMEN DELA

Za nekatera kronična vnetna stanja, kot je na primer luskavica, so odkrili neposredno povezavo med metabolnim statusom in klinično sliko ter prognozo bolezni. Prav tako so dokazali, da izguba telesne mase pripomore k izboljšanju stanja, vendar natančen mehanizem, ki povezuje prehranjenost organizma ter pojav vnetja še ni razjasnjen. Eden izmed možnih udeleženih dejavnikov v patogenezi bolezni je tudi hormon grelin, ki v telesu deluje preko spodbujanja občutka lakote v CZS. Ob tem pa v različnih tkivih preko delovanja na svoj receptor GHS-R1a izraža še preostale, med drugim tudi protivnetne učinke.

V magistrski nalogi smo želeli dokazati obstoj grelinskega receptorja in encima, odgovornega za pretvorbo grelina v aktivno obliko v celični liniji HaCaT, ki predstavlja model za človeško keratinocitno linijo. Informacija o izražanju receptorja in/ali encima v modelni keratinocitni liniji bi umestila grelin na seznam enega od možnih dejavnikov, udeleženih pri patogenezi vnetja v koži.

Delo bo razdeljeno na dva glavna sklopa. V prvem sklopu bomo poskušali dokazati prisotnost obeh proteinov z metodo elektroforeze, prenosa western in detekcijo z ustreznimi protitelesi v različno pripravljenih lizatih celic HaCaT. Kot pozitivno kontrolo bomo uporabili celično linijo HEK 293 GHS-R1a, ki je stabilno transfecirana z receptorjem GHS-R1a in homogenizat mišjega diencefalona.

V drugem sklopu bomo preverili potencialno aktivacijo receptorja preko merjenja koncentracije znotrajceličnega kalcija ob stimulaciji z agonistom grelinom. Tudi v tem primeru bomo kot kontrolo uporabili celice HEK 293 GHS-R1a.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. Materiali

##### 3.1.1. Celične linije, gojišča in biološki material

<i>Celična linija</i>	<i>Izvor</i>	<i>Lastnosti</i>
<i>HEK 293 GHS-R1a</i>	F.F. Casanueva (Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Španija)	Humane embrionalne ledvične celice (HEK 293), ki stabilno izražajo gen za grelinski receptor GHS-R1a.
<i>HaCaT</i>	AddexBio	Spontano transformirana trajna celična linija, ki izkazuje lastnosti normalne diferenciacije in keratinizacije kože (82).

<i>Hranilni medij</i>	<i>Sestava hranilnega medija</i>	<i>Priprava in shranjevanje</i>
<i>HEK 293 GHS-R1a</i>	88mL advanced DMEM (Gibco) 10 mL govejega fetalnega seruma (ATCC) 1 mL L- Glutamin (Sigma) 1mL penicilin/streptomycin (Sigma) 250 µL geneticin 418 (Termo Fisher)	Medije smo pripravljali s tehnikami aseptičnega dela v komori z laminarnim pretokom zraka. Po pripravi smo medije shranjevali v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C.
<i>HaCaT</i>	88 mL advanced DMEM (Gibco) 10 mL goveji fetalni serum (ATCC) 1 mL L-Glutamin (Sigma) 1 mL penicilin/streptomycin (Sigma)	

##### Mišji diencefalon

Vzorec mišjih možganov linije C57BL/6J smo pridobili iz Centra za genomiko živali na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani. Za delo z živalmi je Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin izdala dovoljenje U34401-412014/4. Miši so žrtvovali v skladu z etičnimi standardi in načeli. Tkivo mišjega diencefalona smo shranjevali v zamrzovalniku pri temperaturi -80°C.

### Protitelesa

Primarna protitelesa proti receptorju GHS-R1a smo razdelili na alikvote po 10 µL in jih shranili v zamrzovalnik na -20°C. Primarna protitelesa proti encimu GOAT smo razdelili na alikvote po 20 µL in jih shranili v zamrzovalnik na -20°C. Obe vrsti primarnih protiteles so validirali za uporabo pri prenosu western in dajeta pozitivni odziv pri mišjem in človeškem lizatu možganskega tkiva. Kot sekundarna protitelesa smo uporabili protitelesa, konjugirana z encimom hrenovo peroksidazo, ki smo jih prav tako shranjevali na -20°C.

<i>Protitelesa</i>	<i>Proizvajalec</i>	<i>Kataloška št.</i>	<i>Gostitelj</i>	<i>Koncentracija</i>
<i>Anti-GHS-R1a</i>	Abcam	95250	Zajec	0,7 mg/mL
<i>Anti-GOAT</i>	Abcam	170690	Zajec	0,7 mg/mL
<i>Kozja protizajčja konjugirana s HRP</i>	Millipore	12-348	Koza	1 mg/mL

### **3.1.2. Pufri in raztopine**

<i>Pufer / raztopina</i>	<i>Sestava</i>	<i>Priprava in shranjevanje</i>
<i>10 ×PBS</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 80 g NaCl</li><li>• 2 g KCl</li><li>• 36,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O</li><li>• 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li><li>• prečiščena voda do 1000 mL</li></ul>	Sestavine raztopimo v 1 litru destilirane vode. Shranjujemo ga pri sobni temperaturi
<i>PBS + EDTA (0,02%)</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 500 mL 1×PBS</li><li>• 537 µL 0,5 M EDTA</li></ul>	0,02% raztopino PBS + EDTA sterilno prefiltrirano s Stericup vakum filter sistemom (Merck). Raztopino shranjujemo v hladilniku.

<i>1 × RIPA</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 mM Tris HCl (pH 7.5)</li> <li>• 150 mM NaCl</li> <li>• 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA</li> <li>• 1 mM EGTA</li> <li>• 1% NP-40</li> <li>• 1% natrijev deoksiholat</li> <li>• 2,5 mM natrijev pirofosfat</li> <li>• 1 mM β-glicerofosfat</li> <li>• 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></li> <li>• 1 μg/mL leupeptin</li> </ul>	<p>10 μL 10 × RIPA (Cell-signaling Technology) lizirnega pufru smo dodali k 990 μL Milli-Q prečiščene vode.</p> <p>Dobljen 1 × RIPA pufer smo shranili v zmrzovalniku pri temperaturi -20 °C</p>
<i>Pufer za prenos western</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 24 TRIS (Sigma)</li> <li>• 77 mM glicin</li> <li>• 20 % metanol</li> <li>• 0,575 % SDS</li> <li>• prečiščena voda do 1000 mL</li> </ul>	<p>Sestavine raztopimo v 1 litru destilirane vode.</p> <p>Shranjujemo ga v hladilniku.</p>
<i>10 × TBS</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 30 g tris baze</li> <li>• 80 g NaCl</li> <li>• 2 g KCl</li> <li>• prečiščena voda do 1000 mL</li> </ul>	<p>Sestavine raztopimo v 1 litru destilirane vode.</p> <p>Shranjujemo ga na sobni temperaturi.</p>
<i>0,05% raztopina TBS-T</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mL 10 × TBS</li> <li>• 50 μL Tween® 20</li> <li>• prečiščena voda do 100 mL</li> </ul>	<p>V raztopino 1× TBS s pipeto počasi dodamo 50 μL Tween® 20 (Sigma Aldrich).</p> <p>Raztopino pripravimo tik pred uporabo.</p>
<i>Barvilo za nanos ( 3 × SDS loading dye )</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 187,5 mM Tris HCl, pH= 7,0</li> <li>• 6% SDS</li> <li>• 30% glicerol</li> <li>• 0,03 % bromfenol modro</li> </ul>	<p>Barvilo za nanos shranjujemo pri sobni temperaturi.</p>
<i>Blokirni pufer</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mL 0,05% TBS-T</li> <li>• 0,5 g posnetega mleka v prahu</li> </ul>	<p>Raztopino blokirnega pufru pripravimo tik pred uporabo.</p>

<i>Raztopina za inkubacijo primarnimi protitelesi</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mL 0,05% TBS-T</li> <li>• 0,1 g BSA</li> </ul>	Raztopino za inkubacijo s primarnimi protitelesi pripravimo tik pred uporabo.
<i>0,1 % raztopina TBST</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 mL 10 × TBS</li> <li>• 50 µL Tween® 20</li> <li>• prečiščena voda do 50 mL</li> </ul>	V raztopino 1× TBS s pipeto počasi dodamo 50 µL Tween® 20 (Sigma Aldrich). Raztopino pripravimo tik pred uporabo.
<i>Raztopina za inkubacijo sekundarnimi protitelesi</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mL 0,1% TBS-T</li> <li>• 0,1 g BSA</li> </ul>	Raztopino za inkubacijo s sekundarnimi protitelesi pripravimo tik pred uporabo.
<i>Pufer B</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 mM Hepes</li> <li>• 50 mM NaCl</li> <li>• 1 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 2 mM EDTA</li> </ul>	Pufer shranjujemo v hladilniku.
<i>Pufer za odstranjevanje vezanih protiteles ( ang. stripping buffer)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 31,25 mL</li> <li>• 1M tris HCl,</li> <li>• 3,496 mL</li> <li>• 14,3 M 2-merkaptoetanol</li> <li>• 10 g SDS</li> <li>• prečiščena voda do 500 mL</li> </ul>	Pufer shranjujemo pri sobni temperaturi.



### 3.1.3. Indikatorji

#### Fura-2 AM z dodatkom 2-odstotne pluronske kisline F-127

Fura-2 acetoksi-metil ester (AM) (Molecular Probes), fluorescenčno barvilo, ki omogoča meritev koncentracije znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$  in ima eksitacijski vrh med 300–400 nm ter emisijski vrh pri 510 nm, smo pred poskusom raztopili v DMSO z dodatkom 2-odstotne pluronske kisline F-127. Fura-2 AM v obliki estra prehaja celično membrano, nakar ga po prihodu v celico nespecifične celične esteraze razcepijo in Fura-2 v obliki hidrofilne kisline ostane ujeta v celici (83).

#### SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat ('Femto')

Femto substrat (ThermoFisher Scientific) je substrat za encim hrenovo peroksidazo, s katero so konjugirana sekundarna protitelesa vezana na preiskovani protein na membrani. Gre za stabilen substrat na osnovi strukture luminola, ki omogoča pojav ojačane kemiluminiscence in detekcijo proteinov v nizkem femtogram območju. Reagent je sestavljen iz ločenih raztopin substrata in peroksida, ki se zmešata pred pripravo.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Gojenje celic

#### HaCaT

Celice HaCaT smo gojili v inkubatorju pri nadzorovani temperaturi 37°C in v navlaženi atmosferi, ki je vsebovala 5 % CO<sub>2</sub>. Rast, obliko in gostoto celic smo vsakodnevno preverili pod mikroskopom. Celice smo subkultivirali po potrebi, ko so dosegle 90- do 100-odstotno gostoto (v 3- do 4-dnevnih presledkih). Za subkultivacijo smo naprej uporabili postopek, pri katerem smo celice dlje časa izpostavili tripsinu, nato pa smo postopek ustrezno prilagodili, da bi zmanjšali čas izpostavljenosti tripsinu, saj lahko poškoduje celice in proteine, ki jih celica izraža.

Pri prvem postopku subkultivacije smo celicam odlili hranilni medij in jih sprali s sterilnim PBS pufrom. Celicam smo nato dodali 5 mL raztopine 0,02 % EDTA v PBS in s pipeto dodali še 50 µL 0,05% tripsina (Sigma), nato smo jih za 20 minut postavili nazaj v inkubator na 37°C. Po pretečenem času smo celice z intenzivnim pipetiranjem odstranili s podlage in prenesli v koničasto 15 mL centrifugirko. Steklenica, v katerem smo gojili celice, smo sprali s 5 mL toplega gojišča in to prenesli v epruveto k celicam (goveji fetalni serum (FBS) v gojišču inhibira delovanje tripsina). Vsebino epruvete smo premešali na stresalniku in odpipetirali zgornji 1 mL vsebine v svežo epruveto. Le-to smo 5 minut centrifugirali pri 1200 obr/min in nato odlili supernatant, s čimer smo odstranili ostanke tripsina. Celični pelet smo resuspendirali v 8 mL toplega gojišča, ga premešali na stresalniku in ga dodali nazaj v steklenico.

Pri drugi metodi subkultiviranja smo čas izpostavljenosti tripsinu skrajšali na račun daljšega spiranja s 0,02 % EDTA/PBS. Podobno kot pri prvem postopku smo celicam najprej odlili hranilni medij in jih sprali s PBS. Nato smo jim dvakrat dodali po 5 mL 0,02 % EDTA/PBS in jih za 10 minut postavili v inkubator. Ko smo 0,02 % EDTA/PBS dodali tretjič, smo k celicam dodali še 90 µL 0,05% tripsina. Celice smo naprej gojili kot je opisano.

### HEK 293 GHS-R1a

Celice HEK 293 GHS-R1a smo gojili v hranilnem mediju z dodatkom geneticina 418 v koncentraciji 0,5 mg/mL. Slednji je pomemben za trajno izražanje gena za receptor GHS-R1a in preprečuje razrast celic HEK 293, ki ne izražajo gena, hkrati pa še dodatno prepreči možnost okužbe celic. Celice smo vzdrževali pri nadzorovani temperaturi 37 °C in v navlaženi atmosferi, ki je vsebovala 5 % CO<sub>2</sub>. Rast, obliko in gostoto celic smo vsakodnevno preverili pod mikroskopom in hkrati preverjali, ali ni prišlo do mikrobne okužbe ali okužbe s plesnijo. Celicam smo medij menjavali in jih subkultivirali po potrebi, ko so dosegle 90- do 100-odstotno gostoto (v 3- do 4-dnevnih presledkih).

Postopek subkultivacije pri celicah HEK 293 GHS-R1a je potekal podobno kot pri HaCat celicah. Najprej smo odlili medij in celice sprali s 5 mL PBS. V steklenico smo dodali 5 mL 0,02 % EDTA/PBS in v to dodali 20 µL 0,05% tripsina. Steklenico smo za pet minut prestavili v inkubator na 37 °C. Nato smo iz steklenice odpipetirali celice v 15 mL centrifugirko in ga sprali s 5 mL toplega gojišča, ki smo ga dodali v centrifugirko k celicam. Vsebino centrifugirke smo premešali na stresalniku in zgornji 1 mL suspenzije prenesli v svežo centrifugirko. Suspenzijo celic smo centrifugirali na 1200 obr/min 5 minut in odlili supernatant. Pelet celic smo resuspendirali v 8 mL ogretega gojišča, vsebino premešali in jo prenesli nazaj v steklenico za gojenje celic.

### **3.2.2. Priprava celičnih lizatov**

Priprave celičnih lizatov smo se v prvih stopnjah lotili enako kot subkultivacije posamezne vrste celic. Ko smo celice odlepili iz podlage in prenesli v centrifugirko, nam je po uporabi 1 mL suspenzije za subkultivacijo, ostalo 9 mL suspenzije celic. Te celice smo uporabili za pripravo lizata. Za pripravo enega lizata smo uporabili približno 80-90% celic iz vsebnika. Celični lizat obeh vrst celic smo pripravili tudi brez prisotnosti tripsina, in sicer smo celice s podlage steklenice odstranili s strganjem. Naprej smo v obeh primerih postopali enako.

Centrifugirko z 9 mL suspenzije celic smo centrifugirali 5 minut pri 1200 obr/min. Supernatant smo odlili in celični pelet resuspendirali v 1 mL PBS in suspenzijo prenesli v mikrocentrifugirko. Suspenzijo v PBS smo pri enakih pogojih ponovno centrifugirali in odlili ter dodatno še natančno odpipetirali ves supernatant.

Pelet smo nato resuspendirali v 100  $\mu$ L RIPA lizirnega pufra. Takoj za tem smo v epico dodali še 1  $\mu$ L inhibitorjev proteaz Halt protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific). Celično suspenzijo smo za 30 minut prestavili na led in nato čez noč v zamrzovalnik na -80 °C. Naslednji dan smo vsebino odtajali in jo z ultrazvočno sondo razbijali trikrat po 5 sekund. Med vsakim razbijanjem smo epico postavili za 1 minuto na led, da se vsebina ni preveč segrela. Na koncu smo epico centrifugirali 15 minut pri 15 000 obr/min na temperaturi 4 °C. Supernatant po centrifugiranju je predstavljal naš lizat. Preden smo lizat prestavili v zamrzovalnik na -80 °C, smo odpipetirali 10  $\mu$ L, ki smo jih uporabili za določanje koncentracije proteinov v lizatu.

### **3.2.3. Membransko frakcioniranje**

Pri membranskem frakcioniranju smo kot lizirni pufer namesto RIPA pufra uporabili Pufer B. Uporabili smo že pripravljen pufer B, v katerega smo dodali inhibitorje proteaz (1  $\mu$ L na 100  $\mu$ L pufra). Celice smo podobno kot pri pripravi lizatov raztopili v 100  $\mu$ L lizirnega pufra, ki je vseboval inhibitorje proteaz. Nato smo celične membrane razbijali z ultrazvočno sondo trikrat po 5 sekund in vmes vsakič epico za 1 minuto postavili na led. Nato smo suspenzijo centrifugirali 10 minut na 1500 obr/min in v svežo epico odpipetirali supernatant. Pri tem so v peletu ostale nelizirane celice in celična jedra. Supernatant smo centrifugirali 10 minut na 15 000 obr/min pri temperaturi 4°C. Pri tem koraku smo odpipetirali in zavrgli supernatant, ki je vseboval citosolno frakcijo. Celični pelet oziroma usedlino, ki je predstavljala grobo membransko frakcijo smo nato resuspendirali v 30  $\mu$ L pufra B s proteaznimi inhibitorji in jo ponovno centrifugirali 10 minut na 15 000 obr/min. Supernatant, ki je nastal po zadnjem centrifugiranju, je predstavljal membransko frakcijo celičnega lizata.

### **3.2.4. Priprava lizata mišjega diencefalona**

Tkivo možganskega diencefalona smo odtalili in k 50 mg tkiva dodali 700  $\mu$ L lizirnega pufra RIPA. Takoj zatem smo dodali še 7  $\mu$ L inhibitorjev proteaz. Tkivo smo ročno homogenizirali v epici in ga za 30 minut prestavili na led. Nato smo homogenizat z ultrazvočno sondo razbijali trikrat po pet sekund. Med razbijanji smo za 1 minuto epico prestavili na led.

Na koncu smo mišji diencefalon centrifugirali 15 minut pri 15 000 obr/min pri temperaturi 4°C in supernatant, ki je predstavljal naš lizat, shranili na -80°C.

### 3.2.5. Merjenje koncentracije proteinov v posameznih lizatih

Koncentracijo proteinov v lizatih smo izmerili po DC metodi za merjenje koncentracije proteinov, ki temelji na Lowrey-evi metodi za kolorimetrično določanje koncentracije proteinov. Uporabili smo komplet reagentov za DC metodo (BioRad), ki vsebuje Reagent A, Reagent B in reagent S. Pripravili smo umeritveno krivuljo standardov iz BSA, ki smo ga raztopili v uporabljenem lizirnem pufri RIPA. Pripravili smo raztopine standardov v različnih koncentracijah (0,2 – 1,5 mg/mL). Kot vzorec smo uporabili petkratne redčitve naših lizotov. Tik pred meritvijo smo pripravili Reagent A', in sicer smo dodali 10 µL Reagenta S k 490 µL Reagenta A. Reagent A' smo ovili z alu-folijo in ga tako zaščitili pred svetlobo. Na mikrotitrsko ploščo smo nato v jamice nanegli po 5 µL raztopine standardov in vzorcev v duplikatih. Kot slepo meritev smo nanegli 5 µL RIPA pufra brez dodatkov. V jamice smo nato dodali 25 µL Reagenta A' in na koncu z avtomatsko pipeto naenkrat še 200 µL Reagenta B. Mikrotitrsko ploščo smo rahlo stresli, odstranili mehurčke in jo pokrili z alu-folijo. Po 15 minutah smo pomerili absorbanco pri 750 nm z UV/VIS spektrometrom Tecan Genios (Tecan). Od rezultatov meritev smo odšteli vrednost slepe meritve in iz rezultatov standardov narisali umeritveno krivuljo. Iz krivulje smo s pomočjo enačbe premice izračunali koncentracije vzorcev – lizotov, ki smo jih na koncu pomnožili s faktorjem redčitve.

