

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURE DRAKSLER

**IZBOR PEPTIDNIH MIMETIKOV GRELINA IZ  
BAKTERIOFAGNIH PREDSTAVITVENIH KNJIŽNIC**

**SELECTION OF PEPTIDE MIMETICS OF GHRELIN FROM  
BACTERIOPHAGE DISPLAY LIBRARIES**

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mojce Lunder. Analizo nukleotidnih zaporedij je opravilo podjetje Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Nemčija.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Mojci Lunder za možnost opravljanja diplomske naloge na Katedri za farmacevtsko biologijo, pomoč pri izvajanju in pisanju diplomske naloge ter vso posredovano znanje. Hvala Mihatu Vodniku za pomoč skozi celoten potek diplomske naloge, vse nasvete in pomoč pri laboratorijskem delu ter dostopnost med pisanjem diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi Petru Moleku in vsem ostalim, ki sem jih srečeval med eksperimentalnim delom, za pomoč in prijetno vzdušje med delom v laboratoriju. Hvala družini in vsem ostalim, ki so mi stali ob strani med pisanjem diplomske naloge in tekom celotnega študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Mojce Lunder.

Jure Draksler

Ljubljana, Julij 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Mentorica: doc. dr. Mojca Lunder

Članica diplomske komisije: asist. dr. Simona Mencej Bedrač

## **POVZETEK**

Grelin je leta 1999 odkrit peptidni hormon, katerega glavni nalogi sta povečevanje apetita in izločanje ravnega hormona iz hipofize. Iz celic v želodčni steni se izloča v krvni obtok in deluje na receptorje za sekretagoge ravnega hormona v hipotalamusu. Čezmerna telesna masa in debelost postajata vedno večji zdravstveni problem v svetu in predstavljata rizični faktor za številne kronične bolezni. Zato se grelin, kot peptidni hormon, ki vpliva na apetit, vedno pogosteje pojavlja kot tarča raziskav za zdravljenje debelosti.

V okviru diplomske naloge smo poskušali poiskati peptidne mimetike grelina, ki bi z vezavo na njegov receptor inhibirali delovanje grelina. Uporabili smo metodo predstavitev na bakteriofagu. Peptide z afiniteto do receptorja za grelin smo dobili s presejanjem treh komercialno dostopnih bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic. V procesu selekcije smo primarna protitelesa vezali na paramagnetne kroglice s proteinom A/G in inkubirali fagno knjižnico. Nevezane fage smo sprali, ostale pa eluirali in nekatere izmed njih izolirali ter jim s sekvenciranjem določili aminokislinsko zaporedje. Te smo nato ovrednotili s testom ELISA in testi na celicah z izraženim receptorjem za grelin. Dobili smo nekaj skupnih motivov in klonov, ki so se vezali na primarna protitelesa. Inhibicije grelina nam z dosedanjimi testi še ni uspelo potrditi.

## **ABSTRACT**

Ghrelin is in 1999 discovered peptide hormone, that regulates appetite and growth hormone secretion. It is mainly produced by the stomach and transported by blood into the hypothalamus, where it binds to growth hormone secretagogue receptor. Overweight and obesity are becoming a big health problem in the world and are a risk factor for several chronic diseases. Ghrelin, as an appetite regulating hormone, is becoming frequently researched target for treating obesity.

The goal of our study was to identify peptide mimetics of ghrelin, which would inhibit its action by binding to ghrelin receptor. We used phage display method. In attempt to select inhibitors, three commercially available phage-display libraries were screened. In the process of selection we bound primary antibodies to protein A/G magnetic beads and incubate peptides from phage-display libraries. Unbound phages were washed away, others eluted and some of them isolated. We defined the amino acid sequence with sequencing and characterise them with ELISA test and tests on cells with expressed ghrelin receptor. We got a few common motives and some of the isolated clones showed good binding to primary antibodies, but we haven't managed to confirm inhibition of ghrelin so far.

## SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
AK	<b>aminokislina</b>
BSA	<b>bovine serum albumine</b> ( <i>angl.</i> ), goveji serumski albumin
EDTA	<b>ethylenediaminetetraacetic acid</b> ( <i>angl.</i> ), etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	<b>enzyme linked immunosorbent assay</b> ( <i>angl.</i> ), encimsko imunski test
GHSR	<b>growth hormone secretagogue receptor</b> ( <i>angl.</i> ), receptor za sekretagoge rastnega hormona
GOAT	<b>ghrelin O-acyltransferase</b> ( <i>angl.</i> ), encim grelin O-aciltransferaza
HEK	<b>human embrionic kidney cells</b> ( <i>angl.</i> ), človeške embrionalne ledvične celice
HRP	<b>horseradish peroxidase</b> ( <i>angl.</i> ), hrenova peroksidaza
IPTG	<b>izopropil-tio-β-D-galaktopiranozid</b> , induktor gena za β-galaktozidazo
ITM	<b>indeks telesne mase</b>
LB	<b>Luria-Broth</b> , tekoč medij za gojenje bakterij
MBOAT	<b>membrane bound O-acyl transferase</b> ( <i>angl.</i> ), skupina 16 aciltransferaznih encimov
OD <sub>600</sub>	<b>optical density</b> ( <i>angl.</i> ), optična gostota pri 600 nm
PBS	<b>phosphate buffer saline</b> ( <i>angl.</i> ), fosfatni pufer
PBST	<b>phosphate buffer saline Tween<sup>®</sup></b> ( <i>angl.</i> ), fosfatni pufer s Tween <sup>®</sup> -om
pfu	<b>plaque forming unit</b> ( <i>angl.</i> ); plakotvorna enota, označuje število fagov
RN	<b>rabbit N-terminus</b> ( <i>angl.</i> ), zajčja protitelesa, ki se vežejo na N-terminalni del (protitelesa) (grelina)
TMB	<b>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</b> ( <i>angl.</i> )
tris	<b>tris(hidroksimetil)aminometan</b> , pufer
X-gal	<b>5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid</b> , substrat za β-galaktozidazo

## IUPAC OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE

Aminokislina	Okrajšave
Alanin	Ala, A
Arginin	Arg, R
Asparagin	Asn, N
Asparaginska kislina	Asp, D
Cistein	Cys, C
Fenilalanin	Phe, F
Glicin	Gly, G
Glutamin	Gln, Q
Glutaminska kislina	Glu, E
Histidin	His, H

Aminokislina	Okrajšave
Izolevcin	Ile, I
Levcin	Leu, L
Lizin	Lys, K
Metionin	Met, M
Prolin	Pro, P
Serin	Ser, S
Tirozin	Tyr, Y
Treonin	Thr, T
Triptofan	Trp, W
Valin	Val, V

## UPORABLJENI IZRAZI

Izraz	Pomen
eluat	izpiranje, ki ga uporabimo v nadaljnjih stopnjah selekcije
fag	bakteriofag; virus, ki parazitira v bakterijah
plak	kolonija bakterij, ki so inficirane s fagi
sekvenciranje	določevanje nukleotidnega zaporedja
titer	koncentracija (fagov)

Pravilno uporabo strokovnih Slovenskih izrazov smo preverili na spletni strani Slovenskega biokemijskega društva (<http://bio.ijs.si/SBD/terminologija.html>) in v Slovenskem medicinskem slovarju.

# KAZALO VSEBINE

<b>1. UVOD.....</b>	<b>8</b>
1.1 GRELIN .....	10
1.2 STRUKTURA GRELINA .....	12
1.3 ENCIM GOAT .....	14
1.4 RECEPTOR ZA GRELIN .....	15
1.5 MEHANIZEM DELOVANJA.....	16
1.6 STRATEGIJE ZA POSEGANJE V DELOVANJE GRELINA .....	16
1.7 PREDSTAVITEV NA BAKTERIOFAGU.....	17
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>20</b>
3.1 MATERIALI .....	20
3.1.1 LABORATORIJSKA OPREMA.....	20
3.1.2 KEMIKALIJE IN PROTEINI .....	21
3.1.3 PUFRI, RAZTOPINE IN GOJIŠČA .....	23
3.1.4 FAGNE PREDSTAVITVENE KNJIŽNICE IN BAKTERIJE (NEW ENGLAND BIOLABS - ZDA).....	27
3.1.5 CELICE HEK 293 .....	28
3.2 METODE .....	28
3.2.1 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDNIH MIMETIKOV GRELINA.....	28
3.2.2 OCENA VEZAVE POMNOŽENIH ELUATOV NA PROTITELESA RN.....	34
3.2.3 PREVERJANJE VEZAVE POSAMEZNIH FAGNIH KLONOV NA PROTITELESA RN.....	35
3.2.4 RELATIVNA PRIMERJAVA VEZAVE KLONOV IZ RAZLIČNIH KNJIŽNIC NA PROTITELESA RN.....	35
3.2.5 PREVERJANJE SPECIFIČNOSTI VEZAVE FAGOV NA PROTITELESA .....	36
3.2.6 KOMPETICIJA FAGOV IN GRELINA ZA VEZAVO NA PROTITELESA RN.....	36
3.2.7 VZDRŽEVANJE CELIČNIH LINIJ HEK 293 WT IN HEK 293 GHSR-1A .....	37
3.2.8 ELISA TEST NA CELICAH HEK 293 WT IN HEK 293 GHSR-1A.....	37
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>38</b>
4.1 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDNIH MIMETIKOV GRELINA .....	38
4.2 OCENA VEZAVE POMNOŽENIH ELUATOV NA PROTITELESA RN .....	39
4.3 SEKVENCIRANJE.....	40
4.4 VEZAVA IZOLIRANIH FAGNIH KLONOV NA PROTITELESA RN .....	45
4.5 RELATIVNA PRIMERJAVA VEZAVE KLONOV IZ RAZLIČNIH KNJIŽNIC NA PROTITELESA RN.....	48
4.6 PREVERJANJE SPECIFIČNOSTI VEZAVE FAGOV NA PROTITELESA .....	49
4.7 KOMPETICIJA FAGOV IN GRELINA ZA VEZAVO NA PROTITELESA RN .....	50

4.8	ELISA TEST NA CELICAH HEK 293 WT IN HEK 293 GHSR-1A.....	51
5.	<b>RAZPRAVA</b> .....	<b>54</b>
6.	<b>ZAKLJUČEK</b> .....	<b>58</b>
7.	<b>LITERATURA</b> .....	<b>59</b>

# 1. UVOD

Čezmerna telesna masa in debelost postajata vedno večji zdravstveni problem razvitega sveta in držav v razvoju. Velike količine maščevja v telesu ogrožajo zdravje. O čezmerni telesni masi govorimo, kadar znaša indeks telesne mase (ITM) 25,0 ali več, pri ITM 30,0 in več pa že govorimo o debelosti. Po podatkih iz leta 2008, ki jih je objavila svetovna zdravstvena organizacija (SZO), je imelo kar 1,5 milijarde odraslih, starih 20 let ali več, čezmerno telesno maso. Od tega je bilo več kot 200 milijonov moških in skoraj 300 milijonov žensk debelih (1, 2, 3).

Čezmerna telesna masa in debelost poslabšata kakovost življenja, povečujeta obolevnost, skrajšujeta življenjsko dobo in veljata za največji dejavnik tveganja, za razvoj kroničnih nenalezljivih bolezni. Vsaj 2,8 milijona odraslih ljudi umre vsako leto zaradi čezmerne telesne mase, zaradi tega pa nastane še 44 % sladkornih bolezni, 23 % ishemičnih bolezni srca in od 7 do 41 % nekaterih vrst raka (2).

Preglednica I: Klasifikacija debelosti ter stopnja tveganja za razvoj sladkorne bolezni tipa 2, povišanega krvnega tlaka in srčno žilne bolezni glede na ITM in obseg pasu (1).

Klasifikacija	ITM (kg/m <sup>2</sup> )	Tveganje za razvoj z debelostjo povezanih bolezni (obseg pasu)	
	$\text{ITM} = \frac{\text{telesna masa (kg)}}{\text{telesna višina}^2 \text{ (m)}^2}$	moški $\geq 94$ cm ženske $\geq 80$ cm (povečano)	moški $\geq 102$ cm ženske $\geq 88$ cm (zelo povečano)
prenizka telesna masa	< 18,5	povečano <sup>1</sup>	
normalna telesna masa	18,5 – 24,9	normalno	
čezmerna telesna masa	25,0 – 29,9	povečano	veliko
debelost 1. stopnje	30,0 – 34,9	veliko	zelo veliko
debelost 2. stopnje	35,0 – 39,9	zelo veliko	zelo veliko

<sup>1</sup> Ugotovljeno je bilo, da razporeditev maščevja okoli pasu predstavlja veliko večje tveganje za zdravje, kot razporeditev maščevja okoli bokov. Velika količina maščevja okoli pasu zmanjša sposobnost pravilnega delovanja notranjih organov, povzroči kronične vnetne procese v številnih organih in posledica tega so številne kronične bolezni.



debelost 3. stopnje	$\geq 40,0$	izjemno veliko	izjemno veliko
---------------------	-------------	----------------	----------------

Številne raziskave so potrdile koristnost zmanjševanja čezmerne telesne mase. Z zmanjšanjem telesne mase za 10 % znižamo povišan krvni tlak, zmanjšamo pojav sladkorne bolezni in količino maščob v krvi. Izboljšamo tudi gibčnost, imamo manj bolečin v kolenih, kolkih in hrbtenici, izboljšamo samopodobo in kakovost življenja (1). Za znižanje čezmerne telesne mase je ključna sprememba življenjskega sloga, ki mora vključevati zdravo prehrano in telesno aktivnost.

Različne diete so večinoma neučinkovite, saj se pri dieti ob hitri izgubi telesne mase poveča tudi apetit. Zaradi tega je predvsem pri stanjih morbidne debelosti potreben tudi farmakološki pristop. Nabor učinkovin za poseganje v telesno maso je trenutno še zelo omejen. Tetrahidrolipstatin (orlistat) je inhibitor pankreasne lipaze, ki zavira absorpcijo zaužitih maščob (4, 5). Selektivni antagonist endokanabinoidnega receptorja tipa I (CB1) rimonabant zavira apetit. Uporablja se za zdravljenje debelosti in za odvajanje od kajenja. Receptor CB1 je z G-proteinom sklopljen receptor, prisoten pretežno v tistih delih centralnega živčnega sistema, ki nadzorujejo prehranjevanje (6). Sibutramin zavira privzem serotonina in noradrenalina v možganskih sinapsah in tako zmanjšuje apetit ter vzpodbuja termogenezo (7, 8), a je na podlagi priporočila Odbora za zdravila za uporabo v humani medicini (CHMP) pri Evropski agenciji za zdravila od januarja 2010 začasno umaknjen s tržišča v Evropski uniji (9). Skupaj z ostalimi amfetaminskimi učinkovinami je bil zaradi neželenih učinkov s tržišča umaknjen tudi fentermin, ki se je v številnih državah uporabljal za zmanjševanje apetita (10, 11).

Zaradi vedno bolj razširjene debelosti in pomanjkanja ustreznega farmakološkega zdravljenja potekajo številne raziskave, v katerih iščejo nove tarče za poseganje v telesno maso. Kot potencialne nove učinkovine za zdravljenje debelosti preučujejo različne peptidne in nepeptidne prenašalce, ki so vpleteni v regulacijo hranjenja, leptinske agoniste in spojine, ki bi zmanjšale rezistenco na leptin (12, 13). Leptin je anoreksigen peptidni hormon z molekulsko maso 16 kDa, ki ga izloča maščobno tkivo. Povzroča občutek sitosti in zavira apetit, ima pa tudi druge systemske učinke. Pri debelosti se razvije rezistenca na leptin, katere molekularni mehanizem še ni popolnoma pojasnjen (14).

Potencialne nove anoreksigene učinkovine so še agonisti melanokortinskih receptorjev tipa 4 (MC4R) (15, 16), selektivni antagonisti receptorjev za neuropeptid Y (17), peptidni mimetiki ciliarnega nevtropnega faktorja (18, 19), agonisti serotoninskih receptorjev 5-

HT2C in 5-HT1B in antagonisti 5-HT6 receptorjev (20, 21). Zanimive tarče so tudi peptidi, ki jih izloča gastrointestinalni trakt, kot odgovor na spremembe koncentracij posameznih sestavin hrane. Glukagonu podoben peptid-1 (22), peptid YY (23), oksintomodulin (24) in grelin (25) možganom posredujejo informacije o stanju zalog hranil v telesu in s tem regulirajo vnos hrane. Zniževanje telesne mase lahko dosežemo tudi s povečanjem porabe energije, kar omogočajo agonisti adrenergičnih  $\beta$ 3 receptorjev (26, 27) in agonisti receptorja za rastni hormon (28).

## 1.1 GRELIN

Grelin je oreksigeni periferni peptidni hormon, ki ga je leta 1999 odkril japonski znanstvenik Masayasu Kojima s sodelavci (29). Vpliva na številne procese v organizmu, njegovi glavni biološki funkciji pa sta povečevanje apetita in izločanje rastnega hormona iz hipofize. Grelin je pomembno udeležen v regulacijo hranjenja, saj povečuje apetit (30). Med poznanimi gastrointestinalnimi peptidi je grelin edini, ki vnos hrane stimulira, vsi ostali pa delujejo anoreksično. Koncentracija grelina v plazmi se med posameznimi obroki povečuje, tik pred zaužitim obrokom hrane doseže najvišjo vrednost in nato strmo upade (31, 32).

Na koncentracijo grelina v plazmi vplivajo številni dejavniki, med katerimi ima največji vpliv vnos hrane. Na upad koncentracije grelina bolj vpliva obrok bogat z ogljikovimi hidrati, kot tisti ki vsebuje veliko maščob. Beljakovinski obrok izzove različne, nasprotujoče si učinke (33-36). Koncentracija grelina v plazmi je obratno sorazmerna z indeksom telesne mase; znižana je pri osebah s čezmerno telesno težo in povišana pri anoreksiji ali kaheksiji. Ob dosegu idealne telesne mase se normalizira v obeh primerih. Pri Prader-Willi sindromu, genski bolezni ki jo spremljata nenasitna lakota in debelost, je nivo grelina v plazmi povišan, kljub debelosti.

Injiciranje grelina v podkožje ali v možganske prekate povzroči povečanje vnosa hrane, zmanjšanje porabe energije iz maščobnih zalog ter povečanje porabe zalog ogljikovih hidratov. Vsi ti dejavniki vodijo v povečanje telesne mase, predvsem na račun maščobnega tkiva (37). Poleg vpliva na apetit grelin povečuje tudi izločanje rastnega hormona iz hipofize (38) in ima še številne druge učinke (preglednica II).

Preglednica II: Fiziološki in patološki učinki grelina.

PODROČJE / BOLEZEN		UČINEK	MEHANIZEM DELOVANJA	VIR
Energijska homeostaza		povečuje apetit in spodbuja vnos hrane	delovanje na arkuatno jedro v hipotalamusu	37
			delovanje na aferentna vlakna vagusa	39
Rastni hormon		spodbuja izločanje	iz hipofize, preko aferentnih vagusnih živčnih povezav	38
Kardiovaskularni sistem	koronarna srčna bolezen	regulacija ateroskleroze	izboljša endotelijsko disfunkcijo	40
			protivnetni učinki	41
			imunoregulatorni učinki	42
		miokardna ishemija	zavre stres miokardnega endoplazemskega retikuluma	43
	antioksidativni učinki			
	hipertenzija	izboljša stanje	vazodilatacija	44
			zavre vaskularni oksidativni stres	45
			uravnava endotelijske funkcije	44
			zavre simpatični živčni sistem	46
	kardiomiopatija	izboljša stanje	zavre miokardno apoptozo	47
			izboljša ventrikularno remodeliranje	48
	periferne bolezni ožilja	izboljša stanje	zavira žilno kalcifikacijo	49
			ureditev periferne ateroskleroze	50
	srčno popuščanje	izboljšanje delovanja srca	vazodilatacija	51
			zmanjša porabo kisika v miokardu	52
		izboljšanje kaheksije	stimulacija apetita	53
izboljša presnovo maščob in ogljikovih hidratov				
protivnetni učinki			41	
antioksidativni učinki			43	
spodbuja rast skeletnih in srčne mišice	53			

Prebavni trakt	izločanje želodčne kisline	najverjetneje odvisno od količine grelina ali je pospešeno ali zavrto	preko vagusnih eferentnih vlaken deluje na parietalne celice	54
	praznjenje in krčenje želodca	pospeši	centralna aktivacija eferentnih nevronov	55
			aktivacija vagusnih aferentnih nevronov	
aktivacija enteričnega živčnega pleteža				
Imunski sistem			specifični in selektivni inhibitorni učinki na vnetnih citokinih IL-1 $\beta$ , IL-6 in TNF- $\alpha$	56
Puberteta		vpliva na potek pubertete	regulira izločanje gonadoliberina	57
Vpliv na stres, razpoloženje in anksioznost			mehanizem še ni pojasnjen	58
Zaviranje apoptoze v kardiomiocitih in endotelijskih celicah			Aktivacija preko ERK1/2 <sup>2</sup> in PI 3-kinaza/Akt <sup>3</sup>	59, 60

## 1.2 STRUKTURA GRELINA

Grelin je peptidni hormon, sestavljen iz 28 aminokislin. Na hidroksilno skupino serina na tretjem mestu pa je pripeta še oktanojska maščobna kislina, ki je ključna za njegovo vezavo na receptor in biološko aktivnost (61). Aktivni del molekule so prve štiri do pet aminokislin, vključno z aciliranim serinom. Kratki peptidi, ki vsebujejo to zaporedje, se dobro vežejo na receptor za sekretagoge ravnega hormona (32).

Poznanih je več oblik grelina, ki nastanejo z alternativnim izrezovanjem nezrele mRNA in posttranslacijskimi modifikacijami progrelina (preglednica III) (31). Aktivna oblika (acil-grelin) ima razpolovni čas le približno 30 minut in se pretvori v neaktivno obliko (des acil-grelin) (62). Celokupna plazemska koncentracija grelina je 200-600 ng/L, od česar je 80 % deacilirane oblike.

<sup>2</sup> ERK (extracellular signal-regulated kinase)

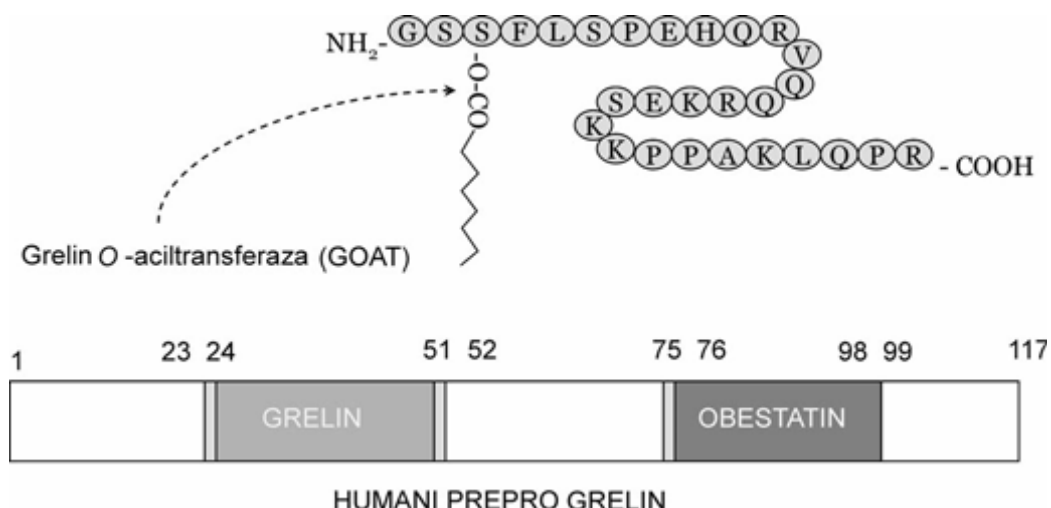
<sup>3</sup> Akt- poznan tudi kot protein kinaza B (PKB)

Preglednica III: Različne oblike grelina in njihove lastnosti.

Oblika	Število aminokislin	Aciliranje na Ser <sup>3</sup>	Biološka aktivnost	Vir
grelin	28 AK	oktanojska kislina	aktiven	63
des-Gln <sup>14</sup> -grelin	27 AK, manjka Gln <sup>14</sup>	oktanojska kislina	aktiven	64
grelin (1-27) (c8:0)	27 AK, manjka Arg <sup>28</sup>	oktanojska kislina	aktiven	63
grelin (1-27) (c10:0)	27 AK, manjka Arg <sup>28</sup>	dekanojska kislina	aktiven	63
grelin (c-10:1)	28 AK	9-decenojska kislina	ni podatka	63
grelin (c-10:0)	28 AK	dekanojska kislina	aktiven	63
des-acil-grelin	28 AK	neaciliran	neaktiven <sup>4</sup>	65
des-acil-grelin (1-27)	27 AK, manjka Arg <sup>28</sup>	neaciliran	neaktiven	65

Prekurzor grelina je prepro-grelin, ki je sestavljen iz 117 aminokislin. Z odcepitvijo signalnega zaporedja v lumnu endoplazmatskega retikuluma nastane progrelin (94 AK), ki ga acilira encim grelin-O-aciltransferaza. Z nadaljnjo proteolitsko cepitvijo nastaneta aciliran grelin in obestatin, ki deluje anoreksigeno, njegova vloga pa zaenkrat še ni pojasnjena.

<sup>4</sup> Neaciliran grelin ne povečuje izločanja rastnega hormona in apetita, vpliva pa na celično proliferacijo.



Slika 1: Struktura grelina in njegovega prekursorja (66).

Pri različnih vrstah je zelo ohranjenih 10 aminokislin na N-končnem delu grelina. Človeški in podganji grelin se razlikujeta le v dveh aminokislinah (31). Podoben peptid so odkrili tudi pri rastlinah, njegova vloga pa še ni pojasnjena (67).

Največ grelina nastaja v enteroendokrinih celicah stene želodca, od koder se izloča v krvni obtok, in v centralnem živčevju. V manjši količini nastaja tudi v črevesju (65, 68-70), trebušni slinavki (69, 71), limfocitih (69), hondrocitih (72), ledvicah (69, 73), placenti (74), pljučih (69), testisih (69, 75), jajčnikih (76, 77), skorji nadledvične žleze (78, 79), hipofizi (80, 81) in hipotalamusu (81-83).

### 1.3 ENCIM GOAT

Membranski GOAT (84, 85), poznan tudi kot MBOAT4 (*angl.* membrane-bound O-acyltransferase), spada v skupino 16 aciltransferaznih encimov, med katerimi pa lahko le GOAT acilira serin v grelinu (86, 87). GOAT je specifičen za grelin in ne acilira ostalih peptidov. Encim prepozna tri ključne aminokislinske ostanke (glicin-1, serin-3 in fenilalanin-4) in na serin na mestu 3 večinoma pripne oktanojsko kislino, redkeje pa dekanajojsko ali decenojsko kislino (63, 88). Če serin na mestu 3 zamenjamo s treoninom, GOAT pripenja oktanojsko kislino tudi na hidroksilno skupino treonina (89). Aciliranje grelina lahko povečamo z zaužitjem srednje dolgih maščobnih kislin ali srednje dolgih triacilgliceridov (90).

GOAT se v celici nahaja v endoplazemskem retikulumu (85). Lokalizacija GOAT po različnih tkivih sovpada z lokalizacijo grelina. Največ GOAT se nahaja v steni želodca in



Izraža se v številnih tkivih po telesu (61, 95-97), vendar ne veže grelina in njegova funkcija zaenkrat še ni pojasnjena (93, 98). Vezava grelina na GHSR-1a receptor povzroči konformacijsko spremembo receptorja in aktivacijo proteina G. Aktivirane podenote proteina G sprožijo intracelularne odzive z delovanjem na različne efektorske molekule.

Sekretagogi ravnega hormona aktivirajo znotrajcelično kalcijevo mobilizacijo preko fosfoinozitol specifične fosfolipaze C (PI-PLC), ki jo aktivira protein  $G_{\alpha q/11}$  (93, 98). V somatotropnih celicah PI-PLC deluje na fosfatidilinozitol 4,5-difosfat ( $PIP_2$ ), pri čemer nastaneta inozitol 1,4,5-trifosfat ( $IP_3$ ) in diacilglicerol (DAG) (99).  $IP_3$  povzroči sproščanje kalcija iz znotrajceličnih zalog, DAG pa je odgovoren za aktivacijo protein kinaze C (PKC). Z  $IP_3$  povzročena povišana vsebnost kalcija aktivira napetostno neodvisne  $K^+$ -kanalčke, kar hiperpolarizira celico (100). Prvemu toku kalcija sledi stalno pritekanje kalcija preko L in T tipa kalcijevih kanalčkov zaradi depolarizacije membrane (100-104).

## **1.5 MEHANIZEM DELOVANJA**

Grelin poveča apetit z delovanjem na arkuatno jedro v hipotalamusu, kjer se nahajata tudi centra za lakoto in sitost. Po vezavi na receptorje aktivira skupino nevronov, ki izločajo oreksigena peptidna prenašalca neuropeptid Y (NPY) in Agoutiju soroden protein (AgRP). Povzroči tudi sproščanje inhibitornega prenašalca GABA, ki z vezavo na svoje receptorje zmanjša postsinaptični potencial na nevronih POMC, ki izločajo anoreksigeni prenašalec proopiomelanokortin. Posledica teh dejavnikov je povečanje apetita (31, 32). Grelin tako nasprotuje učinkom leptina, ki sicer aktivira anoreksigene poti. Zaenkrat še ni povsem jasno ali lahko grelin prehaja krvno-možgansko pregrado. Nekatere raziskave kažejo, da grelin svoje učinke na apetit doseže posredno z aktivacijo receptorjev na aferentnih vlaknih vagusa (38).

## **1.6 STRATEGIJE ZA POSEGANJE V DELOVANJE GRELINA**

V delovanje grelina lahko posegamo (i) z vezavo spojin na plazemski grelin, kar prepreči njegovo vezavo na receptor, (ii) z inhibicijo GOAT, (iii) s spojinami, ki se vežejo na receptor GHSR-1a in (iv) s spojinami, ki se vežejo na receptor grenkega okusa (T2R).



Vezavo plazemskega grelina na receptor so do sedaj uspeli preprečiti z vnosom protiteles proti grelinu (105) in z L-oligonukleotidi RNA (spiegelmeri), ki se vežejo na grelin in preprečijo njegove učinke (106).

Z inhibicijo encima GOAT preprečimo nastajanje aktivne oblike grelina. Inhibitor GO-CoA-Tat je rekombinantni protein sestavljen iz oktanoiliranega grelina (GO), koencima A (CoA) in Tat peptida (Tat), ki oponaša trikomponentni kompleks, ki ga prepozna encim GOAT. Veže se v aktivno mesto kot lažni substrat in inhibira encim, saj vsebuje nerazcepljiv peptidni most. Raziskave na miših so pokazale veliko manjše povečanje telesne mase in nižjo vsebnost glukoze v krvi pri skupini, ki so ji dajali inhibitor, v primerjavi s skupino, ki ga ni prejela (107).

Poznani so številni peptidni in nepeptidni agonisti receptorja GHSR-1a. Nabor antagonistov, ki so zanimivi predvsem zaradi potencialne uporabe za terapijo debelosti, pa je še vedno omejen. Antagonistično delovanje tako izkazujejo peptid [D-Lys<sup>3</sup>] GHRP-6 (61, 108), s piperidinom substituirani kinazolinski derivati (109), nekateri analogi GHS, substituirani z 1,2,4-triazolno strukturo (110, 111), analogi piperazinijevega diamida (112) in nekateri karbohidrazidni derivati (113). Receptor GHSR-1a izkazuje visoko stopnjo intrinzične aktivnosti, zato so zanimive učinkovine tudi inverzni agonisti, kot je [D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>] substanca P (114).

Nedavno so dokazali, da agonisti receptorja T2R povečajo vsebnost acil-grelina v plazmi pri miših s stimulacijo  $\alpha$ -gustducina. To je  $\alpha$ -podenota proteina G, ki je vključena v prenos okusa. Imunofluorescenčne študije so pokazale 90-95 % kolokalizacijo  $\alpha$ -gustducina z enteroendokrinimi celicami, v katerih nastaja grelin (115). V prihodnosti lahko pričakujemo tudi raziskave z antagonisti tega receptorja, za zdravljenje debelosti.

## 1.7 PREDSTAVITEV NA BAKTERIOFAGU

Predstavitev na bakteriofagu je tehnika, ki omogoča izbor peptidov z želenimi lastnostmi iz obsežnih predstavitvenih knjižnic, ki so zmes velikega števila klonov fagov (do  $10^{12}$ ). Vsak izmed teh klonov na svoji površini izraža naključen peptid. Gene za različne peptide združimo z genom za kapsidni protein v fagnem ali fagemidnem genomu, s pomnoževanjem takih virusov v bakterijah pa dobimo bakteriofage, ki imajo na površini izražen peptid, za katerega nosijo zapis v genomu. Ker nam to predstavlja neposredno povezavo med genotipom (vstavljen gen v genomu) in fenotipom (fuzijski protein na

površini virusnega delca), lahko v postopku selekcije, angleško poimenovanem biopanning, iz knjižnice izoliramo fage s peptidi, ki tvorijo močne interakcije s tarčno molekulo. Nato gene za te peptide pomnožimo kot del fagnega genoma in s sekvenciranjem določimo zaporedje nukleotidov v genih in aminokislin v proteinih (116). Za selekcijo peptidov iz predstavivne knjižnice najprej tarčno molekulo vežemo na trdno podlago in knjižnico inkubiramo. Pri tem se na tarčno molekulo vežejo klone, ki z njo tvorijo močne interakcije. Protitelesa, ki jih vežemo na trdno podlago prepoznajo kratke peptide, ki posnemajo epitope izbranega peptida (mimotope). Takšni peptidi lahko sprožijo enak imunski odziv kot ustrezni antigeni in so zato možne tarče za nove učinkovine (117). Tiste klone, ki do tarče kažejo šibkejšo afiniteto speremo s pufri, ki jim dodamo površinsko aktivne snovi (118, 119). Vezane klone nato kompetitivno eluiramo s protitelesi ali z znanimi tarčnimi ligandi, ki tvorijo specifične interakcije s tarčo in zato izpodrinejo vezane fage. Pri nekompetitivni specifični eluciji pa določena snov oslabi interakcijo faga s tarčo brez vezave na vezavno mesto (npr. kalcijev kelator etilenglikol-bis(2-aminoetil)-N,N,N,N-tetraacetna kislina (EGTA)). Specifična elucija nam omogoči, da se izognemo eluciji fagov, ki so se vezali na neblokirano površino ali molekulo uporabljeno za blokiranje. Poznamo tudi nespecifično elucijo, s katero lahko prav tako prekinemo interakcije med tarčno molekulo in peptidom (116) ter elucijo z infekcijo, kjer vezane klone eluiramo z dodatkom svežih bakterijskih celic (116, 120). Po eluciji klone pomnožimo in jih uporabimo v naslednji selekcijski stopnji. Navadno izvedemo 3 do 5 selekcijskih stopenj. V vsaki naslednji stopnji naj bi se povečal delež fagov z močnimi interakcijami s tarčno molekulo. Eluirane klone nato izoliramo ter določimo nukleotidno zaporedje inserta in aminokislinsko zaporedje izraženega peptida.

## 2. NAMEN DELA

Grelin je peptidni hormon, ki vpliva na številne funkcije v organizmu, glavni biološki funkciji pa sta povečevanje apetita in izločanje ravnega hormona iz hipofize. Apetit poveča z delovanjem na arkuatno jedro v hipotalamusu, kjer se nahajata tudi centra za lakoto in sitost.

Čezmerna telesna masa in debelost postajata, ob povečevanju števila debelih ljudi, vedno večji zdravstveni problem celotnega sveta, saj poslabšata kakovost življenja, povečujeta obolevnost, skrajšujeta življenjsko dobo in veljata za največji dejavnik tveganja, za razvoj kroničnih nenalezljivih bolezni. Zato postaja grelin, kot peptidni hormon, ki vpliva na apetit, vedno privlačnejša tarča raziskav za zdravljenje debelosti.

Naš namen je z metodo predstavitve na bakteriofagu, iz bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic, poiskati peptide, ki se bodo vezali na receptor GHSR-1a in na ta način zavirali delovanje grelina. Na ta način bi zmanjšali velik problem mnogih ljudi, povečan apetit. Uporabili bomo tri različne bakteriofagne predstavitvene knjižnice, ki izražajo peptide različnih dolžin, primerjali pa bomo lahko tudi linearne in ciklične peptide, saj dve knjižnici vsebujeta linearne, ena pa ciklične peptide.

Na protein A, oz. protein G bomo najprej vezali zajčja protitelesa, ki se vežejo na N-terminalni del grelina (RN), nato pa inkubirali vsako bakteriofagno knjižnico posebej. Delo z membranskimi receptorji, kot tarčami, je težje izvedljivo, zato bomo pri iskanju peptidov uporabili protitelesa, saj pričakujemo, da mesta na protitelesih oponašajo mesta na receptorju. Izvedli bomo tri selekcijske stopnje z namenom, da bi dobili fage s čim večjo afiniteto do tarče. V vsaki selekcijski stopnji bomo sprali fage, ki se ne bodo vezali, ostale pa eluirali in jih uporabili v naslednji stopnji. Po tretji selekcijski stopnji bomo petnajst naključnih fagov izolirali, jim določili aminokislinsko zaporedje s sekvenciranjem in jih ovrednotili z encimsko imunskim testom na trdnem nosilcu (ELISA) in testom na celicah HEK 293. Rezultate posameznih klonov bomo ovrednotili in poskušali ugotoviti ali se vežejo na tarčo in ali lahko z njimi uspešno zavremo vezavo grelina na receptor.