Umeritvena krivulja:

$$y=kx+n$$

$n=0$  (absorbanca pri koncentraciji 0 mg/ml = 0)

$y$ = izmerjena absorbanca pri 750 nm

$x$ = koncentracija standarda/vzorca

$k$ = naklon premice

### **3.2.6. Elektroforeza**

Pred postopkom elektroforeze smo pripravili vzorce celičnih lizatov in lizata mišjega diencefalona. V epico smo prenesli volumen lizata, ki je ustrezal 30 µg proteinov. Nato smo dodali PBS do končne prostornine 15,5 µL. K vzorcu smo dodali še 4,5 mL DTT (Sigma) (ditiotreitol), ki ohrani –SH skupine v reduciranem stanju in 10 µL barvila za nanos (Loading dye 3×SDS). Epice smo za 5 minut inkubirali v vodi kopeli pri 100 °C, da so vzorci denaturirali in jih ohladili. Vzorce in molekulski standard (Seablue Plus2 Pre-stained, ThermoFischer Scientific) smo nato nanegli na v naprej pripravljen tris-glicin gel s 10% koncentracijo (Novex, ThermoFischer Scientific), ki smo ga predhodno trikrat sprali s pufrom, ki je vseboval SDS. Pred elektroforezo smo elektroforetsko celico X Cell SureLock (ThermoFischer Scientific) sprali z destilirano vodo in sestavili po navodilih proizvajalca. Elektroforeza je tekla 2 uri pri konstantni napetosti 100V.

### **3.2.7. Prenos western in detekcija iskanih proteinov**

Po koncu elektroforeze smo si pripravili dve posodi, v kateri smo nalili ohlajen pufer za prenos western. V ta pufer smo previdno namočili gel, nitrocelulozno membrano (Amersham), vpojne podloge in 2 filter papirja (5,5x7cm). V kaseti elektroforetske celice smo nato v sledečem zaporedju zložili plasti: vpojna podloga, filter papir, gel, nitrocelulozna membrana, filter papir in gobica. Po zgornji plasti filter papirja smo podrgnili s pinceto in skušali odstraniti morebitne mehurčke zraka. Na sredino banjice elektroforetske celice smo nalili pufer za prenos western, ob zunanjih robovih smo dotočili destilirano vodo in celotno elektroforetsko celico postavili v ohlajeno vodo, da smo zmanjšali pregrevanje naprave. Prenos western je trajal 1 uro in 30 minut pri konstantni napetosti 50V.

Po prenosu western smo nitrocelulozno membrano blokirali z blokirnim pufrom 2 uri pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju. Nato smo membrano trikrat spirali po 5 minut z 10 mL raztopine 0,05 % TBST. Ko smo zadnjič odlili TBST, smo dodali raztopino za inkubacijo s primarnimi protitelesi, v katero smo dodali protitelesa proti receptorju GHS-R1a v razmerju 1:1000. Membrano smo s primarnimi protitelesi inkubirali ob rahlem stresanju v hladilniku čez noč.

Naslednji dan smo membrano ponovno trikrat sprali s TBST in nato dodali raztopino za inkubacijo s sekundarnimi protitelesi, v katero smo dodali protitelesa v razmerju 1:5000. Membrano smo s sekundarnimi protitelesi inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi in ob rahlem stresanju. Pred detekcijo smo membrano sprali trikrat po 10 minut z raztopino TBST.

Detekcijo smo izvedli s pomočjo naprave G:Box (Syngene). Tik pred meritvijo smo namešali 400  $\mu$ L reagenta in 400  $\mu$ L substrata Femto za razvoj kemiluminiscenčne reakcije in ga nanegli na membrano. Membrano smo slikali tudi pri navadni osvetlitvi, kjer so bile vidne lise označevalca velikosti. Nato pa smo posneli membrano s kemoluminiscentnim detektorjem. Naprava je omogočala, da smo posneli 40 ločenih slik, ki so se v programu naložile ena na drugo, s čimer se je signal večkrat ojačal.

Po detekciji smo membrano očistili vezanih protiteles. To smo izvedli tako, da smo jo naprej trikrat po 5 min spirali s TBST. Nato smo membrano ob rahlem stresanju inkubirali v pufru za odstranjevanje vezanih protiteles eno uro na 60°C. Sledilo je ponovno spiranje s TBST trikrat po 5 minut in blokada z 1 % posnetim mlekom v prahu v TBST. Nadaljevali smo z enakim postopkom vezave protiteles proti encimu GOAT in detekcije kot pri vezavi in detekciji protiteles proti receptorju.

### **3.2.8. Merjenje koncentracije $\text{Ca}^{2+}$ v citosolu s čitalcem mikrotitrskih plošč**

#### *Priprava celic za meritve*

Za vsak posamičen poskus smo uporabili en plastično steklenico površine 75  $\text{cm}^2$  celic HaCaT in kontrolnih celic HEK 293 GHS-R1a. Celice smo po postopku subkultivacije odstranili od podlage, jih s pipetiranjem razbili in prenesli v 15 mL centrifugirko (TPP). Celice smo 5 minut centrifugirali pri 1000 obr/min in temperaturi 4°C. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in celice resuspendirali v 10 mL DPBS, nato pa jih ponovno 5 minut centrifugirali pri 1000 obr/min in temperaturi 4°C. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v 2 mL DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, ThermoFischer Scientific), ki ne vsebuje ionov  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ .

Za pripravo suspenzije neobarvanih celic, ki je služila kot kontrola ozadja, smo 250  $\mu\text{L}$  suspenzije celic v DPBS dodali še 500  $\mu\text{L}$  DPBS, da smo pridobili zadostno količino celic za kontrolno meritev v triplikatu. Ostanku 1,75 mL suspenzije celic v DPBS z gostoto celic  $4 \times 10^6/\text{mL}$  smo dodali 4,375  $\mu\text{L}$  indikatorja  $\text{Ca}^{2+}$  Fura-2 AM v končni koncentraciji 2,5  $\mu\text{M}$ . Inkubacija je potekala ob stresanju na stresalniku (400 stresljajev na minuto) 30 minut pri sobni temperaturi (22–24  $^{\circ}\text{C}$ ). Centrifugirki smo s folijo zaščitili pred svetlobo. Po končani inkubaciji smo celice ponovno 5 minut centrifugirali pri 1000 obr/min in temperaturi 4  $^{\circ}\text{C}$ , odstranili smo supernatant ter celični pelet resuspendirali v DPBS in ponovno 5 minut centrifugirali pri 1000 vrt./min in temperaturi 4  $^{\circ}\text{C}$ . S tem smo odstranili ostanke indikatorja, ki se je nahajal zunaj celic in bi lahko motil odziv signala. Po zadnjem centrifugiranju smo celice resuspendirali v ustrezni količini pufru DPBS, ki je zadoščala za meritev v triplikatu in jih prenesli na črno ploščo s 96 jamicami (Greiner Bio-One). Pred dodatkom celic v jamice smo jih temeljito premešali, da je bilo število celic v vseh jamicah primerljivo. Vse meritve so bile izvedene pri 25–27  $^{\circ}\text{C}$ . Poskusi so bili izvedeni v duplikatu oz. triplikatu in vsaj v treh ponovitvah.

### Meritve

Vse meritve smo opravili na čitalniku mikrotitrnih plošč Mithras LB 942 (Berthold Technologies). Avtomatski injektor smo pred in po meritvah ustrezno očistili z raztopino 70-odstotnega etanola, 100-odstotnega etanola in 2 M NaOH. Pri meritvah znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$  smo v jamice mikrotitrnih plošč dodali 180  $\mu\text{L}$  prej pripravljene suspenzije celic. V jamico smo nato s pomočjo avtomatskega injektorja injicirali 20  $\mu\text{L}$  raztopine grelina (Bachem) v končni koncentraciji 500 nM. V poskusih smo najprej 40 sekund zajemali fluorescenčni signal ozadja (bazalna vrednost). Nato smo z avtomatskim injektorjem injicirali grelin, čemur je sledilo stresanje mikrotitrne plošče za 1 sekundo. Nato smo naslednjih 60 sekund spremljali razmerje signalov. Na začetku vsakega poskusa smo posneli avtofluorescenco (signal celic, ki jih nismo obarvali z indikatorjem), ki smo ga odšteli od dobljenega rezultata.

Rezultate meritev smo analizirali s pomočjo programov Excel in Graph Pad Prism 6.0.