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 LABORATORIJSKA OPREMA

LABORATORIJSKA OPREMA	MODEL; PROIZVAJALEC
Analitska tehtnica	Exacta 610 EB; Tehtnica, Slovenija
Avtoklav	Systec 2540 EL; Bel-Art Products, ZDA in A 21; Kambič, Slovenija
Aseptična komora	LFVP 9 in LVFP 12; Iskra PIO, Slovenija
Celični inkubator	BINDER, Nemčija
Centrifuge	5804R in 5415R; Eppendorf, Nemčija Megafuge 16R, Thermo Scientific, ZDA
Centrifugirke (15 mL, 50 mL)	TPP, Švica
Hladilnik (4°C)	Gorenje, Slovenija
Inkubatorja	Unihood 650; MBI, Kanada in WTC Binder, Nemčija
Magnetno mešalo	Tehtnica, Slovenija
Mikrocentrifugirke (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Nemčija
Mikropipete	Eppendorf, Nemčija in Biohit, Finska
Mikroprocesorsko vodeni termostat	Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems, ZDA
Mikrotitrne ploščice	Immuno MaxiSorp™; Nalge Nunc International, Danska 6 well Culture Cluster, Costar, Corning Incorporated, ZDA StreptaWell High Bind; Roche, Švica
Mikrotitrski čitalec UV-VIS	Tecan Genios; Tecan, Švica
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
Nastavki za mikropipete	Sarstedt, Nemčija in Biohit, Finska

Parafilmski trak	Pechiney Plastic Packaging, ZDA
Petrijevke	TPP, Švica
pH meter	691; $\Omega$ Metrohm, Švica
Plastične epruvete	TPP, Švica
Plinski gorilnik	Labogaz 206; Campingaz, Francija
Spatula po Drigalskem	Assistent, Nemčija
Sterilizacijski filtri 0.20 $\mu$ m	Minisart; Sartorius, Nemčija
Stresalnik	Vibromix 403EVT; Tehnica, Slovenija
Štoparica	Assistent, Nemčija
Vibracijski stresalnik	Vibromix 104 EV; Tehnica, Slovenija
Zamrzovalnik (-20°C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80°C)	Sanyo, Japonska

### 3.1.2 KEMIKALIJE IN PROTEINI

MATERIAL	PROIZVAJALEC
Absolutni etanol	Fluka, Švica
Agar	Roth, Avstrija
Agaroz	Sigma, ZDA
Biotiniliran grelin	Phoenix Pharmaceuticals, ZDA
Citronska kislina monohidrat (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ×H <sub>2</sub> O)	Serva Electrophoresis, Nemčija
Dinatrijev hidrogenfosfat	Fluka, Švica
Osnovno gojišče za sesalske celice DMEM	Life Technologies, ZDA
EDTA	Merck, Nemčija
Etanol, 70 %	Fluka, Švica
Goveji fetalni serum (FBS)	HyClone, ZDA
Formalin, 10 %	Sigma, ZDA
Geneticin	Merck Millipore, ZDA

Glicerol	Fluka, Švica
Glicin	Sigma, ZDA
Goveji serumski albumin	Sigma, ZDA
Grelin	Bachem, Švica; Sigma, ZDA
IPTG	Sigma, ZDA
Kalijev dihidrogenfosfat	Kemika, Hrvaška
Kalijev klorid	Carlo Erba, Italija
Klorovodikova kislina	Merck, Nemčija
Bakterijsko gojišče LB	Invitrogen, ZDA
L-glutamin	Sigma, ZDA
Magnezijev diklorid	Fluka, Švica
Monoklonska protitelesa anti M13, konjugirana s hrenovo peroksidazo (HRP)	General Electric Healthcare, Združeno Kraljestvo
Natrijev jodid	Merck, Nemčija
Natrijev klorid	Riedel-de Hæn, Nemčija
Nigrozin	Sigma, ZDA
Polietilenglikol 8000	Sigma, ZDA
Posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Slovenija
Paramagnetne kroglice s proteinom A	Invitrogen, ZDA
Paramagnetne kroglice s proteinom G	Invitrogen, ZDA
Poliklonska zajčja protitelesa proti grelinu H-40	Santa Cruz Biotechnology, ZDA
Primarna poliklonska zajčja protitelesa proti grelinu RN	LifeSpan Biosciences, ZDA
Zmes penicilina in streptomicina	EuroClone, Italija
Sekundarna kozja protitelesa, usmerjena proti zajčjim, konjugirana s HRP	Santa Cruz Biotechnology, ZDA
Tetraciklin	Sigma, ZDA
TMB	Sigma, ZDA
Tripsin	Sigma, ZDA

Tris	Roth, Avstrija
Tween <sup>®</sup> 20	Sigma, ZDA
X-gal	Sigma, ZDA
Žveplova (VI) kislina, 95-97 %	Merck, Nemčija

### 3.1.3 PUFRI, RAZTOPINE IN GOJIŠČA

#### 3.1.3.1 PUFRI

##### Pufer PBS (pH 7,4)

NaCl	3,2 g
KCl	0,08 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,722 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,096 g
Prečiščena voda	do 400 mL

NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> smo raztopili v prečiščeni vodi. Pomagali smo si z magnetnim mešalom. Z 1 M HCl smo uravnali pH na 7,4, nato pa pufer avtoklavirali in ga shranjevali na sobni temperaturi.

##### Pufer za spiranje fagov v afinitetni selekciji (0,1 % PBST / 0,1 % BSA)

BSA 5 %	1 mL
Tween <sup>®</sup> 20	50 µL
Pufer PBS	do 50 mL

Zmešali smo BSA, Tween<sup>®</sup> 20 in že prej pripravljeni pufer PBS in nato sterilno filtrirali.

**Pufer za blokiranje** smo pripravili na enak način, le da je bilo razmerje 0,05 % PBST / 1 % BSA. Oba pufra smo shranjevali na sobni temperaturi.

##### Pufer za spiranje ELISA (0,1 % PBST)

Tween <sup>®</sup> 20	50 µL
Pufer PBS	do 50 mL

V pufer PBS smo dodali Tween<sup>®</sup> 20 in premešali. **Pufer za vezavo (0,05 % PBST)** smo pripravili na enak način, le da smo 50 mL pufra PBS dodali 25 µL Tween<sup>®</sup> 20. Oba pufra smo shranjevali na sobni temperaturi.

### **Jodidni pufer (pH 8,0)**

Tris	10 mM
EDTA	1 mM
NaI	4 M

Ustrezne količine sestavin smo raztopili v 12 mL prečiščene vode in uravnali pH raztopine na 8,0. Raztopino smo nato v aseptičnem prostoru filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,20 µm in jo shranjevali na sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo.

### **Pufer za elucijo fagov (200 mM glicin z 0,4 M NaCl, pH 2,2)**

NaCl	23,4 g
Glicin	0,75 g
Prečiščena voda	do 100 mL

Natehtali smo 23,4 g NaCl in 0,75 g glicina ter dodali 80 mL prečiščene vode. S koncentrirano HCl smo uravnali pH na 2,2 in dopolnili s prečiščeno vodo do 100 mL. Pufer smo sterilno filtrirali in raztopino shranjevali pri 4°C v dobro zaprtem vsebniku.

### **Pufer za nevtralizacijo (1 M Tris, pH 9,1)**

Tris	121,1 g
Prečiščena voda	do 1000 mL

121,1 g tris smo raztopili v 800 mL prečiščene vode. Z 1 M HCl smo uravnali pH vrednost na 9,1. Ko se je raztopina ohladila smo dodali prečiščeno vodo do 1 L. Raztopino smo sterilizirali s sterilno filtracijo in jo shranjevali pri sobni temperaturi v dobro zaprtem vsebniku.

### **Pufer za TMB**

Citronska kislina	21 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	17,8 g
Prečiščena voda	do 1000 mL

Citronsko kislino in dinatrijev hidrogenfosfat smo raztopili v 1 L prečiščene vode in uravnali pH na 6,0.



### 3.1.3.2 RAZTOPINE REAGENTOV

#### 1 M klorovodikova kislina (HCl)

HCl 37 %	3,07 mL
Prečiščena voda	do 100 mL

V prečiščeno vodo smo previdno dodali ustrezno količino koncentrirane HCl (37 %). Tako pripravljeno kislino smo shranjevali na sobni temperaturi.

#### Polietilenglikol/NaCl

PEG 8000	8 g
NaCl	5,85 g
Prečiščena voda	do 40 mL

PEG 8000 in NaCl smo raztopili v prečiščeni vodi in avtoklavirali. Raztopino smo hranili na sobni temperaturi.

#### Tetraciklin – založna raztopina

12,5 mg/ml tetraciklina v glicerolu

Raztopino smo shranjevali pri  $-20^{\circ}\text{C}$ , zaščiteno pred svetlobo. Pred uporabo smo jo dobro pretresli.

#### 5 % mleko v prahu

Mleko v prahu	0,5 g
Pufer PBS	do 10 mL

V centrifugirko smo natehtali mleko v prahu in dopolnili s puffrom PBS. Po premešanju, smo vsebino centrifugirali 10 minut pri 11.000 obratih in uporabili samo supernatant. Na enak način smo, v ustreznih razmerjih, pripravili tudi **1 % mleko v prahu**.

### 3.1.3.3 GOJIŠČA

#### Tekoče gojišče LB

LB	8 g
Prečiščena voda	do 400 mL

8 g že pripravljene mešanice, ki vsebuje pepton, kvasni ekstrakt in NaCl v razmerju 2:1:1, smo raztopili v prečiščeni vodi in avtoklavirali. V 400 mL raztopine je bilo tako 4 mL

peptona ter po 2 mL kvasnega ekstrakta in NaCl. Gojišče smo shranjevali na sobni temperaturi.

#### **Agarno gojišče LB**

LB	8 g
Agar	6 g
Prečiščena voda	do 400 mL

8 g že pripravljene mešanice LB in 6 g agarja smo raztopili v prečiščeni vodi in avtoklavirali. Tekočino smo, še preden se je ohladila, v aseptičnem prostoru vlili v petrijevke in pustili, da se je vsebina strdila. Plošče smo shranjevali pri 4°C.

#### **Selektivno agarno gojišče LB s tetraciklinom (1,67 mg/mL)**

Tetraciklin (založna raztopina, 12,5 mg/mL)	20 µL
Tekoče gojišče LB	130 µL

Tekočemu gojišču LB smo dodali tetraciklin in 150 µL raztopine odpipetirali na petrijevko z agarnim gojiščem LB. Raztopino smo s spatulo po Drigalskem dobro razmazali po celotni površini. Gojišče smo pripravljali sproti.

#### **Diferencialno agarno gojišče LB/IPTG/X-gal**

LB	8 g
Agar	6 g
IPTG (založna raztopina) 1 M	84 µL
X-gal 2 %	800 µL
Prečiščena voda	do 400 mL

8 g že pripravljene mešanice LB in 6 g agarja smo raztopili v prečiščeni vodi in avtoklavirali. Tekočini smo, ko je bila še vroča, v aseptičnem prostoru dodali IPTG in X-gal ter premešali. Še toplo tekočino smo vlili v petrijevke in pustili, da se je vsebina strdila. Plošče smo shranjevali pri 4°C.

### **Gojišče za celice HEK 293 GHSR-1a**

DMEM	88 mL
FBS	10 mL
L-glutamin	1 mL
P/S	1 mL
Geneticin	250 µL

Vse sestavine smo v aseptičnem okolju zmešali v 250 mL plastenki in shranjevali v hladilniku. DMEM je osnovno gojišče, ki vsebuje aminokisljine, vitamine, anorganske soli, D-glukozo in pufer HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina). FBS je goveji fetalni serumski albumin, ki vsebuje rastne faktorje in vse kar sesalske celice potrebujejo za rast. L-glutamin je aminokislina, ki je gojišče DMEM ne vsebuje, zato jo dodamo naknadno. P/S je zmes antibiotikov penicilina in streptomocina ki preprečuje okužbo celic. Geneticin je aminoglikozidni antibiotik, ki inhibira sintezo proteinov in ga uporabljamo kot selekcijski marker za transformirane celice, ki so rezistentne na geneticin. Koncentracija **založne raztopine geneticina je 200 mg/mL**, končna koncentracija v gojišču pa 500 µg/mL.

Za gojenje celic **HEK 293 wt (divji tip)** uporabljamo enako gojišče brez dodatka geneticina.

### **Top agaroz**

Agaroz	7 g
MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	1 g
Tekoč medij LB	1 L

Raztopino smo razdelili v alikvotne po 50 mL in jih avtoklavirali. V trdnem stanju smo jih shranjevali na sobni temperaturi, pred uporabo pa previdno stalili s segrevanjem v mikrovalovni pečici.

## **3.1.4 FAGNE PREDSTAVITVENE KNJIŽNICE IN BAKTERIJE (NEW ENGLAND BIOLABS - ZDA)**

Uporabili smo fagne peptidno-predstavitvene knjižnice Ph.D. -7™, Ph.D. -12™ in Ph.D. -C7C™. Knjižnice sestavljajo bakteriofagi M13, ki imajo na svoji površini prikazane naključne linearne heptapeptide (Ph.D. -7™), linearne dodekapeptide (Ph.D. -12™) ali

ciklične heptapeptide (Ph.D. -C7C™). Kompleksnost knjižnice Ph.D. -7™ je  $1,1 \times 10^9$ , drugih dveh pa  $1,2 \times 10^9$ , kar pomeni da vsebujeta knjižnici s heptapeptidi skoraj vse od  $1,28 \times 10^9$  možnih različnih sekvenc, knjižnica Ph.D.™-12 pa le majhen delež (manj kot eno milijontino) od  $4,1 \times 10^{15}$  možnih različnih sekvenc.

Za pomnoževanje bakteriofagov smo uporabili bakterije *Escherichia coli*, sev ER2738. Za delo smo uporabljali trajne kulture na selektivnem agarnem gojišču LB s tetraciklinom. Bakterije smo razredčili s tekočim medijem LB v razmerju 1:10<sup>3</sup>. 50 µl tako razredčenih bakterij smo odpipetirali na petrijevko z omenjenim gojiščem in dobro razmazali po celotni površini, s spatulo po Drigalskem. Tako pripravljeno ploščo smo pustili čez noč na 37°C, da so se bakterije namnožile, nato pa jih shranjevali na 4°C največ 14 dni.

Za mikorbiološko titriranje in pomnoževanje bakteriofagov smo uporabljali prekonočne bakterijske kulture. V 100 mL erlenmajerici smo zmešali 10 mL tekočega gojišča LB in 10 µL založne raztopine tetraciklina ter dodali eno kolonijo bakterij iz trajne kulture. Erlenmajerico smo pustili stresati čez noč na 37°C.

### **3.1.5 CELICE HEK 293**

Celice HEK 293 (človeške embrionalne ledvične celice) so nesmrtnne celice, ki rastejo pritrjene na podlago. Celice HEK 293 GHSR-1a so celice HEK 293, ki so transformirane z genom za receptor GHSR-1a, zato na svoji površini stabilno izražajo omenjeni receptor.

## **3.2 METODE**

### **3.2.1 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDNIH MIMETIKOV GRELINA**

Iz treh bakteriofagnih peptidno-predstavitvenih knjižnic smo izolirali fage s prikazanimi peptidi, ki se vežejo na poliklonska protitelesa usmerjena proti grelinu. Osnovni postopek selekcije je bil pri vseh treh knjižnicah enak, razlike pri posameznih stopnjah pa so podane v preglednici na koncu poglavja (Preglednica V).

### **Vezava fagov na protitelesa v raztopini**

V 1,5 mL mikrocentrifugirki smo poliklonskim zajčjim protitelesom RN (3,5 µg) dodali fage in dopolnili s pufrom za vezavo do 100 µL ter inkubirali 2 uri na sobni temperaturi z rahlim stresanjem (450 vrt./min).

### **Priprava paramagnetnih kroglic s proteinom G/proteinom A**

30 µL (0,9 mg) kroglic smo v 1,5 mL mikrocentrifugirki enkrat sprali z 1 mL pufru za spiranje fagov. Po dodatku pufru smo kroglice narahlo premešali in inkubirali eno minuto na sobni temperaturi. Nato smo kroglice zbrali z magnetom in tekočino odstranili z mikropipeto. Površino kroglic smo blokirali s pufrom za blokiranje eno uro pri sobni temperaturi in 450 vrt./min. in jih trikrat sprali z 1 mL pufru za spiranje fagov.

### **Vezava kompleksov protitelo-fag na protein G/protein A**

V tem koraku smo združili vsebini mikrocentrifugirk iz obeh predhodnih stopenj. Kompleks protiteles s fagi smo dodali pripravljenim paramagnetnim kroglicam s proteinom G/proteinom A in pustili 45 minut inkubirati na sobni temperaturi s stresanjem (400 vrt./min).

### **Spiranje nevezanih fagov**

Po enourni vezavi, smo kroglice sprali z 1 mL pufru za spiranje fagov. S tem smo zagotovili, da so nam ostali vezani le še fagi, ki so tvorili najmočnejše komplekse, šibko vezane pa smo sprali.

### **Elucija vezanih fagov**

Vezane fage smo eluirali s kislim elucijskim pufrom, ki spremeni naboj proteinov in ionsko sestavo medija in s tem povzroči disociacijo fagov s protiteles. Dodali smo 400 µL glicinskega pufru (pH=2,2)/0,4 M NaCl/0,1 % BSA in mikrocentrifurko 10 minut močno stresali (650 vrt./min). Supernatant z eluiranimi fagi smo z mikropipeto prenesli v novo mikrocentrifugirko in takoj nevtralizirali z 28 µL nevtralizacijskega pufru s pH 9,1.

### **Titracija eluiranih in pomnoženih fagov**

Za titracijo smo odvzeli 3 µL eluata in ga redčili s tekočim gojiščem LB v razponu  $10^2$  do  $10^4$ . V mikrovalovni pečici smo previdno stalili top agarozo, in jo razdelili po 3 ml v

centrifugirke, pri 52°C. Pri tej temperaturi se top agarozna še ne strdi, istočasno pa ne poškoduje fagov ali bakterij. 10 µL posamezne razredčitve eluata smo odpipetirali k 200 µL bakterijske kulture (OD<sub>600</sub> = 0,01-0,05), premešali in pustili približno 3 minute na sobni temperaturi. Celotno vsebino posamezne mikrocentrifugirke smo z mikropipeto prenesli v centrifugirko s top agarozo, premešali in vlili na petrijevke z diferencialnim agarnim gojiščem LB/IPTG/X-gal, ki so bile predhodno ogrete na 37°C. Ko se je top agarozna strdila, smo plošče obrnili in jih preko noči postavili v inkubator na 37°C. Naslednji dan smo prešteli modre kolonije na ploščah in izračunali število eluiranih fagov ter delež elucije, ki nam pove kakšen delež od v selekcijo vnesenih fagov imamo v eluatu po selekciji. Titracija pomnoženih fagov je potekala na enak način, le da smo v tem primeru eluat redčili do 10<sup>9</sup>.

$$\text{Titer} = \frac{\text{št. plakov} \times R}{V}$$

Enačba 1: Izračun titra fagov. R pomeni faktor redčenja, V pa volumen eluata.

$$\text{Delež elucije} = \frac{\text{št. eluiranih fagov}}{\text{št. vnesenih fagov}}$$

Enačba 2: Izračun deleža elucije.

### **Pomnoževanje eluiranih fagov**

V 300 ml erlenmajerico z utori smo nalili 20 mL tekočega gojišča LB s tetraciklinom, dodali 200 µL prekonočne kulture bakterij ter celoten prvi nepomnoženi eluat (razen 3 µL, ki smo ga odpipetirali za titracijo). Inkubirali smo 4,5 ure pri 37°C s stresanjem 250 vrt./min.

### **Izolacija in čiščenje pomnoženih fagov**

Bakterijsko kulturo s pomnoženimi fagi smo prelili v 50 mL centrifugirko in jih centrifugirali 10 minut pri 10.000 vrt./min v centrifugi, ki smo jo predhodno ohladili na 4°C. Supernatant smo prelili v novo centrifugirko in postopek centrifugiranja še enkrat ponovili. S tem smo odstranili bakterije, ki so se posedle na dno, v supernatantu pa so nam ostali fagi. Supernatantu smo nato dodali 1/6 volumna kulture pomnoženih fagov PEG/NaCl, premešali in preko noči postavili v hladilnik. Naslednji dan smo centrifugirke centrifugirali 15 minut pri 10.000 vrt./min pri 4°C, pri čemer so se fagi posedli na dno.

Supernatant smo odlili, preostanek tekočine odstranili s pipeto, oborino pa resuspendirali v 1 mL PBS in močno premešali z vibracijskim mešalom. Suspenzijo fagov smo prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko in centrifugirali 5 minut (10.000 vrt./min, 4°C). Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in ponovno dodali 1/6 volumna PEG/NaCl ter eno uro inkubirali na ledu. Fage, ki so se oborili, smo nato 10 minut centrifugirali pri 13.200 vrt./min (4°C). Supernatant smo odstranili, usedlino fagov pa raztopili v 200 µL 50 % glicerola in jih shranili pri -20°C.

### **Subtraktivna selekcija**

Ta korak smo izvedli samo v drugi in tretji stopnji selekcije. Z njim smo iz nabora fagov izločili tiste, ki so se vezali na površino mikrocentrifugirke, blokirno sredstvo, protein A/G ali prazne paramagnetne kroglice. Pomnoženi eluat predhodne stopnje smo pred dodatkom protiteles RN najprej eno uro inkubirali v mikrocentrifugirki z blokiranimi paramagnetnimi kroglicami (Preglednica V). Supernatant iz tega koraka smo nato združili s protitelesi in postopek nadaljevali kot pri stopnji brez subtraktivnega koraka.

### **Izolacija in pomnoževanje posameznih fagnih klonov**

V 24 sterilnih epruвет smo v aseptičnem okolju odpipetirali po 2 mL prekonočne kulture bakterij, razredčene s tekočim gojiščem LB s tetraciklinom v razmerju 1:100. V vsako epruветo smo dodali eno modro bakterijsko kolonijo, ki smo jo s sterilnim nastavkom za mikropipete pobrali iz petrijevke po titraciji nepomnoženega eluata tretje stopnje. Epruветe smo nato 4,5 ure stresali pri 37°C z 250 vrt./min in pomnožene fage izolirali po prej opisanem postopku.

### **Izolacija DNK in sekvenciranje**

Iz vsakega izmed pomnoženih izoliranih klonov smo izolirali enovijačno DNA (ssDNA). 500 µL pomnoženega klona v gojišču LB smo odpipetirali v mikrocentrifugirko in dodali 200 µL PEG/NaCl. Vsebino smo premešali in pustili 10 minut na sobni temperaturi, nato pa 10 minut centrifugirali pri 10.000 vrt./min in 4°C. Supernatant smo odstranili, oborini pa dodali 100 µL jodidnega pufra in močno premešali z vibracijskim mešalnikom. S tem smo denaturirali plaščne proteine fagov in sprostili fagno ssDNA. Nato smo dodali 250 µL ohlajenega absolutnega etanola in 10 minut inkubirali na sobni temperaturi. Vsebino smo 10 minut centrifugirali pri 10.000 vrt./min in 4°C, odstranili supernatant in oborjeno DNA

sprali s 100  $\mu$ L 70 % etanola. Sekvenciranje DNK je opravilo podjetje Eurofins MWG Operon, Martiensried, Nemčija. Uporabili smo začetni oligonukleotid -96gIII (5'-TGA GTT TCG TCA CCA GTA-3').

### **Uničenje biološkega materiala**

Steklovino smo dezinficirali z natrijevim hipokloritom in avtoklavirali. Ves odpadni material za enkratno uporabo (centrifugirke, mikrocentrifugirke, epruvete, petrijevke, nastavke za pipete, tekoči material,...) smo odložili v zabojnike za nevarne biološke odpadke.

### **Pregled selekcij s knjižnicami Ph.D.-7, Ph.D.-12 in Ph.D.-C7C**

Naredili smo tri selekcijske stopnje. Fage smo v raztopini vezali na protitelesa RN, nastale komplekse protitelo-fag pa na protein G (v selekciji s knjižnico Ph.D.-7 smo uporabili protein A). V drugi in tretji stopnji selekcije smo naredili še subtraktivni korak (na blokiranih paramagnetnih kroglicah). Po vsaki stopnji smo titrirali pomnožen in nepomnožen eluat ter iz teh podatkov izračunali titer in delež elucije. Iz nepomnoženega eluata po tretji stopnji smo naključno izolirali 24 klonov in 15 določili zaporedje vstavljenega peptida s sekvenciranjem genoma. Vezavo izoliranih fagnih klonov na protitelesa RN smo preverili s testom ELISA.



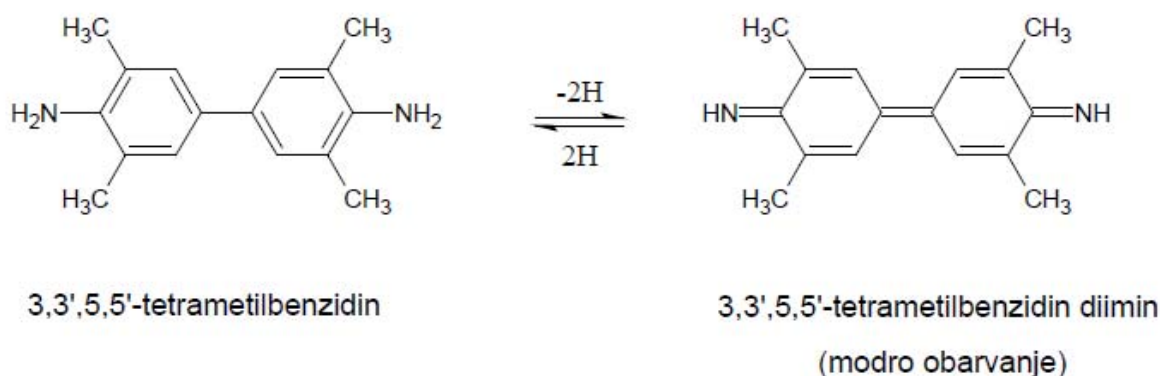
Preglednica V: Potek selekcije s knjižnicami. Kratica PE pomeni pomnožen eluat, NE nepomnožen eluat, PK paramagnetne kroglice.

		1. stopnja	2. stopnja	3. stopnja
Priprava paramagnetnih kroglic (PK)	Količina PK	30 $\mu$ L (0.9 mg)	20 $\mu$ L (0.6 mg) (10 $\mu$ L za subtraktivni korak)	
	Spiranje	1x 1 mL pufra za spiranje fagov		
	Blokiranje	Pufer za blokiranje, 1 h		
	Spiranje blok. pufra	3x 1 mL pufra za spiranje fagov	1x 1 mL pufra za spiranje fagov	
Subtraktivna selekcija (na blokiranih PK)			(Ph.D. -7, Ph.D. -12: 10 $\mu$ L); (Ph.D. -C7C: 15 $\mu$ L) PE 1. st.	(Ph.D. -7, Ph.D. -12: 20 $\mu$ L); (Ph.D. -C7C: 15 $\mu$ L) PE 2. st.
			10 $\mu$ L blokiranih PK, 90 $\mu$ L pufra za vezavo; 1 h, sobna T, stresanje	
Vezava fagov na protitelesa v raztopini	Količina protiteles RN	7 $\mu$ L (3.5 $\mu$ g)		3.5 $\mu$ L (1.75 $\mu$ g)
	Fagi	15 $\mu$ L fagne knjižnice	(Ph.D.-7, Ph.D.-12: 100 $\mu$ L) (Ph.D.-C7C: 105 $\mu$ L)	(Ph.D.-7, Ph.D.-12: 110 $\mu$ L) (Ph.D.-C7C: 105 $\mu$ L)
	PBST 0.05%	78 $\mu$ L	iz subtraktivnega koraka	iz subtraktivnega koraka
	Vezava	2 h, sobna T, stresanje	1 h, sobna T, stresanje	30 min, sobna T, stresanje
Vezava kompleksov pAb-fag na protein G (Ph.D.-C7C: protein A)	Količina PK	30 $\mu$ L blokiranih PK	10 $\mu$ L blokiranih PK	
	Vezava	45 min, stresanje 400 rpm	30 min, stresanje 400 rpm	
Spiranje		7x1 mL pufra za spiranje fagov	15x1 mL pufra za spiranje fagov	
Elucija		Elucijski pufer: 400 $\mu$ L, 10 min, 650 rpm Nevtralizacija: 28 $\mu$ L nevtralizacijskega pufra		

### 3.2.2 OCENA VEZAVE POMNOŽENIH ELUATOV NA PROTITELESA RN

Vezavo pomnoženih eluatov vseh treh knjižnic na protitelesa RN smo preverili s testom ELISA. Uporabili smo mikrotitrne ploščice Immuno MaxiSorp™.

- 1) 50  $\mu\text{L}$  raztopine protiteles RN v PBS s koncentracijo 5  $\mu\text{g/mL}$  smo nanegli v vdolbinice mikrotitrskih ploščic in stresali preko noči pri 4°C s 50 vrt./min. Vdolbinice, ki so nam služile za negativno kontrolo smo pustili prazne.
- 2) Naslednji dan smo raztopino protiteles odstranili in v vdolbinice odpipetirali 280  $\mu\text{L}$  5 % mleka v prahu. Po dveh urah stresa na sobni temperaturi (50 vrt./min) smo blokirno sredstvo odlili in preostanek odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo.
- 3) Vdolbinice smo trikrat sprali z 200  $\mu\text{L}$  pufru za spiranje. Vsakič smo mikrotitrsko ploščico za 5 minut postavili na stresalnik pri 100 vrt./min. Preostalo tekočino smo odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo.
- 4) 10  $\mu\text{L}$  pomnoženih eluatov smo redčili z 90  $\mu\text{L}$  1 % mleka v prahu. 100  $\mu\text{L}$  tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v vdolbinice in inkubirali eno uro na sobni temperaturi pri 50 vrt./min.
- 5) Suspenzijo fagov smo odlili in vdolbinice petkrat sprali s pufrom za spiranje po prej opisanem postopku.
- 6) Monoklonska protitelesa proti fagom M13, označena s hrenovo peroksidazo (HRP/anti-M13) smo redčili z 1 % mlekom v prahu v razmerju 1:5000 in 100  $\mu\text{L}$  raztopine odpipetirali v vsako vdolbinico. Po enourni inkubaciji na sobni temperaturi pri 50 vrt./min smo protitelesa odlili, vdolbinice ponovno petkrat spirali s pufrom za spiranje in preostalo tekočino odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo.
- 7) Za detekcijo smo tik pred uporabo reagent TMB redčili z ustreznim pufrom v razmerju 1:1. 200  $\mu\text{L}$  raztopine smo odpipetirali v vdolbinico in počakali približno 10 minut, da se je razvilo modro obarvanje.
- 8) Reakcijo smo prekinili z dodatkom 50  $\mu\text{L}$  2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v vsako vdolbinico, pri čemer se je raztopina obarvala rumeno. Absorbanco smo izmerili pri 450 nm na mikrotitrskem čitalcu Tecan Genios.



Slika 2: Sprememba strukture TMB-ja ob stiku s hrenovo peroksidazo. Posledica je modro obarvanje produkta.

### 3.2.3 PREVERJANJE VEZAVE POSAMEZNIH FAGNIH KLONOV NA PROTITELESA RN

Vezavo posameznih klonov smo preverili s testom ELISA, ki je potekal po enakem postopku kot pri oceni vezave pomnoženih eluatov. Za posamezen vzorec smo uporabili 10  $\mu\text{L}$  pomnoženega klona. Za vsak klon smo izmerili absorbanco vzorca in negativne kontrole.

### 3.2.4 RELATIVNA PRIMERJAVA VEZAVE KLONOV IZ RAZLIČNIH KNJIŽNIC NA PROTITELESA RN

Za primerjavo vezave smo izbrali po tri klone iz vsake knjižnice, ki so se v predhodnih poizkusih dobro vezali. Za negativno kontrolo smo uporabili klon K4 (GTFHPQ), ki se specifično veže na streptavidin. Koncentracijo vseh fagnih klonov smo določili s titracijo in s tem zagotovili enako število virusnih delcev v vsaki vdolbinici mikrotitrne ploščice. Uporabili smo  $5 \times 10^9$  fagov, ki smo jih suspendirali v 1 % mleku v PBS. Z vsakim klonom smo naredili tri ponovitve poskusa, le s klonoma RC-2 in RC-9 smo poskus ponovili le dvakrat zaradi omejene količine razpoložljivih virusov. Postopek testa ELISA je bil enak kot pri primerjavi vezave klonov iz posamezne knjižnice.

### **3.2.5 PREVERJANJE SPECIFIČNOSTI VEZAVE FAGOV NA PROTITELESA**

Specifičnost vezave fagov na protitelesa smo preverjali s testom ELISA, ki je potekal po enakem postopku kot pri oceni vezave pomnoženih eluatov. Uporabili smo po en klon iz vsake knjižnice (R7-14, R12-2 in RC-9) in tri različne tarče (protitelesa RN, protitelesa H40 in mleko). Vsaki tarči smo ločeno dodali po 10  $\mu$ L posameznega klona.

Tako protitelesa RN, kot tudi H40, so zajčja protitelesa in imajo zato enako konstantno regijo (Fc), vendar se protitelesa H40 vežejo na drugo mesto na grelinu.

### **3.2.6 KOMPETICIJA FAGOV IN GRELINA ZA VEZAVO NA PROTITELESA RN**

Biotiniliran humani grelin smo vezali na mikrotitrne ploščice prekrivane s streptavidinom in preverjali ali naraščajoča koncentracija fagov vpliva na vezavo protiteles RN na grelin.

- 1) 50  $\mu$ l raztopine biotiniliranega grelina (b-grelin) v PBS (0,01 mg/mL) smo odpipetirali v vdolbinice mikrotitrskih ploščic prekritih s streptavidinom in inkubirali eno uro na sobni temperaturi.
- 2) Po eni uri inkubacije b-grelina smo odvečno tekočino odlili ter trikrat spirali s pufrom za spiranje. Preostalo tekočino smo odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo.
- 3) Med inkubacijo b-grelina smo pripravili vzorce, ki so vsebovali 10  $\mu$ L protiteles RN razredčenih v 1 % BSA (5  $\mu$ g/mL), ustrezno količino klona ( $4 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^{10}$  in  $3,6 \times 10^{10}$  pfu), volumen pa smo dopolnili do 100  $\mu$ L z 1 % BSA. Vzorce smo inkubirali eno uro pri sobni temperaturi na 450 vrt./min.
- 4) Vzorce smo odpipetirali v vdolbinice mikrotitrne ploščice in inkubirali 30 minut pri 50 vrt./min. Nato smo vdolbinice petkrat sprali s pufrom za spiranje po že znanem postopku.
- 5) V vsako vdolbinico smo odpipetirali 100  $\mu$ L sekundarnih kozjih protiteles usmerjenih proti zajčjim, konjugiranih s HRP (goat anti-rabbit/HRP), ki smo jih redčili z 1 % BSA v razmerju 1:5000 in inkubirali eno uro na 50 vrt./min, nato pa ponovno petkrat spirali s pufrom za spiranje in preostalo tekočino odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo.

- 6) Detekcijo smo izvedli z reagentom TMB po prej opisanem postopku.

### **3.2.7 VZDRŽEVANJE CELIČNIH LINIJ HEK 293 WT IN HEK 293 GHSR-1A**

Celice smo gojili v plastenkah z 8 mL ustreznega gojišča v celičnem inkubatorju (5 % CO<sub>2</sub> v zraku, 37°C, atmosfera nasičena z vlago). Ko so celice prerastle 70-80 % površine smo jih tripsinizirali po naslednjem postopku.

- 1) S sterilno serološko pipeto smo odstranili gojišče in celice previdno sprali s 5 mL PBS.
- 2) K celicam smo dodali 5 mL 0,02 % raztopine EDTA v PBS in 0,05 % tripsina ter inkubirali v celičnem inkubatorju dokler se celice niso ločile od podlage (opazovali smo jih z mikroskopom).
- 3) Suspenzijo celic smo prenesli v sterilno 15 mL centrifugirko, dodali 5 mL celičnega gojišča in premešali s pipetiranjem.
- 4) Celice smo ločili od gojišča s centrifugiranjem (5 min, 200 vrt./min). Gojišče smo odstranili in celice resuspendirali v svežem gojišču.
- 5) Število viabilnih celic smo določili z barvanjem z nigrozinom in štetjem celic pod mikroskopom. V novo plastenko smo prenesli  $1 \times 10^6$  celic in dodali ustrezen volumen gojišča do 8 mL.

### **3.2.8 ELISA TEST NA CELICAH HEK 293 WT IN HEK 293 GHSR-1A**

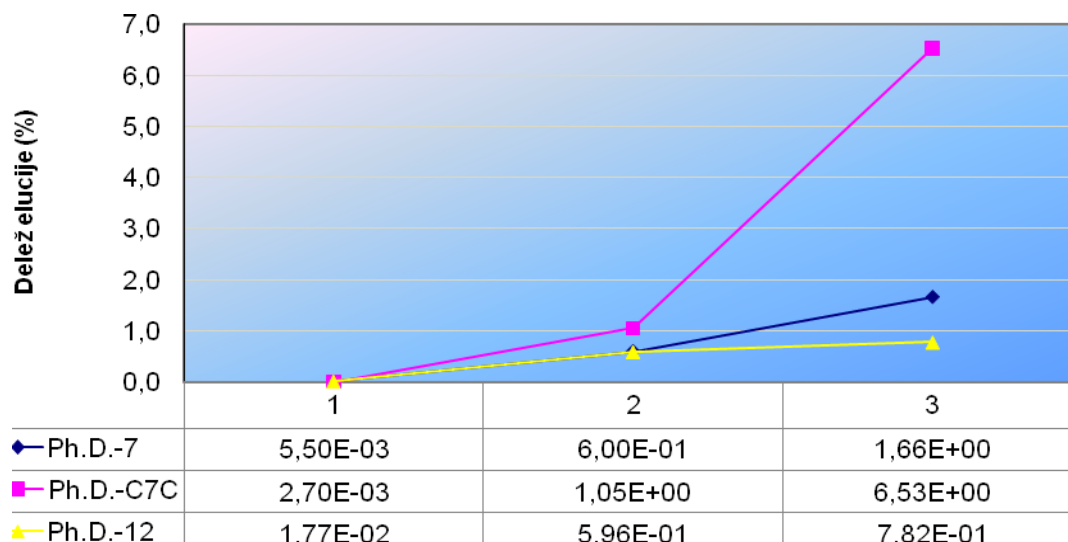
- 1) Celice smo gojili po prej opisanem postopku. Po tripsinizaciji smo jih prenesli v polistirensko mikrotitrsko ploščico s šestimi vdolbinicami (3×2 Costar) in dodali 2 mL gojišča.
- 2) Ko so celice prerastle površino smo odstranili gojišče in celice fiksirali z 10 % formalinom (10 min).
- 3) S pipeto smo odstranili formalin in celice previdno sprali z 2 mL PBS. Površino mikrotitrskih ploščic smo blokirali eno uro z 2 % BSA v PBS.
- 4) Pufer za blokiranje smo odstranili, enkrat sprali s PBS, dodali fage ali pozitivno kontrolo (biotiniliran grelin) v 1 % BSA in inkubirali eno uro.

- 5) Fage smo dvakrat sprali z 2 mL PBS, dodali protitelesa HRP/anti-M13 (1:5000) in inkubirali eno uro.
- 6) Vdolbinice smo dvakrat sprali z 2 mL PBS in izvedli detekcijo z reagentom TMB po opisanem postopku.