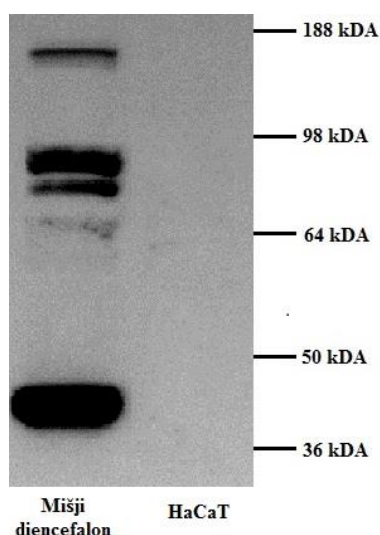
## 4. REZULTATI

### 4.1. Določanje prisotnosti receptorja GHSR-1a in encima GOAT z metodo prenosa western in imunodetekcijo

#### 4.1.1. Detekcija receptorja GHS-R-1a

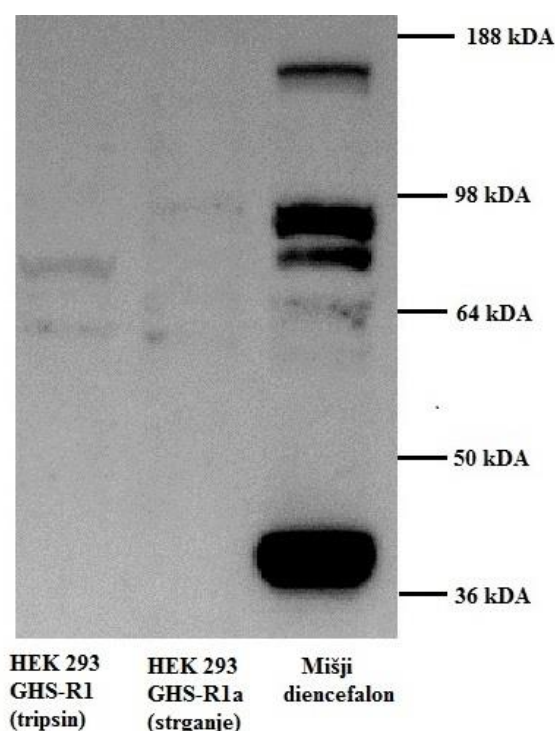
S pomočjo metode izboljšane kemiluminiscence smo v G:Box napravi lahko posneli slike membrane, kjer so se vezala primarna protitelesa proti GHS-R1a in kjer je potekla reakcija s hrenovo peroksidazo. Na **slikah 2, 3 in 4** so prikazani posamezni vzorci lizatov pripravljenih na različne načine in lizat mišjega diencefalona, ki je služil kot pozitivna kontrola. Uporabljena primarna protitelesa proti receptorju GHS-R1a se vežejo na receptor na približni razdalji, ki ustreza molekularni masi receptorja GHS-R1a in to je pri približno 40 kDA. Molekularni standardi so prikazani na desni strani.

Na vseh slikah je opazna izrazita lisa receptorja na razdalji 40 kDA le pri vzorcu lizata mišjega diencefalona. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili tudi celice HEK, ki izražajo receptor GHS-R1a, vendar prisotnosti receptorja z metodo prenosa western in imunodetekcijo nismo dokazali (**slika 3**). Celoten postopek smo večkrat ponovili in dobili ponovljive rezultate. Prav tako s to metodo receptorja nismo mogli dokazati na celični liniji HaCaT, ne glede na metodo priprave lizatov (**Slika 2, 4**).



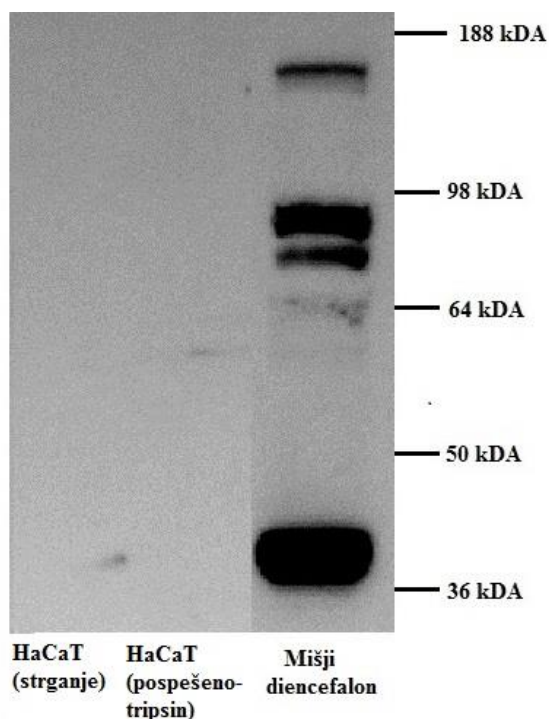
**Slika 2:** Membrana z vezanimi protitelesi proti GHS-R1a na vzorce mišjega diencefalona in celičnega lizata HaCat pridobljenega z daljšo izpostavljenostjo tripsinu.

Na **sliki 2** je pri lizatu mišjega diencefalona vidna močna lisa, ki prikazuje receptor GHS-R1a pri približno 40 kDa. Dodatno se pri večjih molekularnih masah pojavijo še tri lise. Pri razdalji med 80-90 kDa bi lahko lise predstavljale možna dimera GHS-R1a in GHS-R1a/GHS-R1b. Lisa pri približno 150 kDa najverjetneje predstavlja trimer receptorja ali dimer z neznanim proteinom. Za razliko od lizata mišjega diencefalona, pri lizatu celic HaCat, ki smo ga pripravili z daljšim postopkom tripsinizacije, ni opaznih lis receptorja.



**Slika 3: Membrana z vezanimi protitelesi proti GHS-R1a na vzorce mišjega diencefalona in celičnih lizatov HEK 293 GHS-R1a**

Na **sliki 3** je prikazana membrana z nanosi lizatov celic HEK 293 GHS-R1a, pri katerih pa lisa pri molekularni masi 40 kDa ni opazna. Rahla lisa, ki sovpada z liso pri lizatu mišjega diencefalona se pojavi le pri približno 80 kDa. Pri lizatu, ki smo ga pridobili s procesom tripsinizacije, je ta lisa močnejša kot pri lizatu, ki smo ga pridobili s tehniko strganja.



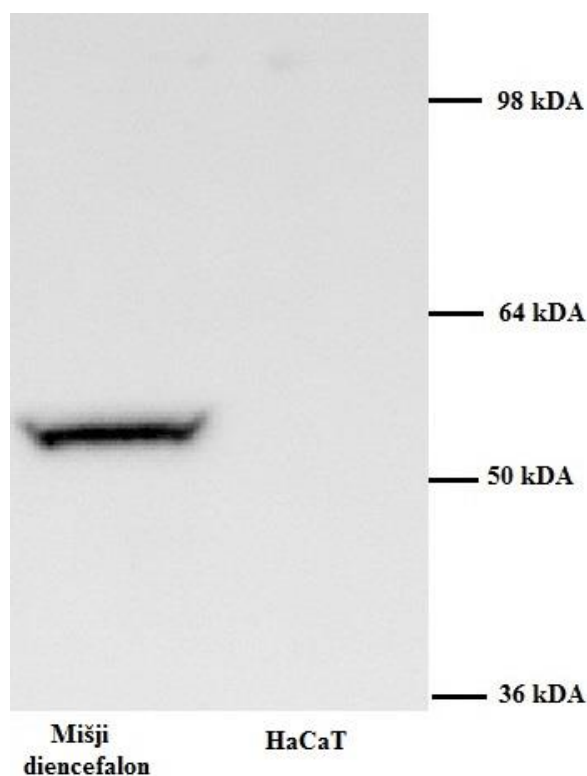
**Slika 4:** Membrana z vezanimi protitelesi proti GHS-R1a na vzorce mišjega diencefalona in celičnega lizata HaCat pripravljenega s strganjem in krajšim časom izpostavljenosti tripsinu.

Na **sliki 4** so prikazani rezultati prenosa western za celične lizate HaCaT, ki smo jih pripravili s strganjem celic in krajšo izpostavitvijo tripsinu. Tudi s tega procesoma priprave celičnega lizata na membrani nismo detektirali jasne lise, ki bi označevala prisotnost receptorja. Rahla lisa pri 40 kDA, ki je vidna pri HaCaT lizatu, pridobljenem s strganjem, se pri ponovnih izvedbah poskusov ni pojavila.

#### 4.1.2. Detekcija encima GOAT

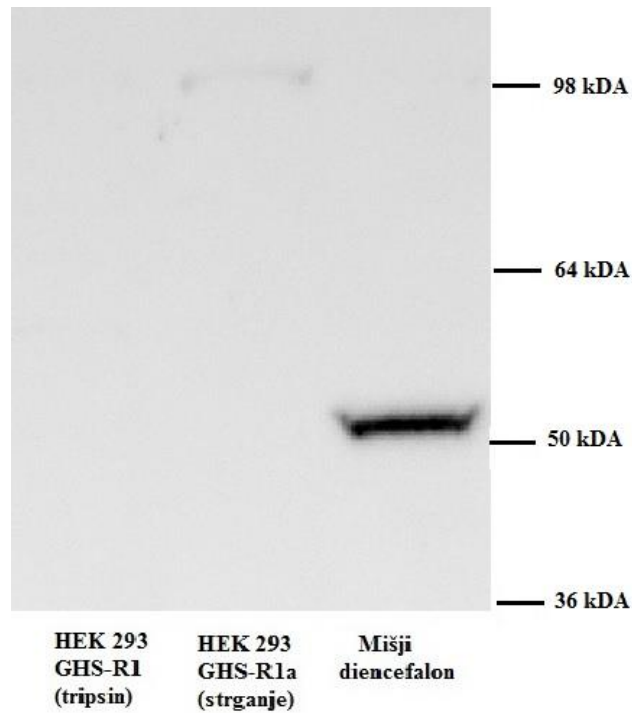
Membrano, na kateri so bili preneseni proteini iz celičnih lizatov in mišjega diencefalona, smo po postopku detekcije receptorja GHS-R1a očistili vezanih protiteles in ponovili postopek s protitelesi proti encimu GOAT. Na **slikah 5, 6 in 7** je tako prikazana enaka membrana z drugimi primarnimi protitelesi kot na **slikah 2, 3 in 4**, Uporabili smo enaka sekundarna protitelesa kot pri detekciji receptorja GHS-R1a in enak postopek meritve kemiluminiscence.

Ponovno se je pokazalo, da se encim GOAT zanesljivo izraža le v tkivu možganskega diencefalona. Pri lizatih celičnih linij HEK 293 GHS-R1a in HaCaT se lisa na razdalji 50 kDa namreč ni prikazala. Tako za celični liniji HEK 293 GHS-R1a in HaCat prisotnosti encima GOAT na proteinskem nivoju nismo potrdili. Zelo rahla lisa se pojavi na mestu možnega dimera encima na razdalji približno 100 kDa pri celicah HEK 293 GHS-R1a, pridobljenih s strganjem in celicah HaCaT, ki so bile tripsinu izpostavljene krajši čas. Prisotnosti receptorja v dimerni obliki pa s ponovitvami poskusa nismo potrdili.