## 4. REZULTATI

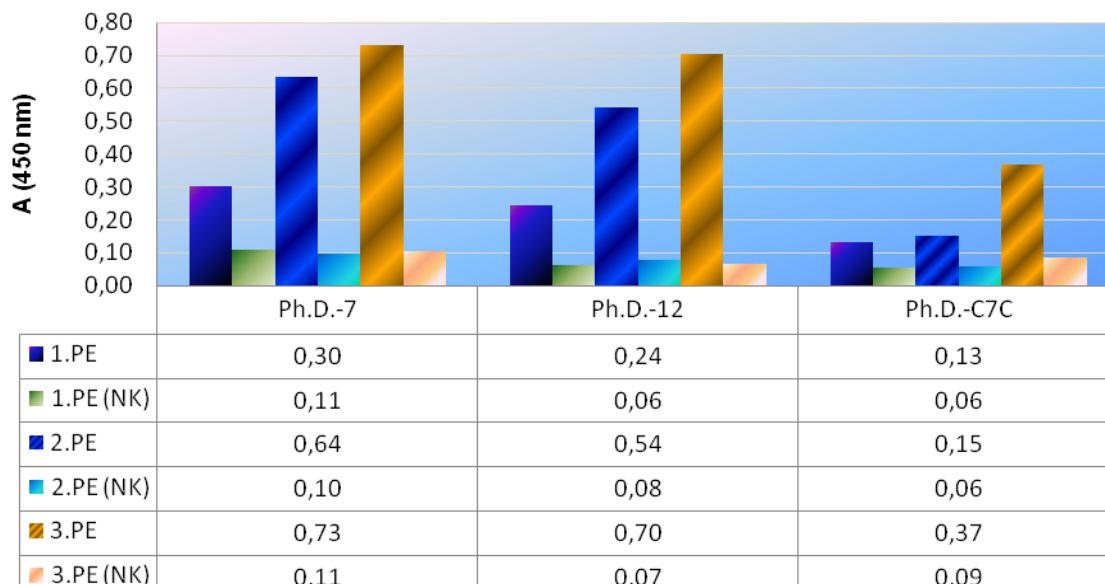
### 4.1 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDNIH MIMETIKOV GRELINA

Izvedli smo tri selekcijske stopnje in po vsaki izmed stopenj titrirali pomnoženi in nepomnoženi eluat. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali količino fagov v eluatu in delež eluiranih fagov v posamezni stopnji selekcije, kar nam je omogočilo spremljanje poteka selekcije. Delež eluiranih fagov je naraščal v vsaki stopnji pri vseh treh knjižnicah, najbolj pa pri knjižnici Ph.D.-C7C, kjer se je med prvo in tretjo stopnjo delež elucije povečal za 2419-krat, pri knjižnici Ph.D.-7 za 302-krat in pri knjižnici Ph.D.-12 za 44-krat.



Slika 3: Spreminjanje deleža elucije med posameznimi selekcijskimi stopnjami.

## 4.2 OCENA VEZAVE POMNOŽENIH ELUATOV NA PROTITELESA RN



Slika 4: Primerjava vezave pomnoženih eluatov vseh treh knjižnic po posameznih selekcijskih stopnjah selekcije na protitelesa RN.

Pomnožene eluate smo inkubirali v mikrotitrskih ploščicah, na katere smo predhodno vezali protitelesa RN. Vezane fage smo detektirali s sekundarnimi protitelesi, ki so bila označena s hrenovo peroksidazo (HRP). Test temelji na oksidaciji reagenta TMB (slika 2). V primeru večje afinitete fagov tarčnih protiteles, se jih več veže v času inkubacije. Več teh kompleksov pomeni večjo količino hrenove peroksidaze, s katero so označena sekundarna protitelesa, kar vodi do več oksidirane TMB-ja in intenzivnejšega obarvanja. Da bi se izognili lažno pozitivnim rezultatom, zaradi vezave fagov na plastiko, smo mikrotitrške ploščice blokirali z mlekom v prahu.

Pri selekcijah z vsemi tremi knjižnicami, so imeli pomnoženi eluati kasnejših selekcijskih stopenj večjo afiniteto do tarčne molekule. Iz tega lahko sklepamo, da smo z izvedenim postopkom selekcije v naboru fagov uspešno obogatili klone, ki se specifično vežejo na tarčna protitelesa. Pomnoženi eluati ciklične knjižnice so v vsaki stopnji izkazovali precej nižjo vezavo na protitelesa kot pomnoženi eluati ostalih dveh knjižnic, vendar rezultati niso neposredno primerljivi saj se koncentracije fagov v vzorcu razlikujejo.

### 4.3 SEKVENCIRANJE

Po zaključeni tretji selekcijski stopnji smo petnajst izoliranih klonov iz vsake knjižnice poslali na sekvenciranje. Od teh 45 klonov sekvenciranje ni uspelo pri štirih, dva pa sta vsebovala nepričakovano mutirano aminokislinsko zaporedje (preglednica VIII). Med sekvencami klonov smo opazili nekatere motive, ki so se ponavljali v več različnih klonih, med katerimi se motiv N(I/L/V)F pojavlja v vseh treh knjižnicah. Pri knjižnici Ph.D.-7 so imeli kar trije kloni enako aminokislinsko zaporedje, pri knjižnici Ph.D.-C7C pa smo dobili dva takšna klona.

Preglednica VI: Aminokislinska zaporedja klonov iz knjižnice Ph.D.<sup>TM</sup>-7.

KLON	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE
R7-1	K I A A E P P
R7-2	W D N P R S W
R7-3	M N R H I P A
R7-4	K P S G L T Y
R7-5	N I F A S A D
R7-6	A N L F H S E
R7-7	W D N P R S W
R7-8	G L V D V L F
R7-9	W D N P R S W
R7-10	N L F A T G Y
R7-11	S K S T Q L M
R7-12	Q Q I S S G L
R7-13	G L V D A L Y
R7-14	M N Y R E I Y
R7-15	sekvenciranje ni uspelo



Preglednica VII: Aminokislinska zaporedja klonov iz knjižnice Ph.D.<sup>TM</sup>-12.

KLON	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE
R12-1	T S T Q G V S V L L N H
R12-2	G L I D G M M F Y Q R G
R12-3	T V D D M A A M D G G H
R12-4	T P S D I G Y Q P N P N
R12-5	N V F Q M E N Q N A L G
R12-6	W S Q A Y I A Q F A G R
R12-7	S V H P D L Y R M T L A
R12-8	N I K L H H F P H D A P
R12-9	N I F S L E Q D L M R S
R12-10	L S R E L T Y A G F V A
R12-11	L P H R N L F E I E G R
R12-12	S N R P V F T Y T D F A
R12-13	N I F A S D T T K S T W
R12-14	N L F A T H A M W R T T
R12-15	W R T P A D T M A A M D

Preglednica VIII: Aminokislinska zaporedja klonov<sup>6</sup> iz knjižnice Ph.D.<sup>TM</sup>-C7C.

KLON	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE
RC-1	C N I F Q N P S C
RC-2	C N I F S D I R C
RC-3	C S P K H Q G S C
RC-4	C I I L N N N N C
RC-5	sekvenciranje ni uspelo
RC-6	H F A C N M F S D P K S G G G
RC-7	C H P E E H Stop <sup>7</sup> T C
RC-8	C S I R T N N G C
RC-9	C S P K H W G P C
RC-10	C S P K E M G L C
RC-11	C I A L N N N E C
RC-12	C S I R T N N G C
RC-13	sekvenciranje ni uspelo
RC-14	sekvenciranje ni uspelo
RC-15	T F L F W M G L F A L E R S K R G G G S

Pri delu s knjižnico Ph.D.-C7C smo imeli nekaj problemov zaradi okužbe s fagi divjega tipa. Verjetno je posledica tega tudi, da nismo mogli razbrati aminokislinskih zaporedij vseh klonov, ki smo jih poslali na sekvenciranje, oziroma so imeli drugačno zaporedje od pričakovanega. Od petnajstih klonov, ki smo jih poslali na sekvenciranje, je bilo le deset cikličnih heptapeptidov.

Vsi heptapeptidi iz te knjižnice imajo na obeh straneh pripet cistein. Ta dva cisteina sta označena v aminokislinskih zaporedjih klonov, a jih ne upoštevamo kot del ponavljajočega se motiva.

<sup>6</sup> Klona RC-6 in RC-15 sta verjetno mutirala zaradi okužene knjižnice.

<sup>7</sup> Gre za amber Stop kodon (TAG), namesto katerega se vgradi glutamin (Q).

Preglednica IX: Ponavljajoči motivi med različnimi kloni.

KLON	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE									
R7-6	A	N	L	F	H	S	E			
R12-5	N	V	F	Q	M	E	N	Q	N	A
R12-9	N	I	F	S	L	E	Q	D	L	M
R12-11	L	P	H	R	N	L	F	E	I	E
RC-1	C	N	I	F	Q	N	P	S	C	
RC-2	C	N	I	F	S	D	I	R	C	
R7-5	N	I	F	A	S	A	D			
R12-13	N	I	F	A	S	D	T	T	K	S
R7-10	N	L	F	A	T	G	Y			
R12-14	N	L	F	A	T	H	A	M	W	R
R12-15	W	R	T	P	A	D	T	M	A	A
R12-3	T	V	D	D	M	A	A	M	D	G
RC-3	C	S	P	K	H	Q	G	S	C	
RC-9	C	S	P	K	H	W	G	P	C	
RC-10	C	S	P	K	E	M	G	L	C	
RC-4	C	I	I	L	N	N	N	N	C	
RC-11	C	I	A	L	N	N	N	E	C	
R7-8	G	L	V	D	V	L	F			
R7-13	G	L	V	D	A	L	Y			
R12-2	G	L	I	D	G	M	M	F	Y	Q

Motiv, ki ga najpogosteje najdemo v prikazanih peptidih iz vseh treh knjižnic je N(I/L/V)F. Na prvem mestu tega motiva je v vseh klonih asparagin, ki ima hidrofilno stransko verigo. Je amid asparaginske kisline, na heteroatomih (N, O) pa se nahajajo nevezni elektronski pari, ki lahko tvorijo vodikove vezi. Na drugem mestu tega motiva so alifatske aminokislina levcin, izolevcin ali v enem primeru valin, ki izkazujejo podobne lastnosti. Hidrofobne interakcije, ki se vzpostavljajo med stranskimi verigami teh aminokislin so pomembne za pravilno zvitje proteinov. Na tretjem mestu tega motiva se vedno pojavi fenilalanin, ki ima v stranski verigi aromatsko skupino s hidrofobnimi lastnostmi. V štirih klonih se nato za fenilalaninom pojavi alifatska aminokislina alanin, za

njim pa serin ali treonin, ki imata oba kratko hidrofilno stransko verigo s hidroksilno skupino. Razlikujeta se le v eni metilni skupini. Obe lahko tvorita močne vodikove vezi, pri čemer nastopata kot proton donorja.

Struktura klona R12-14 od devete do enajste aminokislina je enaka strukturi klona R12-15 od prve do tretje aminokislina (motiv WRT). Na prvem mestu se nahaja triptofan, ki je hidrofobna aminokislina, z veliko togo aromatsko skupino v stranski verigi. Na drugem mestu motiva je arginin, močno polarna aminokislina z dolgo alifatsko stransko verigo, na koncu katere se nahaja gvanidinska funkcionalna skupina, ki je pri fiziološkem pH protonirana. Zaradi svoje fleksibilnosti je primerna za vezavo na molekule z negativnim nabojem. Pozitivni naboj je delokaliziran zaradi konjugacije med dvojno vezjo in neveznim elektronskim parom na dušiku, zato lahko tvori multiple vodikove vezi. Na tretjem mestu motiva je treonin.

Peptida R12-3 in R12-15 se ujemata v petih zaporednih aminokislinah. Na prvem in četrtem mestu motiva MAAMD se nahaja metionin, ki ima hidrofobno stransko verigo z žveplom. Na drugem in tretjem mestu se nahajata zaporedno vezana dva alanina, na petem mestu motiva pa se v obeh klonih nahaja asparaginska kislina, ki ima v stranski verigi prosto karboksilno skupino. Tvori lahko vodikove vezi kot proton donor (-OH) ali proton akceptor (karbonilna skupina). Pri fiziološkem pH je karboksilna skupina ionizirana, zato lahko pri tvorbi vodikovih vezi sodeluje le kot akceptor protonov. Dve mesti pred prvim metioninom tega motiva se v obeh klonih pojavi še ena asparaginska kislina.

Podobne motive najdemo tudi v treh klonih knjižnice Ph.D.-C7C (vsem trem je skupen motiv SPK). Pri klonih RC-3, RC-9 in RC-10 je na prvem mestu serin, ki mu sledita prolin in lizin. Prolin vsebuje za aminokislina neobičajen cikel, ki vsebuje  $\alpha$ -aminsko skupino v obliki amidne skupine (CO-NH). Lizin je bazična aminokislina. Pri fiziološkem pH nosi pozitiven naboj in s tem omogoča tvorbo elektrostatskih interakcij. Lahko pa tvori tudi vodikove vezi kot donor protona. Vsi trije kloni se ujemajo tudi na mestu 6, kjer imajo glicin. To je najmanjša aminokislina, ki zlahka rotira in je zelo fleksibilna. Klona RC-3 in RC-9 se ujemata tudi na mestu 4, kjer imata oba bazičen histidin.

Zelo podobno strukturo imata tudi klona RC-4 in RC-11. Na prvem mestu imata oba izolevcin, na drugem pa izolevcin oziroma alanin, ki imata oba hidrofobno stransko verigo. Na tretjem mestu obeh klonov je levcin, na mestih 4 do 6 pa so zaporedno vezani trije asparagini.

Kloni R7-8, R7-13 in R12-2 imajo na prvem mestu glicin, na drugem levcin in na četrtem asparaginsko kislino. Podobna je tudi aminokislina na tretjem mestu, kjer se nahaja valin ali izolevcin, ki imata oba alifatsko hidrofobno stransko verigo. R7-8 in R7-13 imata podobno strukturo tudi na petem in šestem mestu. Peta aminokislina je valin oziroma alanin, ki imata obe alifatsko hidrofobno stransko verigo, na šestem mestu pa je v obeh klonih levcin.

Kadar ob pregledu ponavljajočih motivov ugotovimo, da se določen motiv v različnih klonih pojavi večkrat, to najverjetneje pomeni, da je ta struktura pomembna za visoko afiniteto do receptorja. Ob zelo velikem številu možnih različnih peptidov je statistično malo verjetno, da bi se enak motiv naključno pojavil v več klonih.

## **4.4 VEZAVA IZOLIRANIH FAGNIH KLONOV NA PROTITELESA RN**

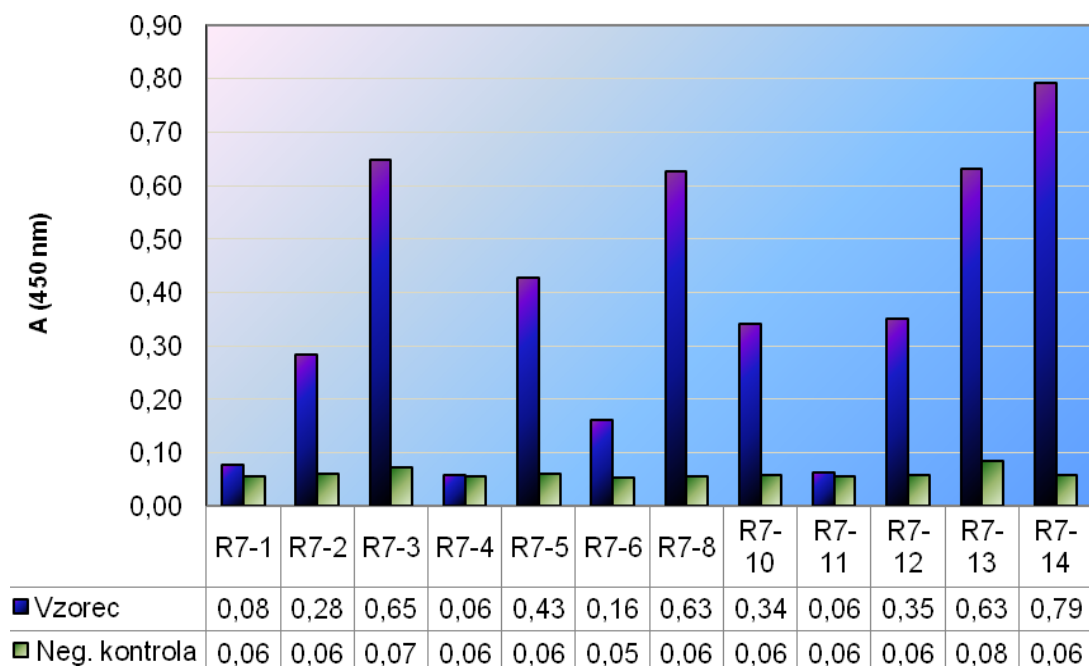
S testom ELISA smo preverili vezavo vseh izoliranih klonov na tarčna protitelesa. Iz vseh treh knjižnic smo preverili vezavo enainštiridesetih<sup>8</sup> klonov, od katerih smo pri petindvajsetih ugotovili pozitiven rezultat vezave. Pogoji, da ocenimo rezultat vezave kot pozitiven, je absorbanca pri ELISA testu vsaj 0,2 in hkrati razmerje med absorbanco vzorca in negativne kontrole vsaj 2. Največji delež pozitivnih vezalcev smo dobili pri knjižnici Ph.D.-7, kjer je bilo takšnih 71,4 % (10 od 14) klonov, medtem ko jih je bilo v knjižnici Ph.D.-C7C 58,3 % (7 od 12) in v knjižnici Ph.D.-12 53,3 % (8 od 15).

Med kloni iz knjižnice Ph.D.-7 smo največjo absorbanco izmerili pri klonu R7-14. Nekoliko nižji odziv smo izmerili pri klonih R7-3, R7-8 in R7-13. Kloni R7-1, R7-4, R7-6 in R7-11 niso dali dovolj velikega odziva, da bi vezavo lahko ocenili kot pozitiven. Daleč največjo absorbanco med kloni iz knjižnice Ph.D.-12 smo izmerili pri klonu R12-2. Sledila sta klona R12-13 in R12-14, dovolj visok odziv za pozitiven oceno vezave pa so dali še kloni R12-3, R12-6, R12-9, R12-11 in R12-15. Med kloni iz knjižnice Ph.D.-C7C je največjo afiniteto do protiteles RN kazal klon RC-9, ki nam je v testu ELISA dal precej večji odziv kot ostali kloni. Pozitiven rezultat vezave so dali še kloni RC-3, RC-4, RC-8, RC-11, RC-12 in RC-15.

---

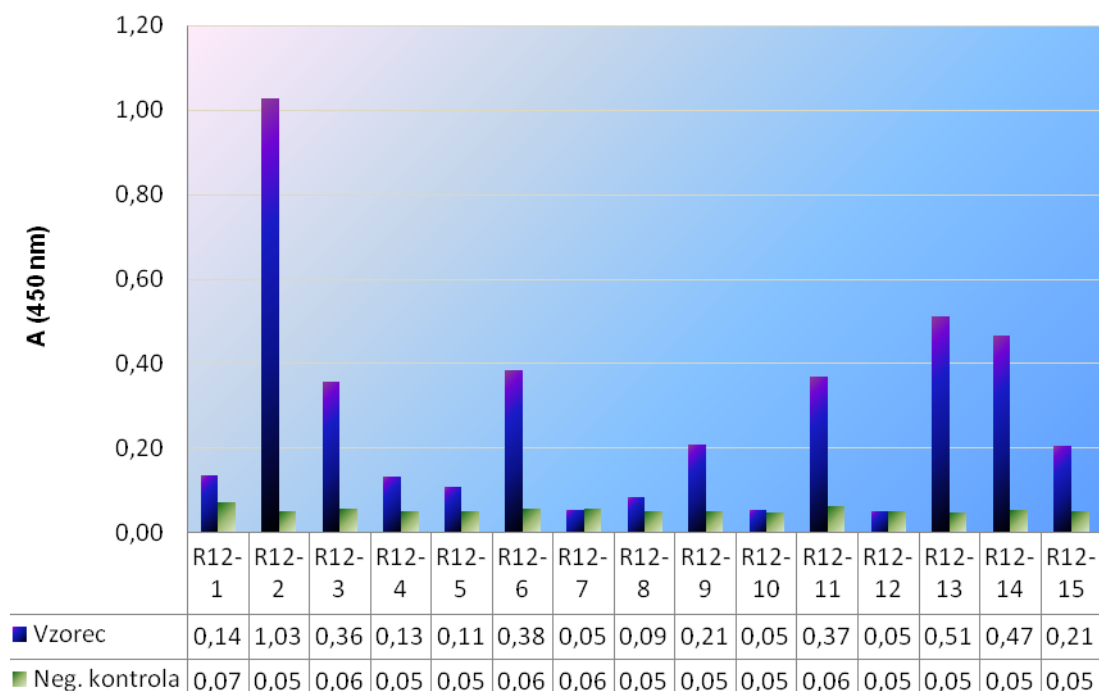
<sup>8</sup> Od klonov z enako strukturo smo testirali le po enega, vendar bomo pri pregledu rezultatov upoštevali vse.

Rezultati teh testov so le informativni in so lahko nekoliko zavajajoči, saj smo v vzorcih uporabili enake volumne suspenzije fagov, ne pa enakega števila. Pred nadaljnjimi testi smo zato določili koncentracijo vseh fagnih klonov s titracijo in relativno primerjali afiniteto fagov do grelina.

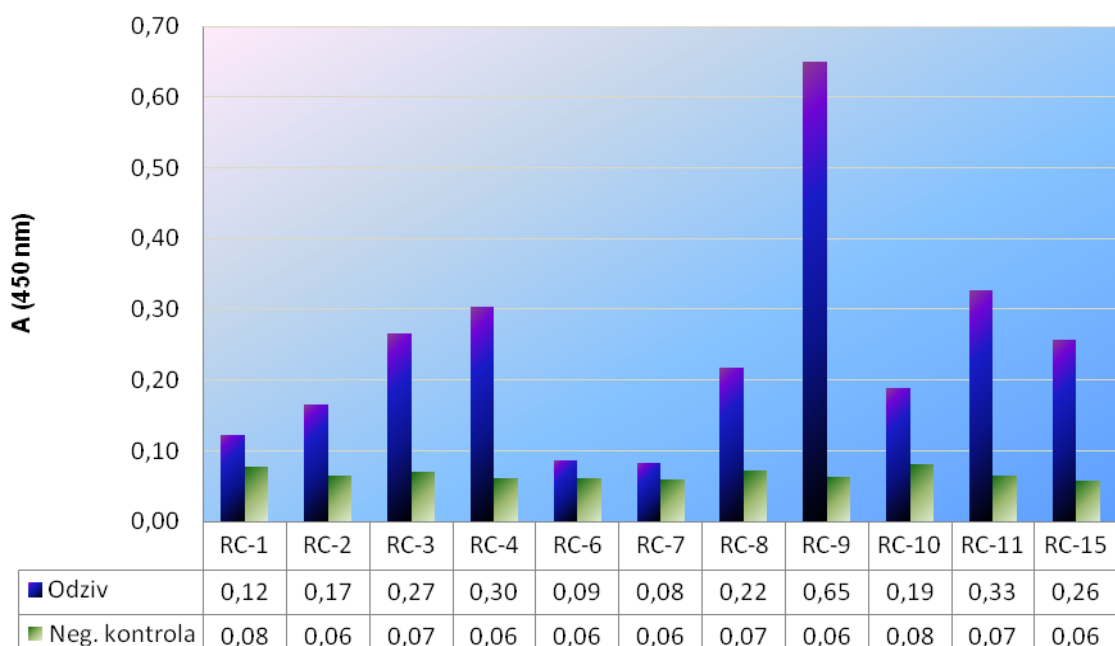


Slika 5: Rezultati določanja vezave klonov<sup>9</sup> izoliranih iz knjižnice Ph.D.-7 na protitelesa RN.

<sup>9</sup> R7-7 in R7-9 imata enako strukturo kot R7-2, pri R7-15 pa sekvenciranje ni uspelo, zato jih nismo vključili v test.



Slika 6: Rezultati določanja vezave klonov izoliranih iz knjižnice Ph.D.-12 na protitelesa RN.



Slika 7: Rezultati določanja vezave klonov<sup>10</sup> izoliranih iz knjižnice Ph.D.-C7C na protitelesa RN.

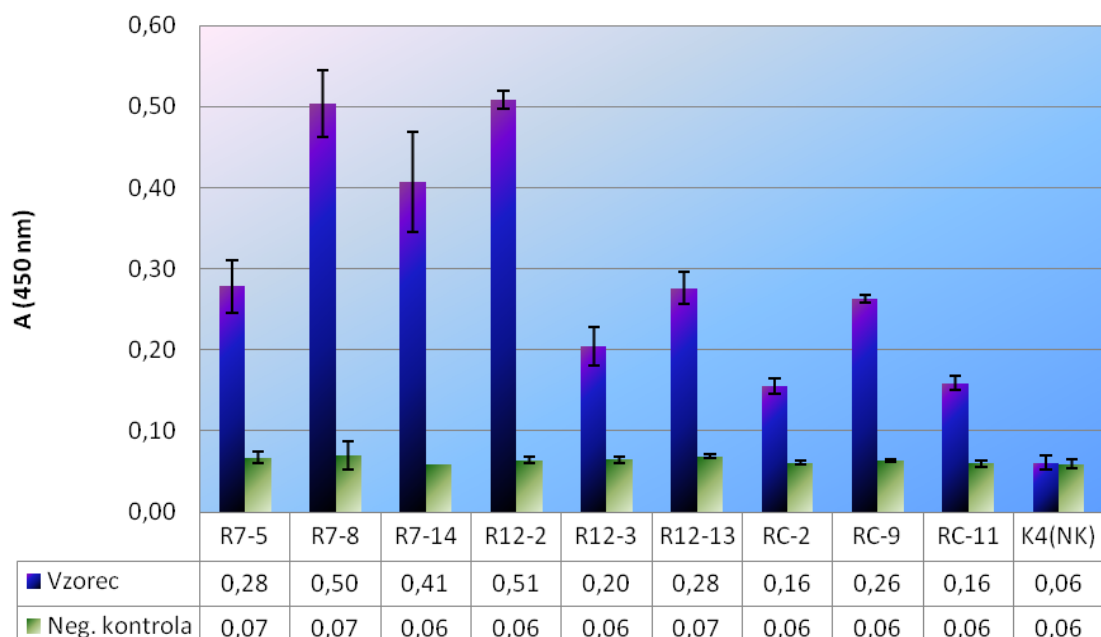
<sup>10</sup> RC-12 ima enako strukturo kot RC-8, pri RC-5, RC-13 in RC-14 pa sekvenciranje ni uspelo, zato jih nismo vključili v test.

## **4.5 RELATIVNA PRIMERJAVA VEZAVE KLONOV IZ RAZLIČNIH KNJIŽNIC NA PROTITELESA RN**

Afiniteto klonov iz različnih knjižnic smo primerjali s testom ELISA. Pri tem testu smo za vsak klon opravili 3 meritve, razen pri dveh klonih, kjer smo opravili 2 meritvi, s čimer smo zagotovili tudi ponovljivost rezultatov. Z uporabo enakega števila fagov pri vsakem klonu smo zagotovili primerljivost rezultatov, saj v nasprotnem primeru ne bi vedeli ali bi bila večja absorbanca posledica večje afinitete ali večje količine fagov posameznega klona. Med posameznimi kloni smo dobili precej ponovljive rezultate. Pri izboru klonov se nismo osredotočili le na klone z najvišjim odzivom iz prejšnjih testov, ampak smo izbrali takšne, da smo imeli zastopanih več različnih motivov.

Najvišje odzive v testu smo dobili pri klonih R7-8 in R12-2, ki imata v delu svoje strukture podoben motiv (GLVD oz. GLID) in sta dala v testu skoraj enak odziv, kljub dejstvu, da sta peptida različno dolga. Iz tega lahko sklepamo, da imajo glavno vlogo v interakciji s protitelesi aminokislinski ostanki v skupnem motivu, preostali pa ne vplivajo bistveno na vezavo. V testu smo imeli po enega predstavnika iz vsake knjižnice, ki ima v svoji strukturi motiv NIF. Med temi sta nam klona R7-5 in R12-13, ki imata linearno strukturo dala enak odziv, klon RC-2, ki ima ciklično strukturo pa je dal precej nižji odziv, vendar imata klona R7-5 in R12-13 identičen še nekoliko večji del strukture (NIFAS), tako da iz tega primera ne moremo z gotovostjo trditi ali je ta razlika posledica linearne oziroma ciklične strukture ali pa teh dveh dodatnih aminokislin v motivu pri obeh linearnih klonih. Najnižje odzive smo dobili pri cikličnih fagih. Klon K4, ki smo ga uporabili za preverjanje metode, je dal odziv enak njegovi negativni kontroli.

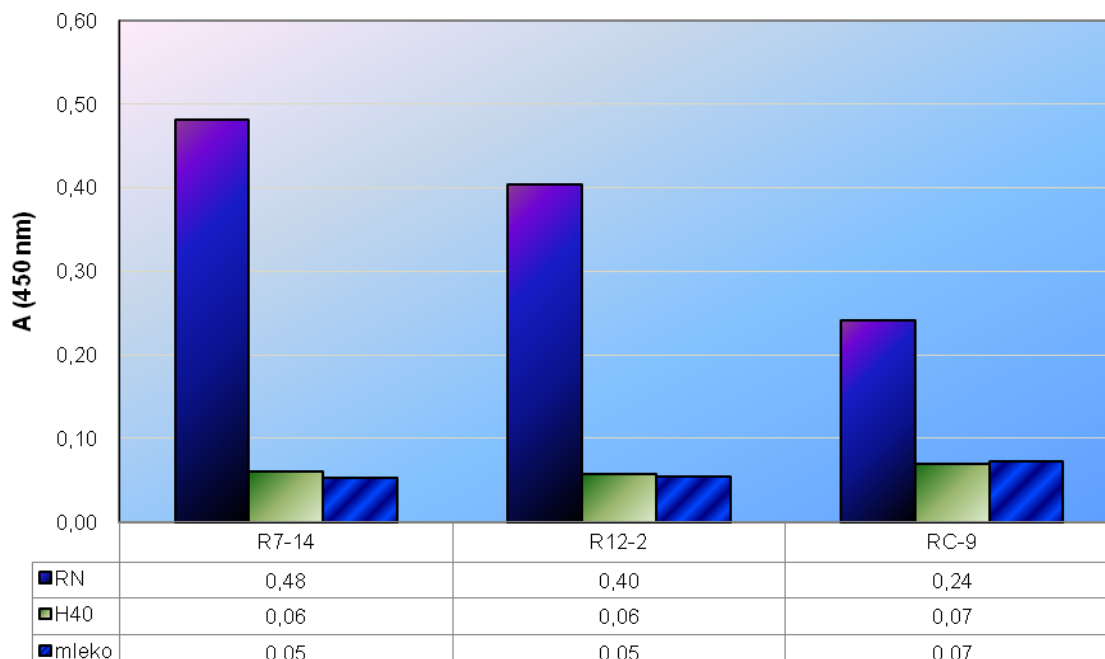




Slika 8: Rezultati relativne primerjave vezave klonov iz različnih knjižnic na protitelesa RN.

## 4.6 PREVERJANJE SPECIFIČNOSTI VEZAVE FAGOV NA PROTITELESA

S testom ELISA smo preverjali ali se izolirani fagi vežejo specifično na antigen vezavno mesto protiteles RN ali pa morda na njihovo konstantno regijo. Primerjali smo vezavo treh fagov na tarčna protitelesa RN, protitelesa H40 in mleko. Uporabili smo po en klon iz vsake knjižnice. Pozitivne rezultate vezave smo dobili le pri protitelesih RN, medtem ko se fagi ne vežejo na protitelesa H40 ali mleko.



Slika 9: Rezultati preverjanja specifičnosti vezave fagov na protitelesa.

## 4.7 KOMPETICIJA FAGOV IN GRELINA ZA VEZAVO NA PROTITELESA RN

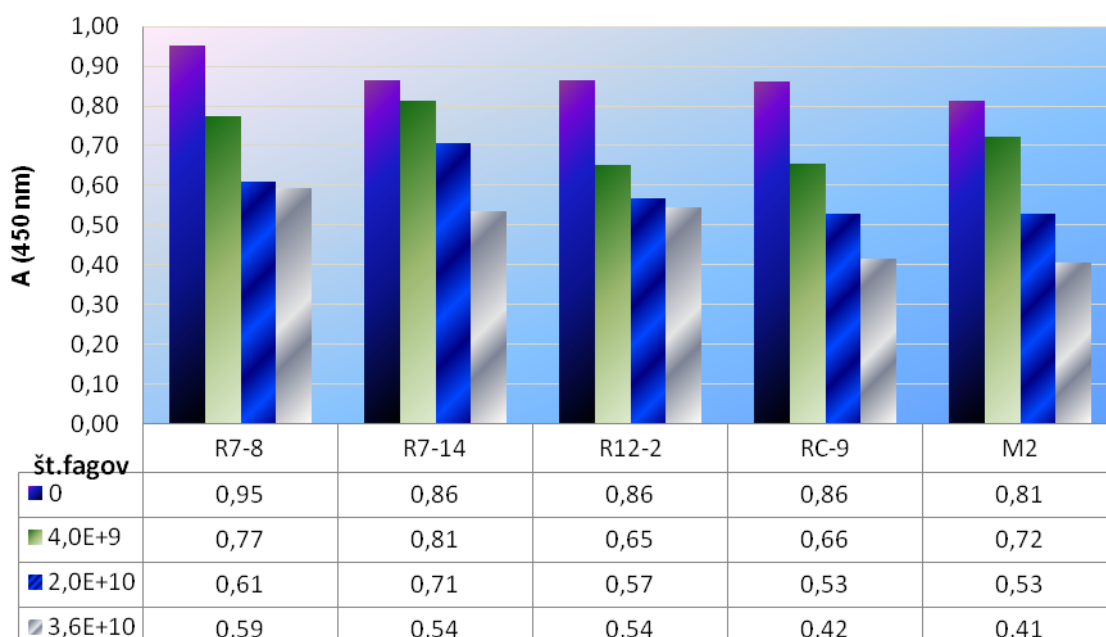
Za test ELISA, s katerim smo ocenili inhibicijo vezave protiteles RN na grelin z izbranimi kloni, smo uporabili mikrotitrne ploščice s streptavidinom in biotiniliran grelin. Kombinacija streptavidina in biotina se pogosto uporablja v biotehnologiji, saj izkazujeta drug do drugega visoko afiniteto in tako tvorita eno najmočnejših nekovalentnih vezi znanih v naravi, z disociacijsko konstanto reda velikosti  $10^{-14}$  mol/L (121).

V vsakem vzorcu je bilo  $3 \times 10^9$  protiteles RN. Število fagov je bilo torej večje od števila protiteles v vsakem vzorcu, kjer so bili fagi prisotni. Testirali smo štiri izolirane fagne klone in klon M2, ki smo ga uporabili za negativno kontrolo. Klon M2 ima aminokislinsko zaporedje CRMQMPSSC in se veže na protitelesa proti leptinu. Z njim smo preverili ali je morebiten padec signala posledica nespecifičnih interakcij.

Izveden test temelji na tekmovanju grelina in fagov za isto vezavno mesto na protitelesih. Fage smo inkubirali v raztopini s protitelesi in nastale komplekse protiteleso-fag dodali grelinu, ki je bil vezan na streptavidinskih ploščicah. Pričakovali smo, da se bodo protitelesa zaradi višje afinitete vezala na grelin. Fagi z višjo afiniteto bi to vezavo ovirali

bolj kot fagi z nižjo afiniteto. Za detekcijo vezanih protiteles smo uporabili sekundarna kozja protitelesa usmerjena proti zajčjim, ki so bila označena s HRP.

Pri vseh klonih, ki smo jih uporabili v testu, je odziv z naraščajočo količino fagov padal. To je bil rezultat, ki smo ga pri testu pričakovali, vendar je odziv padal tudi pri naraščajoči količini klona M2, ki smo ga uporabili za negativno kontrolo. Sklepamo lahko, da izolirani fagi kljub temu, da se vežejo na antigen vezavno mesto na protitelesih (slika 9 – prejšnji odstavek) ne tekmujejo za vezavo z grelinom, oz. da izvedeni test ni primeren za spremljanje te kompeticije.

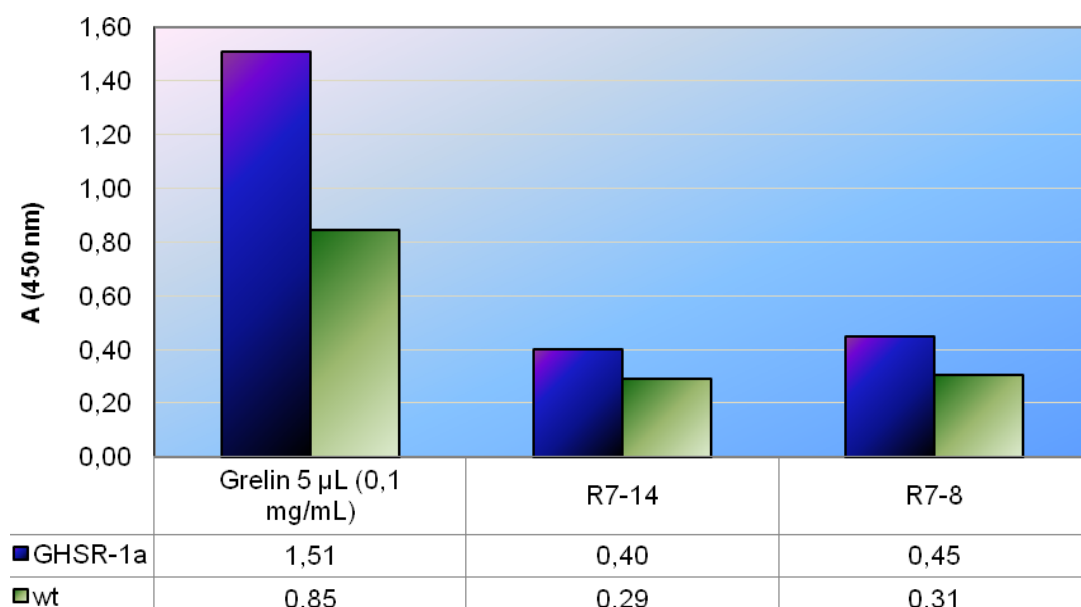


Slika 10: Rezultati testa kompeticije fagov in grelina za vezavo na protitelesa RN.