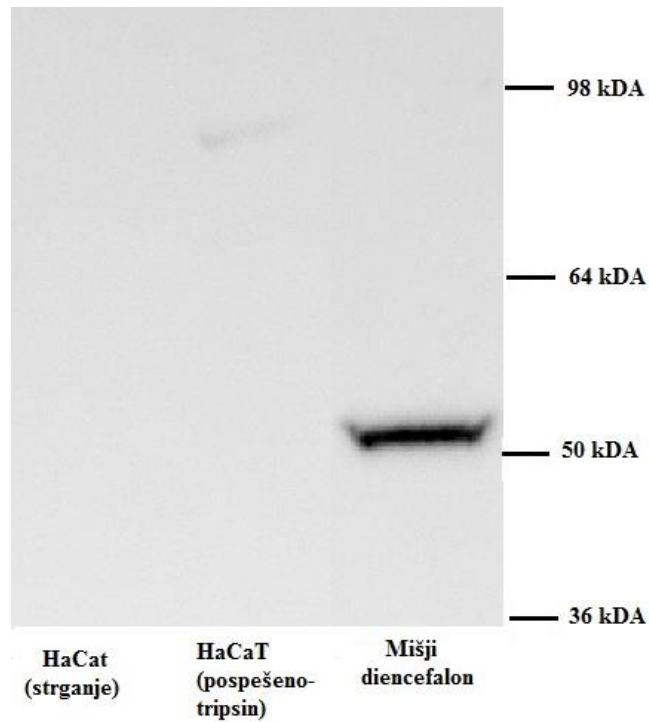
**Slika 5:** Membrana z vezanimi protitelesi proti GOAT na vzorce mišjega diencefalona in celičnega lizata HaCat pridobljenega z daljšo izpostavljenostjo tripsinu.

Na **sliki 5** je prikazana membrana z nanosi tkiva možganskega diencefalona in lizata celic HaCaT, ki je bil pridobljen z daljšim postopkom tripsinizacije. Lisa, ki označuje lokacijo encima GOAT, je vidna le pri tkivu mišjega diencefalona. Pri celičnem lizatu celic HaCat se protitelesa niso vezala na področje, kjer naj bi se nahajal encim.



**Slika 6: Membrana z vezanimi protitelesi proti GOAT na vzorce mišjega diencefalona in celičnih lizatov HEK 293 GHS-R1a.**

Na **sliki 6** sta prikazana lizata celic HEK 293 GHS-R1a, pridobljena na različne načine in pozitivna kontrola lizat celic tkiva mišjega diencefalona. Tudi pri celicah HEK 293 GHS-R1a lisa, ki označuje lokacijo encima, ni opazna. Rahla lisa se pojavi na približni razdalji 100 kDA pri celicah HEK 293 GHS-R1a, pridobljenih s postopkom strganja, vendar ta lisa pri nadaljnjih ponovitvah poskusov ni bila opazna. Ker lise in posledično prisotnosti encima GOAT na lizatih celične linije HEK 293 GHS-R1a nismo dokazali, nam te celice niso služile kot pozitivna kontrola.



**Slika 7:** Membrana z vezanimi protitelesi proti GOAT na vzorce mišjega diencefalona in celičnih lizatov HaCat pridobljenih s strganjem in s krajšo izpostavljenostjo tripsinu.

Sliki, kjer sta prikazana lizata celic HaCaT pridobljena z drugačnim postopkom, se ne razlikujeta od celičnega lizata na **sliki 5**. Podobno tudi tukaj prisotnosti encima GOAT na celični liniji nismo dokazali, saj ni opaznih lis na razdalji 50 kDa, kjer naj bi se nahajal encim.

## 4.2. Merjenje koncentracije $\text{Ca}^{2+}$ v citosolu

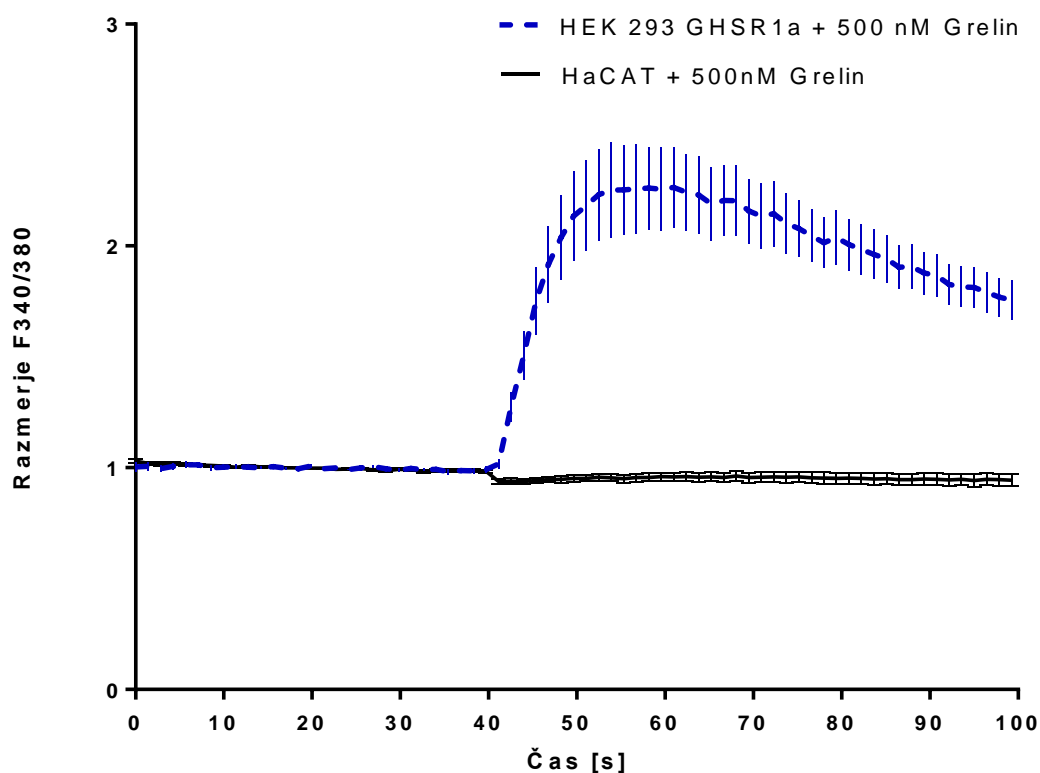
Merjenje porasta sekundarnega sporočevalca  $\text{Ca}^{2+}$  znotraj celice po dodatku agonista nam poda neposredno informacijo o aktivaciji receptorja. Koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  po dodatku agonista grelina smo pomerili na celičnih linijah HaCaT in HEK 293 GHS-R1a. Celična linija HEK 293 GHS-R1a nam je služila kot pozitivna kontrola.

Pri poskusu smo merili porast v razmerju signalov F340/380, ki je merilo za koncentracijo znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ . Za vzbujanje indikatorja Fura-2 AM smo uporabili valovni dolžini 340 nm (F340 – indikator Fura-2 AM vezan s  $\text{Ca}^{2+}$ ) in 380 nm (F380 – prosti indikator Fura-2 AM). Oba emisijska fluorescenčna signala F340 in F380 smo zajeli pri valovni dolžini 510 nm. Zajeta fluorescenca pri 510 nm po vzbujenem indikatorju Fura-2 AM pri 340 nm je intenziteta fluorescenčnega signala indikatorja Fura-2 AM, vezanega s  $\text{Ca}^{2+}$ . Močnejši signal pomeni naraščanje koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  v citosolu. Zajeta fluorescenca pri 510 nm po vzbujenem indikatorju Fura-2 AM pri 380 nm je intenziteta fluorescenčnega signala prostega indikatorja Fura-2 AM. Povišano razmerje med F340 in F380 pomeni naraščanje koncentracije znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ .

Časovni potek poskusa prikazuje **slika 8**. Posamezna meritev je trajala 100 sekund, pri čemer je v 40. sekundi prišlo do vbrizga raztopine grelina v končni koncentraciji 500 nm k celicam. V prvih 40 sekundah meritve smo določili bazalni odziv obarvanih celic, ki smo ga normirali na 1, in glede na to vrednost prikazali spremembo v razmerju signala

Izmerjene vrednosti signala obarvanih celic smo v programu Microsoft Excel odšteli od signala neobarvanih celic iste koncentracije. Graf smo narisali v programu Graph Pad Prism 6.0.

Iz rezultatov, prikazanih na **sliki 8** smo potrdili izsledke prejšnjih poskusov, in sicer, da prisotnosti receptorja na celicah HaCaT ne moremo potrditi. Potrdili pa smo, da pride do aktivacije receptorja na kontrolni celični liniji HEK 293 GHS-R1a, torej se receptor izraža na proteinskem nivoju, vendar v izjemno majhni meri, da ga z metodo prenosa western in imunodetekcije nismo detektirali.



**Slika 8: Porast koncentracije znotrajceličnega  $Ca^{2+}$  po dodatku grelina k celicam HaCat in HEK 293 GHS-R1a**

Na sliki je prikazan graf, ki prikazuje razmerje signalov F340/F380 glede na pretečen čas tekom poskusa. Pri celicah HEK 293 GHS-R1a je opazno značilno povišanje vrednosti razmerja ob dodatku agonista receptorja. Iz povišanja signala lahko sklepamo, da se na celicah HEK 293 GHS-R1a receptor definitivno izraža in nam lahko služijo kot pozitivna kontrola. Iz poskusa je razvidno, da do porasta znotrajceličnega  $Ca^{2+}$  pri celični liniji HaCaT ni prišlo in tako obstoja receptorja ne moremo potrditi. Na grafu so prikazane meritve treh ločenih poskusov, pri čemer so bili poskusi vsakič opravljeni v triplikatih za oba tipa celic.



## 5. RAZPRAVA

Grelin od svojega odkritja naprej do danes ostaja predmet velikega števila raziskav. Vlogi grelina kot hormona, ki spodbuja izločanje ravnega hormona, so se tekom let pridružile mnoge druge in ga uvrstile med pomembne mediatorje vpletene v delovanje človeškega organizma. Grelin sodeluje v velikem številu fizioloških procesov, kjer svoje učinke v največji meri izraža preko delovanja na receptor GHS-R1a. Med njegove najbolj znane in raziskane funkcije prištevamo njegovo delovanje v hipotalamusu, kjer spodbuja vnos hrane in pridobivanje telesne teže. Prav tako koncentracija grelina v telesu sovпада s stanjem prehranjenosti organizma, kar potrjuje njegovo vpletenost v energijski metabolni zanki in povezavo med telesno težo ter ostalimi procesi v organizmu (84).

Povišana telesna masa je dejavnik tveganja za bolezni kot so sladkorna bolezen tipa 2, rak in metabolični sindrom. Pri debelosti pride v telesu do pro-vnetnega stanja, ki ga povezujejo tudi z nastankom in/ali poslabšanjem nekaterih kroničnih vnetnih bolezni kože, kot je luskavica (85). Do sedaj delovanje grelina in njegovo vpletenost v vnetne procese pri kožnih boleznih še niso dokazali. Čeprav ima grelin dokazano protivnetno delovanje na celice imunskega sistema (35), se poraja vprašanje o njegovem mehanizmu delovanja na celice kože, ki jih v največji meri predstavljajo keratinociti. Le-ti so neposredno udeleženi pri obrambni funkciji kože in pri zagonu vnetnih procesov ob porušenju homeostaze kože (67).

Na Fakulteti za farmacijo so v lanskem letu dokazali obstoj mRNA za receptor GHS-R1a in encim GOAT, ki je odgovoren za pretvorbo grelina v aktivno obliko v celični liniji HaCaT (81). Gre za trajno celično linijo epiteljskih celic odrasle kože, ki imajo lastnosti diferenciacije in oponašajo normalno keratinizacijo (82). V diplomskem delu so dokazali obstoj mRNA zapisa za receptor in GOAT po imunski aktivaciji celic HaCaT in po stimulaciji z grelinom, kar pa ne poda celovite informacije o izražanju receptorja in encima GOAT.

V magistrskem delu smo si za nalogo zadali nalogo dokazati obstoj encima GOAT in receptorja GHS-R1a na proteinskem nivoju s pomočjo metod elektroforeze, prenosa western in detekcije z metodo izboljšane kemiluminiscence. Samo aktivacijo in funkcionalnost receptorja smo nato poskušali dokazati preko meritev porasta koncentracije znotrajceličnega kalcija.

Pred izvedbo prvih poskusov s postopkom elektroforeze in prenosa western smo *in vitro* gojili celični liniji HaCaT in HEK 293 GHS-R1a. Celice HaCaT prištevamo med celice adherentnega tipa, ki jih je ob subkultivaciji težje odstraniti s podlage, zato smo se poslužili različnih načinov subkultivacije in priprave lizatov. Pri tripsinizaciji celic HaCaT smo uporabili večkratno spiranje s PBS + EDTA, saj EDTA kompleksira  $\text{Ca}^{2+}$  ione v mediju, ki so pomembni za pravilno delovanje adhezijskih molekul (kadherini, integrini, selektini) v celičnih kulturah. Lizate celic obeh linij smo pridobili s postopkom tripsinizacije ali s postopkom strganja celic. Postopek strganja celic smo uporabili, ker tripsin kot proteaza lahko poškoduje membranske proteine, med katere prištevamo oba iskana proteina (receptor GHS-R1a in GOAT). Dodatno smo pripravili lizat obeh celičnih linij z metodo membranskega frakcioniranja, da bi dobili koncentrat proteinov iz membranske frakcije. Pripravljene lizate smo nato nanesti na prej pripravljen gel in po navodilih proizvajalca izvedli postopka elektroforeze ter prenosa western. Izvedli smo podzvrst gelske elektroforeze - SDS-PAGE (poliakrilamidna gelska elektroforeza) pri kateri natrijev dodecil sulfat, SDS, (*iz angl. sodium dodecyl sulfate*) s svojim delovanjem kot anionska površinsko aktivna snov povzroči denaturacijo proteinov in jih spremeni v linearno enakomerno nabito molekulo. To povzroči, da se proteini v prisotnosti električnega polja po gelu premikajo sorazmerno s svojo molekulsko maso, kar omogoča njihovo ločitev po velikosti (86). Elektroforezo smo izvedli pri konstantni napetosti, da bi preprečili pregrevanje gela, do katerega pride pri konstantnem toku. Postopku elektroforeze je sledil prenos po westernu in inkubacija z ustreznimi protitelesi.

Na **slikah 2–4** so prikazane membrane po inkubaciji s protitelesi proti receptorju GHS-R1a in na **slikah 5–7** prikaz membrane po inkubaciji s primarnimi protitelesi proti encimu GOAT. Pri obeh postopkih sta lisi, ki označujeta receptor GHS-R1a in encim GOAT vidni le pri pozitivni kontroli lizatu tkiva mišjega diencefalona. Odsotnost lise za receptor GHS-R1a pri celicah HEK, ki naj bi trajno izražale receptor in so nam pravzaprav služile kot dodatna pozitivna kontrola, je bila nepričakovana. Iz rezultatov je razvidno, da so uporabljena primarna protitelesa, ki so validirana za uporabo pri postopku prenosa po westernu in za detekcijo mišje in človeške izoforme receptorja ustrezna, saj so dala pozitiven rezultat pri tkivu mišjega diencefalona.

Da bi preverili, ali je do odsotnosti lis prišlo zaradi premajhne koncentracije primarnih protiteles, smo poskus ponovili s trikrat višjo koncentracijo, ki pa je dala enake rezultate. Enake rezultate smo dobili tudi pri lizatih, ki smo jih pridobili z metodo membranskega frakcioniranja. Dodatna možnost, zakaj bi lahko prišlo do odsotnosti lise, je bila ta, da smo nanесли premajhno količino lizata na gel. Če se namreč protein v celici izraža v zelo majhni količini, je možno, da ga s to metodo ne moremo detektirati, kljub temu da smo uporabili metodo izboljšane kemiluminiscence, ki omogoča detekcijo v femtogramskem območju. Za razjasnitev možnega vzroka smo zato poskus ponovili tako, da lizatov pred nanosom na gel nismo razredčili v PBS pufri. Ponovno smo dobili podobne rezultate, in sicer smo prisotnost receptorja GHS-R1a in encima GOAT nedvoumno dokazali le v lizatu mišjega diencefalona. Pri pripravi lizata mišjega diencefalona smo uporabili enak lizirni puffer (RIPA puffer) kot pri pripravi celičnih lizatov HaCaT in HEK 293 GHS-R1a. To pomeni, da sestava pufra ni pomembno vplivala na konformacijo obeh proteinov, čeprav je iz literature razvidno, da sestavina RIPA pufra Triton X-100 ni primerna za izolacijo encima (42). V prvem delu naloge tako po opravljenem delu in kljub modifikaciji metod ne moremo zanesljivo potrditi prisotnost encima GOAT in receptorja GHS-R1a v celicah HaCaT in HEK 293 GHS-R1a. Možni razlagi sta, da se v celicah HEK, kljub nastanku mRNA na proteinskem nivoju, receptor in encim ne izražata oziroma, da se izražata v tako majhni količini, da njunega obstoja s to metodo ne moremo potrditi.

V drugem delu naloge smo prisotnost in aktivacijo receptorja na celicah HaCaT in HEK 293 GHS-R1a preverili z meritvami znotrajceličnega  $Ca^{2+}$ . Koncentracijo  $Ca^{2+}$  znotraj celice in njegovo spreminjanje ob stimulaciji z agonistom je možno spremljati v realnem času s pomočjo ustreznega indikatorja med katere prištevamo tudi Fura-2 AM (83). Gre za bolj občutljivo metodo, kot smo jih uporabili v prvem delu naloge, saj se signal znotraj celice po aktivaciji receptorja preko aktivacije sekundarnih sporočevalcev in efektorskih molekul pomnoži. S tem, ko smo celice obarvali z barvilom Fura-2 AM, smo lahko iz razmerja signalov prostega indikatorja Fura-2 AM in indikatorja vezanega s kalcijem izmerili porast kalcija znotraj celice, ki sovpada z aktivacijo receptorja. Iz **slike 8** je razvidno, da celice HEK 293 GHS-R1a receptor res izražajo, saj razmerje signalov po dodatku grelina naraste na več kot dvakratno vrednost. Uporabili smo enake celice (višje pasaže), kar pomeni, da metode, ki smo jih uporabili v prvem delu naloge niso bile dovolj občutljive za določanje prisotnosti receptorja na celicah.

Med možnimi vzroki tako ostaneta nezadostna afiniteta primarnih protiteles, ki vežejo na GHS-R1a ali premajhno izražanje receptorja v celicah. Meritve so pokazale, da se pri celicah HaCaT v primerjavi s celicami HEK 293 GHS-R1a ni povečala koncentracija znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ , saj ni prišlo do porasta v razmerju signalov fluorescence pri različnih ekscitacijskih valovnih dolžinah.

Rezultati drugega dela magistrske naloge so pokazali, da v celični liniji HaCaT do aktivacije receptorje, ki vodi v povečano koncentracijo znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$  ne pride. Prav tako v prvem delu poskusa nismo potrdili prisotnosti encima GOAT v celicah. Rezultati se s predhodno dobljenimi rezultati izražanja mRNA ne ujemajo. Pri našem delu smo preučevali celično linijo, ki smo jo gojili pod standardnimi *in vitro* pogoji, medtem ko so izražanje mRNA preučevali pri s TNF- $\alpha$  imunsko aktivirani celični liniji HaCaT, ki so jo predhodno dodatno inkubirali z grelinom (81). Imunska aktivacija celic naj bi služila kot model luskavice in drugih vnetnih kožnih bolezni. Potrebno je torej ločiti rezultate, pridobljene pri patoloških pogojih in pri pogojih, ki oponašajo normalno fiziološko stanje, saj lahko v celicah izpostavljenim vnetnim pogojem pride do izražanja proteinov, ki drugače niso prisotni (71).