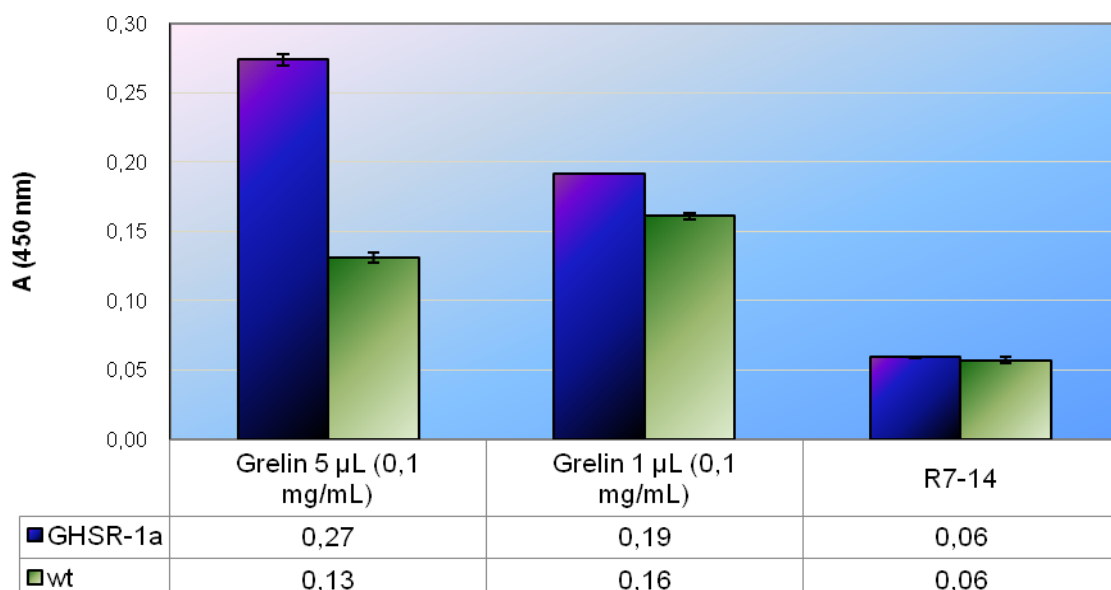
## 4.8 ELISA TEST NA CELICAH HEK 293 WT IN HEK 293 GHSR-1A

S testi na celicah, ki na svoji površini stabilno izražajo receptor GHSR-1a smo ugotavljali, ali se naši kloni vežejo na receptor. Divji tip celic nam je služil kot negativna kontrola, za pozitivno kontrolo pa smo uporabili biotiniliran grelin, ki smo ga detektirali s konjugatom streptavidin-HRP. Ugotovili smo, da se grelin močneje veže na celice GHSR-1a, iz česar lahko sklepamo, da je test ustrezen. Testirali smo dva klona iz linearne knjižnice, ki imata na svoji površini prikazana dva različna peptidna motiva. Klon R7-8 je kazal nekoliko

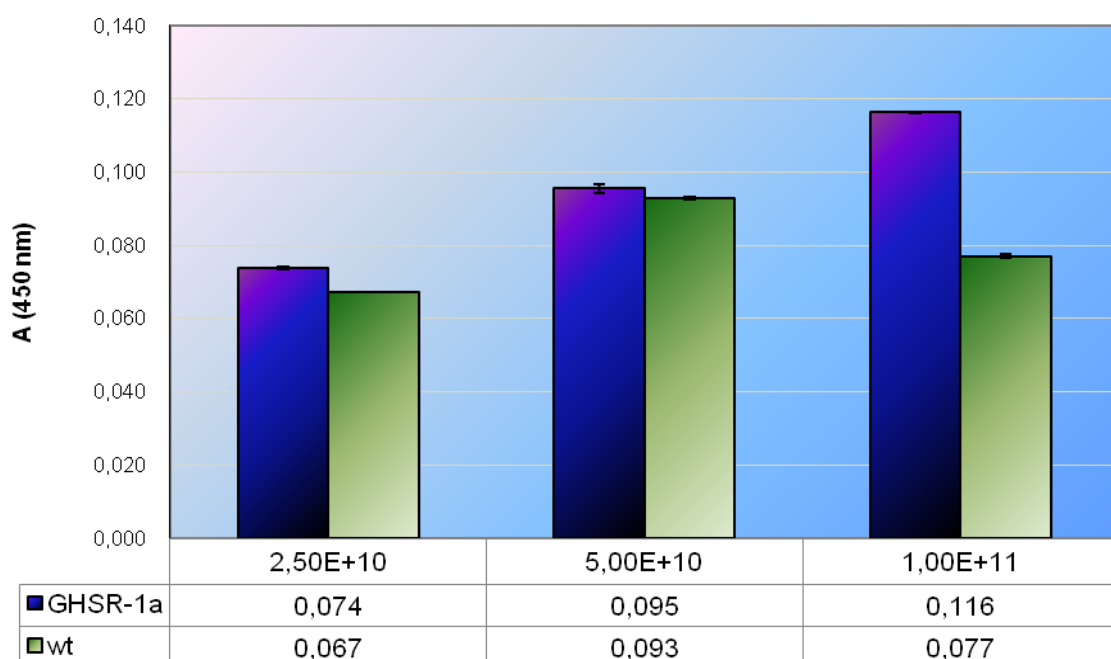
višjo afiniteto do receptorja, kot klon R7-14. Podobno razmerje med tema dvema klonoma smo dobili tudi pri preverjanju vezave na protitelesa RN. V naslednjem testu, kjer smo preizkušali vezavo klona R7-14 in za pozitivno kontrolo uporabili dve različni količini grelina (slika 12), se pri klonu R7-14 ni ponovil odziv iz prejšnjega testa, saj je bil ta skoraj enak pri celicah z receptorjem, kot pri tistih brez njega. Pri grelinu pa se je ponovil podoben odziv kot pri prejšnjem testu, kjer smo dobili višji odziv pri celicah z izraženim receptorjem, kot pa pri tistih brez njega. Pri testu, kjer smo dodajali različne titre klona R7-8 (slika 13) smo sicer pri najvišji koncentraciji klona dobili signifikantno višji odziv na celicah z receptorjem, pri nižjih koncentracijah pa je bila razlika minimalna. Zaradi neponovljivih rezultatov ne moremo potrditi vezave nobenega od obeh klonov na receptor. Pri nadaljnem delu bo potrebno test ELISA na celicah optimirati.



Slika 11: Vezava klonov R7-14 in R7-8 na HEK 293 wt in GHSR-1a.



Slika 12: Vezava klona R7-14 in različnih koncentracij grelina na HEK 293 wt in GHSR-1a.



Slika 13: Vezava različnih titrov klona R7-8 na HEK 293 wt in GHSR-1a.

## 5. RAZPRAVA

Peptidne predstavitevne knjižnice lahko uporabimo za določanje epitopa protiteles (*angl.* epitope mapping) in za razvoj mimotopov, t.j. peptidov (*angl.* mimotopes), ki posnemajo strukturo epitopa. V obeh primerih za tarčo selekcije uporabljamo protitelesa. Za selekcijo se najpogosteje uporabljajo monoklonska protitelesa, mimotope pa lahko uspešno izselekcijiramo tudi z uporabo poliklonskih protiteles, kot na primer Zhang s skupino, ko so iskali potencialno cepivo proti virusu hepatitisa C (122) ali celo prečiščenih serumov. Poleg določanja vezavnega mesta protiteles, lahko peptidne mimetike uporabimo tudi kot ligande za vezavo na receptorje za ustrezen antigen ali kot antigene za vakcinacijo.

V okviru diplomske naloge smo iz bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic izselekcijirali peptidne mimetike N-končnega dela grelina kot potencialne ligande receptorja GHSR-1a. Uporabili smo poliklonska protitelsa RN, ki prepoznajo N-končni del grelina, za katerega je znano, da je ključen za vezavo na receptor (32). Za selekcijo peptidnih mimetikov smo uporabili knjižnice fagov, ki imajo na svoji površini prikazane peptide različnih dolžin, da bi s tem povečali možnost selekcije visokoafinitetnih klonov. Protitelesa smo vezali na paramagnetne kroglice prekrute s proteinom A oz. proteinom G, ki močno vežeta Fc regijo protiteles. S tem smo omogočili, da so se protitelesa orientirala tako, da so bila antigen vezavna mesta obrnjena stran od trdne površine in s tem izpostavljena za vezavo. V prvi stopnji selekcije smo uporabili blage pogoje spiranja, da bi s tem obdržali čim večji možni nabor potencialnih vezalcev, v drugi stopnji pa smo pogoje spiranja zaostriili.

Pri knjižnicah Ph.D.-7 in Ph.D.-12 smo v tretji stopnji selekcije uporabili pol manj tarčne molekule in večjo količino fagov, da bi zaostriili tekmovanje za vezavno mesto in s tem izolirali fage z največjo afiniteto. Iz istega razloga smo v tretji stopnji pri vseh knjižnicah uporabili spiranje z 0,5 % PBST namesto 0,1 %. Delež elucije se je pri vseh treh knjižnicah v vsaki stopnji povečeval (slika 3), prav tako pa se je povečevala tudi afiniteta pomnoženih eluatov po posameznih stopnjah (slika 4). Iz teh podatkov lahko sklepamo, da so bile selekcije uspešne, saj je iz vsake selekcije izstopilo več fagov, ki so se vezali na tarčna protitelesa. To pomeni, da smo z uporabljenim selekcijskim pristopom nabor fagov uspešno obogatili s kloni, ki se specifično vežejo na protitelesa RN. Delež elucije se je v tretji selekcijski stopnji najbolj zvišal pri knjižnici Ph.D.-C7C, pri ostalih dveh knjižnicah pa je bil porast manjši. To je lahko posledica dejstva, da smo pri knjižnicah Ph.D.-7 in Ph.D.-12 uporabili pol manj tarčnih protiteles.

Pri preverjanju vezave posameznih klonov na protitelesa RN smo ugotovili, da imamo tudi po treh selekcijskih stopnjah prisotnih še precej klonov, ki niso pozitivni vezalci (slike 5-7), kar kaže na dejstvo, da selekcija še ni potekla do konca. Zaradi tega bi morda veljalo razmisliti še o dodatnih selekcijskih stopnjah, vendar pa v primeru kasnejših selekcijskih stopenj obstaja velika verjetnost, da bi prišlo do prevlade klonov, ki imajo prednost pri infekciji bakterij in pomnoževanju, ne pa tistih, ki imajo večjo afiniteto do tarče (123). Kljub temu bi z dodatno selekcijsko stopnjo verjetno izolirali več klonov, ki imajo na površini prikazane peptide z najvišjo afiniteto do grelina, a bi s tem istočasno zmanjšali nabor potencialnih vezalcev na receptor GHSR-1a.

Največji delež pozitivnih vezalcev med sekvenciranimi kloni smo dobili iz knjižnice Ph.D.-7, kar pa ni nujno lastnost same knjižnice, saj smo pri selekcijah uporabili nekoliko različne pogoje. Pri ciklični knjižnici pa smo imeli tudi težave z okužbo s fagi divjega tipa, kar je vplivalo na delež pozitivnih vezalcev, saj smo izolirali tudi nekaj klonov z nenavadno strukturo (preglednica VIII). Fagi divjega tipa se pomnožujejo hitreje kot fagi iz knjižnice in s tem po nekaj selekcijskih stopnjah prevladajo v naboru fagov.

Fagom, ki so izkazovali pozitivno vezavo na protitelesa RN smo s sekvenciranjem genoma določili prikazane peptide. Preverili smo ali so v aminokislinskih zaporedjih motivi, ki se ponavljajo v več različnih klonih, kar lahko kaže, da je ta motiv pomemben za vezavo na protitelesa. V naših selekcijah smo izolirali sedem različnih motivov, glede na aminokislinsko zaporedje, med katerimi se najpogosteje pojavi motiv N(I/L)F. Ker smo za selekcijo uporabili poliklonska protitelesa je najbolj verjetno, da se različni peptidi vežejo na različne podklone poliklonskih protiteles. Glede na rezultate testov ELISA lahko sklepamo, da so motivi, ki so se pojavili v več različnih klonih ključni za vezavo na receptor. Kloni, ki so imeli enak kratek del strukture (npr. motiv N(I/L)F), razlikovali pa so se tako v dolžini, kot tudi v preostalem delu strukture, so namreč izkazovali zelo podobno afiniteto (slika 8). Glede na rezultate lahko sklepamo, da imajo linearni fagi večjo afiniteto do protiteles RN, kar ni ravno pričakovan rezultat. Teoretično je namreč med cikličnimi fagi sicer manj takšnih, ki so pozitivni vezalci, vendar pa je pri tistih, ki so, zelo velika verjetnost, da bodo imeli visoko afiniteto. Razlog za to je, da so konformacijsko bolj omejeni in je zato manj verjetno, da se bodo prilegali vezavnemu mestu. Vendar če se, je velika verjetnost, da bodo imeli visoko afiniteto (124). Dobili smo precej ponovljive rezultate med meritvami enakih klonov, kar je pokazatelj natančnosti metode. Rezultati

relativne primerjave afinitet klonov iz različnih knjižnic so tudi primerljivi z rezultati, ki smo jih dobili pri testih, kjer smo primerjali le klone iz posamezne knjižnice.

Peptidi, ki smo jih izselekcionalirali iz naših knjižnic so unikatni in jih druge skupine še niso izolirale (preverili smo baze MimoDB 2.0., Pepbank, Google). Prav tako nobeden od naših peptidov nima strukture podobne poznanim vezalcem na protein A (125), ima pa klon R7-12 v svoji strukturi motiv, za katerega je znano, da se veže na Fc regijo protiteles (SS(I/L)), vendar pa ima tudi strukturo podobno začetku grelina. Ostali kloni po aminokislinskem zaporedju niso podobni strukturi grelina, kar je najverjetneje posledica tega, da epitop ni linearen ampak konformacijski. Protitelesa namreč prepoznajo N-končni del grelina, kjer je na serin pripeta maščobna kislina. Kristalna struktura grelina še ni poznana, a iz naših rezultatov lahko sklepamo, da ne gre za neurejno strukturo, sicer bi protitelesa verjetno prepoznala linearen epitop. V primeru selekcij s fagi na protitelesih je možno, da se fagi vežejo na konstantno regijo protiteles in ne na antigen vezavno mesto (na primer peptidi z motivom SS(I/L) (126), F(A/G)RLVSSIRY (126), TWKTSRISIF (126), GELVW (127), DCAWHLGELVWCT (127)). Tudi v tem primeru bi dobili pri ELISI, ki smo jo izvedli pozitiven signal, zato smo specifičnost vezave še dodatno preverili.

S testom ELISA na različnih tarčah smo potrdili, da se naši kloni vežejo specifično na protitelesa RN, ne pa tudi na protitelesa H40 ali mleko. Protitelesa H40 prepoznajo drugačen epitop na grelinu, imajo pa enako konstantno regijo, saj so bila izolirana iz iste živali. S tem smo potrdili, da se fagi vežejo na antigen vezavno mesto, ne pa na konstantno regijo (Fc), kar pomeni da gre res za mimetike tega epitopa in ne lažno pozitivne rezultate. Vezavo fagov in grelin na isto mesto na protitelesih smo poskusili potrditi še s kompetitivnim testom ELISA. Pri testih s preiskovanimi kloni smo sicer res dobili vedno nižje odzive, s povečevanje števila fagov, vendar pa smo podoben rezultat dobili tudi pri klonu, ki smo ga uporabili za negativno kontrolo (slika 10). Kontrolni klon M2 je bil izoliran v našem laboratoriju in se specifično veže na druga protitelesa (neobjavljeni rezultati). Za potrditev rezultatov se pri negativni kontroli odzivi ne bi smeli zniževati, zato s tem testom nismo uspeli potrditi inhibicije vezave grelina na tarčo. To smo poskušali preveriti, oz. dokazati tudi z nekaterimi drugimi testi, vendar nam inhibicije ni uspelo dokazati z nobenim izmed njih. Neuspešno smo poskušali s testom ELISA inhibirati tudi vezavo fagov na protitelesa z grelinom (rezultati niso prikazani). Najverjetnejša razlaga neuspešne inhibicije v naših testih je, da se posamezni fagni kloni vežejo samo na en



podklon protiteles, grelin pa na vse podklone. Zato v naših rezultatih inhibicija ni izražena. V tem primeru bi bilo smiselno preveriti še inhibicijo z mešanico različnih fagov.

Ovrednotili smo tudi vezavo fagnih klonov, ki oponašajo N-končni del grelina na receptor GHSR-1a. Preverjanje vezave direktno na izoliranem receptorju GHSR ni možno, saj gre za transmembranski receptor brez izrazite izvencelične vezavne domene, ki ima pravilno strukturo le kadar je vsidran v celično membrano. Za poskuse smo zato uporabili celice z izraženim receptorjem GHSR-1a.

Posamezni preliminarni rezultati so dali slutiti, da bi se nekateri fagi lahko vezali na receptor, vendar pa za enkrat še nismo dobili dovolj dobrih in ponovljivih rezultatov, da bi lahko vezavo nedvoumno potrdili. Potrebna je še dodatna optimizacija metode. Pri delu s celicami smo namreč naleteli na nekatere omejitve. Celice HEK 293 se zelo slabo držijo plastične podlage, zato se lahko pri večjem številu spiranj odlepijo od podlage s čimer se izpostavi plastična površina, ki lahko nespecifično veže fage. Celice se izven celičnega inkubatorja na sobni temperaturi tudi odlepijo od podlage zato je onemogočeno daljše delo. V izogib temu smo celice pritrdili na podlago z uporabo formalina, kar pa je verjetno okvarilo tudi receptorje na površini. Rezultate bi bilo smiselno preveriti še s kakšno drugo metodo. Možno bi bilo tudi določanje vezave z imunskim testom z radioaktivnimi označevalci na izoliranih celičnih membranah, ki vsebujejo receptor. Z merjenjem koncentracije znotrajceličnega kalcija pa bi lahko poleg same vezave ovrednotili tudi morebitno agonistično ali antagonistično delovanje izoliranih peptidov. To so novi potencialni peptidni ligandi receptorja GHSR-1a, ki jih ostale skupine še niso izolirale, vendar bodo potrebne še nadaljnje raziskave, da bomo lahko potrdili njihovo delovanje.

## 6. ZAKLJUČEK

Z metodo predstavitve na bakteriofagu smo izolirali peptide, iz treh bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic, ki smo jih nato ovrednotili z različnimi testi ELISA na protitelesih in na celicah z izraženim receptorjem GHSR-1a. Med aminokislinskimi zaporedji izoliranih klonov se je izoblikovalo sedem različnih motivov, med katerimi je bil najpogostejši N(I/L)F. Ugotovili smo, da so ti motivi pomembni za vezavo peptida na tarčo, saj so kloni z enakimi motivi kazali podobno afiniteto do tarče, kljub temu, da so bili različno dolgi in so imeli različen ostali del aminokislinskega zaporedja. Takšno korelacijo med podobnimi motivi in afiniteto do tarče smo pričakovali, nekoliko pa nas je presenetilo število različnih motivov. To je verjetno posledica večih podklonov poliklonskih protiteles, na katere se vežejo peptidi. S testi smo dokazali tudi, da se izolirani peptidi selektivno vežejo le na protitelesa RN. S tem smo potrdili, da se fagi vežejo na antigen vezavno mesto, ne pa na konstantno regijo (Fc), kar pomeni da gre res za mimetike tega epitopa.

S testi ELISA na protitelesih RN smo dobili ponovljive rezultate, s katerimi smo lahko primerjali afiniteto različnih klonov do protiteles, kar nam kaže na ustreznost uporabljene metode. S temi testi pa nam ni uspelo dokazati inhibicije grelina s peptidi. Posledica tega je verjetno že prej omenjena vezava klonov na različne podklone poliklonskih protiteles, medtem ko se grelin veže le na en podklon. Med izoliranimi peptidi so imeli večjo afiniteto do protiteles tisti z linearno strukturo od tistih s ciklično. S testi na celicah HEK 293 nam za enkrat še ni uspelo dobiti dovolj zanesljivih rezultatov, da bi z njimi lahko potrdili vezavo klonov na receptor GHSR-1a. Test ELISA na celicah bo zato potrebno optimirati, da bomo lahko dobili zanesljivejša rezultate.