V naši nalogi smo preučili možnost vpliva oktaoiniranega grelina na model keratinocitnih celic preko delovanja na svoj receptor in sprožitve porasta sekundarnega prenašalca  $\text{Ca}^{2+}$ . Pri tem je potrebno v zakup vzeti vse možne pomanjkljivosti zastavljenega poskusa. Poskus smo izvedli na celični liniji HaCaT, ki sicer predstavlja zadovoljivo dober model trajne celične linije keratinocitov, vendar ima svoje pomanjkljivosti kot so na primer spremembe v genskem zapisu v primerjavi s primarnimi linijami keratinocitov (83). Prav tako se v trajni celični liniji HaCaT izražanje celičnih proteinov in genski zapis spreminjata tekom višjih pasaž (83). V eksperimentalnem delu smo preučili samo prisotnost receptorja GHS-R1a, ne pa tudi prisotnosti podtipa receptorja GHS-R1b in nismo ovrednotili ostalih možnih vplivov delovanja grelina na celično linijo HaCaT. V zadnjem času so odkrili, da grelin izvaja svoje učinke na nekatere celice v človeškem organizmu tudi, če te ne izražajo receptorja GHS-R1a. To potrjuje obstoj drugih 'alternativnih' receptorjev za grelin, ki pa zaenkrat še niso identificirani in ovrednoteni (49). Delovanje receptorja GHS-R1a smo v drugem delu naloge preučili s pomočjo meritev porasta znotrajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$ , pri tem pa je pomembno dejstvo, da je  $\text{Ca}^{2+}$  le eden izmed mnogih sekundarnih sporočevalcev znotraj celice in da so za GHS-R1a odkrite različne možnosti aktivacije signalnih poti znotraj celice.

Tako se ob vezavi agonista grelina na receptor v nekaterih celicah aktivirajo še druge signalne poti kot na primer STAT3 signalna pot, mTor signalna pot in ostale (35). Aktivacija različnih signalnih poti nato vodi v različne učinke, ki jih grelin lahko izvaja v celici.

Rezultati, ki smo jih pridobili v magistrski nalogi, nam omogočajo pripravo načrtov za delo v prihodnje. Glede na to, da receptorja za grelin na celični liniji HaCaT nismo dokazali, bomo poskuse ponovili še na primarni celični liniji keratinocitov, ki izkazuje večjo podobnost s tkivom kože, a ima žal časovno omejeno obdobje vzgoje *in vitro*. Dodatno se lahko izražanje receptorja preuči po imunski aktivaciji celic in samo delovanje receptorja preko drugih možnih signalnih poti znotraj celice.

Preučevanje vpletenosti oreksigenega hormona grelina v vnetne procese v koži je še v začetnih stadijih. Čeprav gre za hormon, ki svoje učinke izvaja v skoraj vseh tkivih, se za namene farmakološkega poseganja v njegovo delovanje proučuje predvsem njegov vpliv na pridobivanje telesne mase. Pri tem se v luči njegove oreksigene funkcije pogosto zanemari njegove protivnetne in antioksidativne učinke v telesu. Znano je, da metabolni status organizma vpliva na potek tako fizioloških kot patoloških procesov v telesu in da povišana telesna masa povzroči provnetno stanje v telesu. Iz tega lahko predvidimo, da so v procese vnetja vpletene vse telesu lastne molekule, ki so vpete v metabolno hormonsko zanko. Ena izmed teh je tudi hormon grelin. Ker gre pri kroničnih vnetnih boleznih za zapletena stanja, ki imajo pogosto več vzrokov, je skoraj nemogoče določiti eno farmakološko tarčo, ki bi bila primerna za zdravljenje bolezni. S tem, ko skušamo identificirati in razjasniti način delovanja posameznih udeležencev v patoloških procesih pa kljub vsemu pripomoremo k splošnemu razumevanju vzročno-posledičnega poteka in vzrokov za poslabšanje bolezni. Vsekakor grelin ostaja zanimiv hormon, ki bi lahko pojasnil izboljšanje poteka bolezni luskavice ob izgubi telesne mase oziroma ob zmanjšanem vnosu hrane. Ali gre pri tem za njegovo neposredno delovanje na celice keratinocitov ali posredno protivnetno delovanje na celice imunskega sistema pa zaenkrat ostaja neznanka.

## 6. Sklepi

V magistrski nalogi smo v dveh ločenih delih preverjali obstoj grelinskega receptorja GHS-R1a in v prvem delu tudi obstoj encima GOAT, ki pretvarja grelin v aktivno obliko, v celični liniji HaCaT. V prvem delu naloge smo z različnimi prilagoditvami uporabljenih metod skušali potrditi izražanje receptorja, medtem ko smo v drugem delu z bolj občutljivo metodo meritev znotrajceličnega kalcija skušali dokazati funkcionalnost receptorja.

Obstoj receptorja in encima v prvem in aktivacije receptorja v drugem delu naloge na modelu keratinocitne linije nismo dokazali kar pa ne izključuje vpletenosti grelina v kronične vnetne procese v koži.

Z uporabljenimi metodami v prvem delu naloge nismo uspeli potrditi prisotnosti encima GOAT na celični liniji HaCaT, kar je lahko posledica slabše občutljivosti metode, s katero nismo uspeli potrditi niti prisotnosti receptorja GHS-R1a na celični liniji, ki ga trajno izraža.

## 7. Literatura

1. Masayasu Kojima, Hiroshi Hosoda, Yukari Date, Masamitsu Nakazato HM& KK: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; (402): 656–60.
2. Delporte C: Structure and Physiological Actions of Ghrelin. *Scientifica (Cairo)*. 2013; 2013: 1–25.
3. Kojima M, Kangawa K, Introduction I, Receptor I, Purification A, Ghrelin D, et al.: Ghrelin : Structure and Function. *Physiol Rev*. 2005; 85(2): 495–522.
4. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin N V., Goldstein JL: Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell*. 2008; 132(3): 387–96.
5. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al.: Stomach Is a Major Source of Circulating Ghrelin, and Feeding State Determines Plasma Ghrelin-Like Immunoreactivity Levels in Humans *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001; 86(10): 4753–8.
6. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al.: Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000; 141(11): 4255–61.
7. Ghelardoni S, Carnicelli V, Frascarelli S, Ronca-Testoni S, Zucchi R: Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression. *J Endocrinol Invest*. 2006; 29(2): 115–21.
8. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al.: Ghrelin Enhances Appetite and Increases Food Intake in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001; 86(12): 5992.
9. Wortley KE, Anderson KD, Garcia K, Murray JD, Malinova L, Liu R, et al.: Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(21): 8227–32.

10. Jerlhag E, Janson AC, Waters S, Engel JA: Concomitant release of ventral tegmental acetylcholine and accumbal dopamine by ghrelin in rats. *PLoS One*. 2012; 7(11): e49557.
11. Skibicka KP, Shirazi RH, Hansson C, Dickson SL: Ghrelin interacts with neuropeptide Y Y1 and opioid receptors to increase food reward. *Endocrinology*. 2012; 153(3): 1194–205.
12. Salamone JD, Correa M, Mingote S, Weber SM: Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305(1): 1–8.
13. Uchida A, Zigman JM, Perelló M: Ghrelin and eating behavior: evidence and insights from genetically-modified mouse models. *Front Neurosci*. 2013; 7: 121.
14. Carlini VP, Monzón ME, Varas MM, Cragolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, et al.: Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 299(5): 739–43.
15. Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, et al.: Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci*. 2006; 9(3): 381–8.
16. Spencer SJ, Emmerzaal TL, Kozicz T, Andrews ZB: Ghrelin's Role in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Stress Response: Implications for Mood Disorders. *Biol Psychiatry*. 2015; 78(1): 19–27.
17. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS: A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans. *Diabetes*. 2001; 50(8): 1714–9.
18. Soriano-Guillén L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J: Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr*. 2004; 144(1): 36–42.
19. Jerlhag E, Engel JA: Ghrelin receptor antagonism attenuates nicotine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine release and conditioned place preference in mice. *Drug Alcohol Depend*. 2011; 117(2-3): 126–31.
20. Jerlhag E, Egecioglu E, Landgren S, Salomé N, Heilig M, Moechars D, et al.: Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(27): 11318–23.



21. Andrews ZB, Erion D, Beiler R, Liu Z-W, Abizaid A, Zigman J, et al.: Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism. *J Neurosci.* 2009; 29(45): 14057–65.
22. Chuang JC, Zigman JM: Ghrelin's roles in stress, mood, and anxiety regulation. *Int J Pept.* 2010; 2010.
23. Barim AO, Aydin S, Colak R, Dag E, Deniz O, Sahin I: Ghrelin, paraoxonase and arylesterase levels in depressive patients before and after citalopram treatment. *Clin Biochem.* 2009; 42(10-11): 1076–81.
24. Tolle V, Bassant M-H, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, et al.: Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology.* 2002; 143(4): 1353–61.
25. Yakabi K, Ro S, Onouhi T, Tanaka T, Ohno S, Miura S, et al.: Histamine mediates the stimulatory action of ghrelin on acid secretion in rat stomach. *Dig Dis Sci.* 2006; 51(8): 1313–21.
26. Goswami C, Shimada Y, Yoshimura M, Mondal A, Oda S, Tanaka T, et al.: Motilin Stimulates Gastric Acid Secretion in Coordination with Ghrelin in *Suncus murinus*. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0131554.
27. Delhanty PJD, van der Lely AJ: Ghrelin and glucose homeostasis. *Peptides.* 2011; 32(11): 2309–18.
28. Zhang G, Yin X, Qi Y, Pendyala L, Chen J, Hou D, et al.: Ghrelin and cardiovascular diseases. *Curr Cardiol Rev.* 2010; 6(1): 62–70.
29. Dupont J, Maillard V, Coyral-Castel S, Ramé C, Froment P: Ghrelin in female and male reproduction. *Int J Pept.* 2010; 2010.
30. Delhanty PJD, van der Eerden BCJ, van Leeuwen JPTM: Ghrelin and bone. *Biofactors.* 2014; 40(1): 41–8.
31. Baatar D, Patel K, Taub DD: The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. *Mol Cell Endocrinol.* 2011; 340(1): 44–58.
32. Dixit V, Schaffer E: Ghrelin inhibits leptin-and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest.* 2004; 114(1): 57–66.

33. Sibia V, Pagani F, Mrak E, Dieci E, Tulipano G, Ferrucci F: Pharmacological characterization of the ghrelin receptor mediating its inhibitory action on inflammatory pain in rats. *Amino Acids*. 2012; 43(4): 1751–9.
34. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M: Ghrelin and its therapeutic potential for cachectic patients. *Peptides*. 2009; 30(10): 1951–6.
35. Xu Y, Li Z, Yin Y, Lan H, Wang J, Zhao J, et al.: Ghrelin inhibits the differentiation of T Helper 17 cells through mTOR/STAT3 signaling pathway. *PLoS One*. 2015; 10(2): 1–14.
36. Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Nakamura N, Inui A: Ghrelin and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2013; 28(4): 521–6.
37. Fujimura K, Wakino S, Minakuchi H, Hasegawa K, Hosoya K, Komatsu M, et al.: Ghrelin protects against renal damages induced by angiotensin-II via an antioxidative stress mechanism in mice. *PLoS One*. 2014; 9(4).
38. Dobutovic B, Sudar E, Tepavcevic S, Djordjevic J, Djordjevic A, Radojcic M, et al.: Effects of ghrelin on protein expression of antioxidative enzymes and iNOS in the rat liver. *Arch Med Sci*. 2014; 10(4): 806–16.
39. Hofmann K: A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for Wnt signaling. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25(3): 111–2.
40. Chen M-H, Li Y-J, Kawakami T, Xu S-M, Chuang P-T: Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev*. 2004; 18(6): 641–59.
41. Ozawa A, Speaker RB, Lindberg I: Enzymatic characterization of a human acyltransferase activity. *PLoS One*. 2009; 4(5): e5426.
42. Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, Nakashima Y, Ida T, Sato T, et al.: Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 386(1): 153–8.
43. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, et al.: Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(17): 6320–5.
44. Zhu X, Cao Y, Voogd K, Voodg K, Steiner DF: On the processing of proghrelin to ghrelin. *J Biol Chem*. 2006; 281(50): 38867–70.

45. Shlimun A, Unniappan S: Ghrelin O-acyl transferase: Bridging ghrelin and energy homeostasis. *Int J Pept.* 2011; 2011.
46. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, et al.: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 1996; 273(5277): 974–7.
47. Lefkowitz RJ: Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25(8): 413–22.
48. McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, et al.: Molecular Analysis of Rat Pituitary and Hypothalamic Growth Hormone Secretagogue Receptors. *Mol Endocrinol.* 1997; 11(4): 415–23.
49. Camiña JP: Cell biology of the ghrelin receptor. *J Neuroendocrinol.* 2006; 18(1): 65–76.
50. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW: High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol.* 2003; 17(11): 2201–10.
51. Smith RG, Ploeg LHT Van der, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, et al.: Peptidomimetic Regulation of Growth Hormone Secretion. *Endocr Rev.* 1997; 18: 621–645.
52. Chow KBS, Sun J, Chu KM, Tai Cheung W, Cheng CHK, Wise H: The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 348(1): 247–54.
53. Carreira MC, Camiña JP, Smith RG, Casanueva FF: Agonist-specific coupling of growth hormone secretagogue receptor type 1a to different intracellular signaling systems. Role of adenosine. *Neuroendocrinology.* 2004; 79(1): 13–25.
54. Schellekens H, van Oeffelen WEPA, Dinan TG, Cryan JF: Promiscuous dimerization of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) attenuates ghrelin-mediated signaling. *J Biol Chem.* 2013; 288(1): 181–91.
55. Kern A, Albarran-Zeckler R, Walsh HE, Smith RG: Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron.* 2012; 73(2): 317–32.

56. Rediger A, Piechowski CL, Yi C-X, Tarnow P, Strotmann R, Grüters A, et al.: Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *J Biol Chem* . 2011; 286(45): 39623–31.
57. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, et al.: Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol*. 2002; 159(6): 1029–37.
58. Gilman AG: G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem. Ann Rev Biochem*. 1987; 56: 615–49.
59. Yin Y, Li Y, Zhang W: The growth hormone secretagogue receptor: Its intracellular signaling and regulation. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(3): 4837–55.
60. Bangert C, Brunner PM, Stingl G: Immune functions of the skin. *Clin Dermatol*. 2011; 29(4): 360–76.
61. Di Meglio P, Perera GK, Nestle FO: The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function. *Immunity*. 2011; 35(6): 857–69.
62. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO: Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(5): 289–301.
63. Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y: Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol*. 2007; 147(1): 176–83.
64. Barker JNWN, Griffiths CEM, Nickoloff BJ, Mitra RS, Dixit VM, Nickoloff BJ: Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet*. 1991; 337(8735): 211–4.
65. Beissert S, Cavazzana I, Mascia F, Meroni P, Pastore S, Tessari G, et al.: Mechanisms of immune-mediated skin diseases: an overview. *Clin Exp Rheumatol*. 2006; 24(1 Suppl 40): S1–6.
66. Salmon JK, Armstrong CA, Ansel JC: The skin as an immune organ. *West J Med* . 1994; 160(2): 146–52.
67. Fan L, Busser BW, Lifsted TQ, Oukka M, Lo D, Laufer TM: Antigen presentation by keratinocytes directs autoimmune skin disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(6): 3386–91.

68. Köck A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, et al.: Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med.* 1990; 172(6): 1609–14.
69. Hamminga EA, van der Lely AJ, Neumann HAM, Thio HB: Chronic inflammation in psoriasis and obesity: Implications for therapy. *Med Hypotheses.* 2006; 67(4): 768–73.
70. Xue K, Liu H, Jian Q, Liu B, Zhu D, Zhang M, et al.: Leptin induces secretion of pro-inflammatory cytokines by human keratinocytes in vitro - a possible reason for increased severity of psoriasis in patients with a high body mass index. *Exp Dermatol.* 2013; 22(6): 406–10.
71. Schön MP, Boehncke W-H: Psoriasis. *N Engl J Med.* 2005; 352(18): 1899–912.
72. Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB: Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA.* 2006; 296(14): 1735–41.
73. Zhang C, Zhu KJ, Zheng HF, Cui Y, Zhou FS, Chen YL, et al.: The effect of overweight and obesity on psoriasis patients in Chinese Han population: a hospital-based study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011; 25(1): 87–91.
74. Sakai R, Matsui S, Fukushima M, Yasuda H, Miyauchi H, Miyachi Y: Prognostic factor analysis for plaque psoriasis. *Dermatology.* 2005; 211(2): 103–6.
75. Hossler EW, Maroon MS, Mowad CM: Gastric bypass surgery improves psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 65(1): 198–200.
76. Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS: Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med.* 2010; 152(2): 93–100.
77. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML: The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev.* 2007; 8(1): 21–34.
78. Johnston A, Arnadottir S, Gudjonsson JE, Aphale A, Sigmarsson AA, Gunnarsson SI, et al.: Obesity in psoriasis: leptin and resistin as mediators of cutaneous inflammation. *Br J Dermatol.* 2008; 159(2): 342–50.
79. Ozdemir M, Yüksel M, Gökbel H, Okudan N, Mevlitoğlu I: Serum leptin, adiponectin, resistin and ghrelin levels in psoriatic patients treated with cyclosporin. *J Dermatol.* 2012; 39: 443–8.

80. Ucak H, Demir B, Cicek D, Erden I, Aydin S, Dertlioglu SB, et al.: Metabolic Changes and Serum Ghrelin Level in Patients with Psoriasis. *Dermatol Res Pract.* 2014; 2014: 1–6.
81. Milić P. Prisotnost grelinskega receptorja in njegova funkcija na keratinocitih. Diplomski seminar, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015.
82. Boukamp P: Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized. 1988; 106(March): 761–71.
83. Barreto-Chang OL, Dolmetsch RE: Calcium Imaging of Cortical Neurons using Fura-2 AM. *J Vis Exp.* 2009; (23): 3–5.
84. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al.: Ghrelin. *Mol Metab.* 2015; 4(6): 437–60.
85. Pérez-Pérez L, Allegue F, Caeiro JL, Fabeiro A, Zulaica JM: Severe psoriasis, morbid obesity and bariatric surgery. *Clin Exp Dermatol.* 2009; 34(7): 421–2.
86. Viovy J-L: Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms. *Rev Mod Phys.* 2000; 72(3): 813–72.

## 8. Dodatek

### Priloga I

#### 8.1. Kemikalije in oprema

Abcam	Cambridge, Velika Britanija
AddexBio	San Diego, Kalifornija, ZDA
Amersham (GE Healthcare Lifesciences)	Little Chalfont, Buckinghamshire, Velika Britanija
Bachem	Bubendorf, Švica
Berthold Technologies	Bad Wildbad, Nemčija
BioRad	Hercules, Kalifornija, ZDA
Cell signalling technology	Danvers, Massachusetts, ZDA
Eppendorf	Hamburg, Nemčija
EZBiolab	Carmel, ZDA
Gibco BRL	Carlsbad, Kalifornija, ZDA
GraphPad Prism 6.0 Software	San Diego, Kalifornija, ZDA
Greiner Bio-One	Frickenhausen, Nemčija
Merck	Darmstadt, Nemčija
Merck Millipore	Darmstadt, Nemčija
Molecular Probes	Eugene, Oregon, ZDA
Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, ZDA
Syngene	Cambridge, Velika Britanija
ThermoFisher Scientific	Waltham, Massachusetts, ZDA
Tecan	Männedorf, Švica
TPP	Trasadingen, Švica