Inhibitorji grelina so ena izmed potencialnih učinkovin za zdravljenje debelosti. Z našimi raziskavami smo dobili nekaj zanimivih peptidov, ki so nam dali v testih vzpodbudne rezultate za nadaljnje raziskave. Vendar pa bodo potrebne še dodatne raziskave, potrebno pa bo tudi optimirati določene metode. Seveda pa je tudi pot od odkritja potencialne učinkovine do zdravila zelo dolga.

## 7. LITERATURA

- 1) Pisk N (ur.): Samozdravljenje – priročnik za bolnike. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana. 2011. 296-302.
- 2) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (dostop 19.04.2012)
- 3) Cvirn-Novak M: Obravnavanje prekomerne telesne mase v lekarni. Specialistična naloga. Lekarniška zbornica Slovenije, Ljubljana, 2007.
- 4) Weibel E K, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E, Lengsfeld H: Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*: producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* 1987; 40: 1081–1085.
- 5) McNeely W: Orlistat. *Drugs* 1998; 56: 241–249.
- 6) Di Marzo D, Matias I: Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 2005; 8: 585–589.
- 7) McNeely W, Goa K L: Sibutramine: a review of its contribution to the management of obesity. *Drugs* 1998; 56: 1093–1124.
- 8) Lean M E: How does sibutramine work? *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25 (suppl 4): S8– 11.
- 9) [http://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZH/Arhiv\\_starejsih\\_objav/Sibutramin\\_Objava2010-01-25.pdf](http://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/dokumenti/SRZH/Arhiv_starejsih_objav/Sibutramin_Objava2010-01-25.pdf) (dostop 8.5.2012)
- 10) <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2000:095:0005:0008: EN:PDF> (dostop 8.5.2012)
- 11) [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Press\\_release/2009/12/WC500017629.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2009/12/WC500017629.pdf) (dostop 20.5.2012)
- 12) Otvos L Jr, Terrasi M, Cascio S, Cassone M, Abbadessa G, De Pascali F, Scolaro L, Knappe D, Stawikowski M, Cudic P, Wade J D, Hoffmann R, Surmacz E: Development of a pharmacologically improved peptide agonist of the leptin receptor. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 1745–1754.
- 13) Ozcan L, Ergin A S, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers M G, Ozcan U: Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009; 9: 35–51.

- 14) Banks W A: Leptin transport across the blood-brain barrier: implications for the cause and treatment of obesity. *Curr Pharm Des* 2001; 7: 125–133.
- 15) Benoit S C, Schwartz M W, Lachey J L, Hagan M M, Rushing P A, Blake K A, Yagaloff K A, Kurylko G, Franco L, Danhoo W, Seeley R J: A novel selective melanocortin-4 receptor agonist reduces food intake in rats and mice without producing aversive consequences. *J Neurosci* 2000; 20: 3442–3448.
- 16) Mancini M C, Halpern A: Investigational therapies in the treatment of obesity. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15: 897–915.
- 17) Kamiji M M, Inui A: Neuropeptide Y receptor selective ligands in the treatment of obesity. *Endocr Rev* 2007; 28: 664–684.
- 18) Febbraio M A: Gp130 receptor ligands as potential therapeutic targets for obesity. *J Clin Invest* 2007; 117: 841–849.
- 19) Matthews V B, Febbraio M A: CNTF - A target therapeutic for obesity-related metabolic disease. *J. Mol. Med.* 2008; 86: 353–361.
- 20) Halford J C, Harrold J A, Boyland E J, Lawton C L, Blundell J E: Serotonergic drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs* 2007; 67: 27–55.
- 21) Holenz J, Pauwels P J, Díaz J L, Merce R, Codony X, Buschmann H: Medicinal chemistry strategies to 5-HT(6) receptor ligands as potential cognitive enhancers and anti-obesity agents. *Drug Discov Today* 2006; 11: 283–299.
- 22) Meier J J, Gallwitz B, Schmidt W E, Nauck M A: Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol* 2002; 440: 269–279.
- 23) Vincent R P, le Roux C W: The satiety hormone peptide YY as a regulator of appetite. *J. Clin Pathol* 2008; 61: 548–552.
- 24) Wynne K, Park A J, Small C J, Meeran K, Ghatei M A, Frost G S, Bloom S R: Oxyntomodulin increases energy expenditure in addition to decreasing energy intake in overweight and obese humans: A randomised controlled trial. *Int J Obes (London)* 2006; 30: 1729–1736.
- 25) Esler W P, Rudolph J, Claus T H, Tang W, Barucci N, Brown S E, Bullock W, Daly M, Decarr L, Li Y, Milardo L, Molstad D, Zhu J, Gardell S J, Livingston J N, Sweet L J: Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology* 2007; 148: 5175–5185.

- 26) Clapham J C, Arch J R: Thermogenic and metabolic anti-obesity drugs: Rationale and opportunities. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9: 259–275.
- 27) Arch J R: Beta(3)-Aarenoceptor agonists: potential, pitfalls and progress. *Eu. J Pharmacol* 2002; 440: 99–107.
- 28) Ng F M, Sun J, Sharma L, Libinaka R, Jiang W J, Gianello R: Metabolic studies of a synthetic lipolytic domain (AOD9604) of human growth hormone. *Horm Res* 2000; 53: 274–278.
- 29) Kojima M, Hosoda H, Date Y et al.: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 ; 402 (6762): 656-660.
- 30) Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K: Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86 (10): 4753-4758.
- 31) Hosoda H, Kojima M, Kangawa K: Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci* 2006; 100 (5): 398-410.
- 32) De Vriese C, Delporte C: Ghrelin: a new peptide regulating growth hormone release and food intake. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1420-1424.
- 33) Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra V: Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regulatory Peptides* 2003; 116: 101–107.
- 34) Erdmann J, Topsch R, Lippl F, Gussmann P, Schusdziarra V: Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin, and glucose. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89: 3048–3054.
- 35) Groschl M, Knerr I, Topf H G, Schmid P, Rascher W, Rauh M: Endocrine responses to the oral ingestion of a physiological dose of essential amino acids in humans. *Journal of Endocrinology* 2003; 179: 237–244.
- 36) Knerr I, Groschl M, Rascher W, Rauh M: Endocrine effects of food intake: insulin, ghrelin, and leptin responses to a single bolus of essential amino acids in humans. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2003; 47: 312–318.
- 37) Nakazato M, Murakami N, Date Y et al.: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409 (6817): 194-198.

- 38) Lengyel A M: From growth hormone-releasing peptides to ghrelin: discovery of new modulators of GH secretion. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50 (1): 17-24.
- 39) Asakawa A, Inui A, Kaga T et al.: Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120: 337-345.
- 40) Tesouro M, Schinzari F, Iantorno M et al.: Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Circulation* 2005; 112: 2986-2992.
- 41) Li W G, Gavrilu D, Liu X et al.: Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 2004; 109: 2221-2226.
- 42) Zhang M, Yuan F, Chen H, Qiu X, Fang W: Effect of exogenous ghrelin on cell differentiation antigen 40 expression in endothelial cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007; 39: 974-981.
- 43) Chang L, Ren Y, Liu X et al.: Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 165-170.
- 44) Kleinz M J, Maguire J J, Skepper J N, Davenport A P: Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 227-235.
- 45) Kawczynska-Drozdz A, Olszanecki R, Jawien J et al.: Ghrelin inhibits vascular superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2006; 19: 764-767.
- 46) Matsumura K, Tsuchihashi T, Fujii K, Iida M: Neural regulation of blood pressure by leptin and the related peptides. *Regul Pept* 2003; 114: 79-86.
- 47) Wang L, Ma W, Markovich R, Chen J W, Wang P H: Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998; 83: 516-522.
- 48) Nagaya N, Uematsu M, Kojima M et al.: Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001; 104: 1430-1435.
- 49) Li G Z, Jiang W, Zhao J et al. Ghrelin blunted vascular calcification in vivo and in vitro in rats. *Regul Pept* 2005; 129: 167-176.
- 50) Zhang G, Yin X, Qi Y, Pendyala L, Chen J, Hou D, Tang C: Ghrelin and Cardiovascular Diseases. *Current Cardiology Reviews* 2010; 6 (1): 62-70.

- 51) Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M et al.: Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension* 2004; 43: 977-982.
- 52) Soares J B, Rocha-Sousa A, Castro-Chaves P, Henriques-Coelho T, Leite-Moreira A F: Inotropic and lusitropic effects of ghrelin and their modulation by the endocardial endothelium, NO, prostaglandins, GHS-R1a and KCa channels. *Peptides* 2006; 27: 1616-1623.
- 53) Akamizu T, Kangawa K: Emerging results of anticatabolic therapy with ghrelin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007; 10: 278-283.
- 54) Peeters T L: Ghrelin: a new player in the control of gastrointestinal functions. *Gut* 2005; 54 (11): 1638-1649.
- 55) Masuda Y, Tanaka T, Inomata N et al.: Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276 (3): 905-908.
- 56) Dixit V D, Schaffer E M, Pyle R S et al.: Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *Journal of Clinical Investigation* 2004; 114 (1): 57–66.
- 57) Lebrethon M C, Aganina A, Fournier M, Gerard A, Parent A S, Bourguignon J P: Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. *J Neuroendocrinol* 2007; 19: 181–188.
- 58) Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S et al.: The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nature Neuroscience* 2008; 11 (7): 752-753.
- 59) Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S et al.: Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *Journal of Cell Biology* 2002; 159 (6): 1029–1037.
- 60) Pettersson J, Muccioli G, Granata R et al.: Natural (ghrelin) and synthetic (hexarelin) GH secretagogues stimulate H9c2 cardiomyocyte cell proliferation. *Journal of Endocrinology* 2002; 175 (1): 201–209.
- 61) Korbonits M, Goldstone A P, Gueorguiev M et al.: Ghrelin - a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25 (1): 27-68.
- 62) Hillman J B, Tong J, Tschop M: Ghrelin Biology and Its Role in Weight-related Disorders. *Discov Med* 2011; 11 (61): 521-528.

- 63) Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K: Structural divergence of human ghrelin. *J Biol Chem* 2003; 1: 64-70.
- 64) Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K: Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 21995–22000.
- 65) Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K: Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 279 (3): 909–913.
- 66) Lunder M: Grelin – peptid, ki poveča apetit. *Farm vestn* 2009; 60: 303-306.
- 67) Aydin S: Ghrelin may be a universal peptide in all living organisms. *Turk J med Sci* 2007; 37 (2): 123-124.
- 68) Date Y, Kojima M, Hosoda H 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): 4255–4261.
- 69) Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M et al.: Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 2002; 23 (3): 531–536.
- 70) Gnanapavan S, Kola B, Bustin S A et al.: The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87 (6): 2988–2991.
- 71) Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S et al.: Ghrelin is present in pancreatic  $\alpha$ -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51 (1): 124–129.
- 72) Caminos J E, Gualillo O, Lago F et al.: The endogenous growth hormone secretagogue (Ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology* 2005; 146 (3): 1285–1292.
- 73) Mori K, Yoshimoto A, Takaya K et al.: Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Letters* 2000; 486 (3): 213–216.
- 74) Gualillo O, Caminos J E, Blanco M et al.: Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001; 142 (2): 788–794.
- 75) Tena-Sempere M, Barreiro M L, González L C et al.: Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 2002; 143 (2): 717–725.



- 76) Caminos J E, Tena-Sempere M, Gaytán F et al.: Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 2003; 144 (4): 1594–1602.
- 77) Gaytan F, Barreiro M L, Chopin L K et al.: Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88 (2): 879–887.
- 78) Andreis P G, Malendowicz L K, Trejter M et al.: Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: evidence that ghrelin stimulates the growth, but not the secretory activity of adrenal cells. *FEBS Letters* 2003; 536 (1–3): 173–179.
- 79) Korbonits M, Grossman A B: Ghrelin: update on a novel hormonal system. *European Journal of Endocrinology* 2004; 151 (supplement 1): S67–S70.
- 80) Caminos J E, Nogueiras R, Blanco M et al.: Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 2003; 144 (11): 5089–5097.
- 81) Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman A: Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 2001; 14 (1): 101–104.
- 82) Cowley M A, Smith R G, Diano S et al.: The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003; 37 (4): 649–661.
- 83) Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I: Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 2000; 141 (12): 4797–4800.
- 84) Gutierrez J A, Solenberg P J, Perkins D R et al.: Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105 (17): 6320–6325.
- 85) Yang J, Brown M S, Liang G, Grishin N V, Goldstein J L: Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 2008; 132 (3): 387–396.
- 86) Gualillo O, Lago F, Dieguez C: Introducing GOAT: a target for obesity and anti-diabetic drugs? *Trends in Pharmacological Sciences* 2008; 29 (8): 398–401.
- 87) Lim C T, Kola B, Korbonits M: The ghrelin/GOAT/ GHS-R system and energy metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2011; 12 (3): 173–186.

- 88) Yang J, Zhao T-J, Goldstein J L, Brown M S: Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. PNAS 2008; 105 (31): 10750-10755.
- 89) Kojima M, Kangawa K: Ghrelin: more than endogenous growth hormone secretagogue. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2010; 1200: 140–148.
- 90) Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H et al.: Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. Endocrinology 2005; 146 (5): 2255–2264.
- 91) Lim C T, Kola B, Grossman A, Korbonits M: The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. Endocrine Journal 2011; 58 (8): 707–710.
- 92) Shlimun A, Unniappan S: Ghrelin O-Acyl Transferase: Bridging Ghrelin and Energy Homeostasis. International Journal of Peptides 2011; 2011 (ID članka 217957): 5 strani.
- 93) Howard A D, Feighner S D, Cully D F et al.: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. Science 1996; 273 (5277): 974-977.
- 94) Petersenn S, Rasch A C, Penschorn M, Beil F U, Schulte H M: Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. Endocrinology 2001; 142: 2649-2659.
- 95) Van der Lely A J, Tschop M, Heiman M L, Ghigo E: Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. Endocr Rev 2004; 25: 426-457.
- 96) Tannenbaum G S, Lapointe M, Beaudet A, Howard A D: Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. Endocrinology 1998; 139: 4420-4423.
- 97) Willesen M G, Kristensen P, Romer J: Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. Neuroendocrinology 1999; 70: 306-316.
- 98) McKee K K, Palyha O C, Feighner S D, Hreniuk D L, Tan C P, Phillips M S, Smith R G, Van der Ploeg L H, Howard A D: Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. Mol Endocrinol 1997; 11: 415-423.

- 99) Adams E F, Petersen B, Lei T, Buchfelder M, Fahlbusch R: The growth hormone secretagogue, L-692,429, induces phosphatidylinositol hydrolysis and hormonesecretion by human pituitary tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 17: 555-561.
- 100) Chen C, Zhang J, Vincent J D, Israel J M: Two types of voltage-dependent calcium current in rat somatotrophs are reduced by somatostatin. *J Physiol* 1990; 425: 29-42.
- 101) Smith R G, Ckeng K, Schoen W R, Pong S S, Hickey G, Jacks T, Butler B, Chan W W, Chaung L Y, Judith F: A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science* 1993; 260: 1640-1643.
- 102) Herrington J, Hille B: Growth hormone-releasing hexapeptide elevates intracellular calcium in rat somatotropes by two mechanisms. *Endocrinology* 1994; 135: 1100-1108.
- 103) Chen C, Clarke I J: Effects growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) on membrane  $Ca^{2+}$  permeability in cultured ovine somatotrophs. *J Neuroendocrinol* 1995; 7: 179-186.
- 104) Chen C, Wu D, Clarke I J: Signal transduction system employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J Endocrinol* 1996; 148: 381-386.
- 105) Carlson M J, Cummings D E: Prospects for an anti-ghrelin vaccine to treat obesity. *Mol Interv* 2006; 6 (5): 249-252.
- 106) Shearman L P, Wang S P, Helmling S et al.: Ghrelin neutralization by a ribonucleic acid-SPM ameliorates obesity in diet-induced obese mice. *Endocrinology* 2006; 147 (3): 1517-1526.
- 107) Barnett B P et al.: Glucose and Weight Control in Mice with a Designed Ghrelin O-Acyltransferase Inhibitor. *Science* 2010; 330: 1689-1692.
- 108) Beck B, Richy S, Stricker-Krongrad A: Feeding response to ghrelin agonist and antagonist in lean and obese Zucker rats. *Life Sciences* 2004; 76 (4): 473-478.
- 109) Rudolph J, Esler W P, O'Connor S et al.: Quinazolinone derivatives as orally available ghrelin receptor antagonists for the treatment of diabetes and obesity. *Journal of Medicinal Chemistry* 2007; 50 (21): 5202-5216.
- 110) Demange L, Boeglin D, Moulin A et al.: Synthesis and pharmacologica in vitro and in vivo evaluations of novel triazole derivatives as ligands of the ghrelin receptor. 1. *Journal of Medicinal Chemistry* 2007; 50 (8): 1939-1957.

- 111) Moulin A, Demange L, Ryan J et al.: Trisubstituted 1,2,4-triazoles as ligands for the ghrelin receptor: on the significance of the orientation and substitution at position 3. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2008; 18 (1): 164–168.
- 112) Yu M, Lizarzaburu M, Beckmann H et al.: Identification of piperazine-bisamide GHSR antagonists for the treatment of obesity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2010; 20 (5): 1758–1762.
- 113) Sabbatini F M, Di Fabio R, Corsi M et al.: Discovery process and characterization of novel carbohydrazide derivatives as potent and selective GHSR1a antagonists. *ChemMedChem* 2010; 5 (9): 1450–1455.
- 114) Holst B, Lang M, Brandt E et al.: Ghrelin receptor inverse agonists: identification of an active peptide core and its interaction epitopes on the receptor. *Molecular Pharmacology* 2006; 70 (3): 936–946.
- 115) Janssen S, Laermans J, Verhulst P J, Thijs T, Tack J, Depoortere I: Bitter taste receptors and  $\alpha$ -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108 (5): 2094–2099.
- 116) Ekart P: Optimizacija selekcije visokoafinitetnih fagnih klonov iz peptidnopredstavivene knjižnice. Dипomsko delo. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2007.
- 117) Larralde O G, Martinez R, Camacho F, Amin N, Aguilar A, Talavera A, Stott D I, Perez E M: Identification of hepatitis A virus mimotopes by phage display, antigenicity and immunogenicity. *J Virol Methods* 2007; 140: 49-58.
- 118) Kay B K, Winter J, McCafferty J: Phage display of Peptides and Proteins: A laboratory manual. Academic Press, San Diego. 1996.
- 119) Lunder M, Bratkovič T, Kreft S, Štrukelj B: Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies. *J Lipid Res* 2005; 46: 1512-1516.
- 120) Willats W: Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 2002; 50: 837-854.
- 121) Green N M: Avidin. *Advances in protein chemistry* 1975; 29: 85-133.
- 122) Zhang X X, Deng Q, Zhang S Y, Liu J, Cai Q, Lu Z M, Wang Y: Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display library. *J Med Virol* 2003; 71: 511–517.

- 123) Krumpe L H R et al.: T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries. *Proteomics* 2006; 6: 4210-4222.
- 124) Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M, Horinouchi S: Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (1): 87-92.
- 125) Vodnik M, Zager U, Strukelj B, Lunder M: Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. *Molecules* 2011; 16: 790-817.
- 126) Krook M, Mosbach K, Ramström O: Novel peptides binding to the Fc-portion of immunoglobulins obtained from a combinatorial phage display peptide library. *J Immunol Methods* 1998; 221: 151-157.
- 127) DeLano W L, Ultsch M H, de Vos A M, Wells J A: Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science* 2000; 287: 1279-1283