

LATVIJAS UNIVERSITĀTE

Medicīnas fakultāte

**MELANOKORTĪNU RECEPTORU UN
TO LIGANDU PĒTĪJUMI *IN VITRO***

LĪGA KRĪGERE

**Promocijas darbs farmācijas zinātņu doktora
grāda iegūšanai farmaceutiskās farmakoloģijas
apakšnozarē**

**Rīga
2007. gads**



Promocijas darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā Fonda atbalstu Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē un Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā.

Promocijas darba vadītāja: prof., LZA korespondētājlocekle
Dr.hab.biol. Ruta Muceniece
Latvijas Universitātes
Medicīnas fakultāte

Promocijas padomes priekšsēdētāja: prof., Dr.hab.med. Renāte Ligere

Oficiālie recenzenti:

Prof., Dr.hab.med. Vija Kluša
Latvijas Universitātes
Medicīnas fakultātes
Farmakoloģijas katedras vadītāja

Dr. farm. Pēteris Prūsis (Zviedrija, AstraZeneca, DMPK-BAC, Mölndal)

Asoc.prof., Dr.med. Antons Skutelis
Rīgas Stradiņa Universitāte
Farmakoloģijas katedra

Aizstāvēšana notiks 2007.gada 14.decembrī
Latvijas Universitātes Medicīnas, bioloģijas un farmācijas nozaru
promocijas padomes sēdē Rīgā, Latvijas Universitātes Mazajā aulā, Raiņa
bulv. 19.

ANOTĀCIJA

Cilvēka genoma atšifrēšana un jaunu receptoru atklāšana ir veicinājusi pētījumus par receptoru fizioloģisko lomu organismā, kā arī jaunu ārstniecības līdzekļu, kas selektīvi darbojas uz noteiktu mērķobjektu un neskartu citas organisma funkcijas, izstrādāšanu.

Melanokortīnu receptori (MKR) un to ligandi jau kopš piecu cilvēku MKR klonēšanas 1992.-1993.g. ir ieguvuši nozīmīgu vietu jaunu zāļu radīšanas projektos. Tomēr jaunu zāļu izstrādāšana ir ilgs process, kas aizņem vidēji 12-15 gadus, kuru laikā notiek daudzi bioloģisko procesu fundamentālie pētījumi, un tajos iegūtie jaunie rezultāti var būtiski izmainīt zāļu radīšanas stratēģiju. Tā ir noticis arī melanokortīnu (MK) pētījumos.

Sākotnēji MKR saistīja tikai ar pigmentācijas regulēšanu organismā. Pirmais sintētiskais α -melanocīt-stimulējošā hormona (α -MSH) analogs ar aizvietotām aminoskābēm α -MSH molekulā – Nle⁴-Dphe⁷-MSH jeb NDP-MSH, jeb melanotāns I (MTI) tiek klīniski pārbaudīts kā pigmentāciju veicinošs medikaments.

Tomēr vēlākie MKR pētījumi ir veltīti ne tik daudz pigmentācijas procesiem, cik ādas vēža, aptaukošanās problēmas, iekaisuma procesu un seksuālo traucējumu novēršanai. Jaunākie analogi melanotāns II (MTII) un PT-141 tiek pētīti klīniskajos pētījumos kā erekcijas traucējumu novēršanas līdzekļi. Savukārt iekaisuma procesu pētījumos priekšplānā izvirzījušies MKR 3. apakštipa (MKR3) selektīvu ligandu meklējumi. Aptaukošanās ārstēšanai tiek meklēti MKR4 agonisti.

Organismā šūnas nedarbojas izolēti. Tās vienlaicīgi saņem dažādus autokrīnos un parakrīnos signālus un atbild ar šūnai raksturīgām, specifiskām reakcijām. Ekspresēto receptoru kopums uz šūnas membrānas ir mainīgs, daudzi receptori sadarbojas savā starpā, citi atrodas recīprokās attiecībās. Tomēr līdz šim ir ļoti maz informācijas par vienas ģimenes receptoru ligandu spēju saistīties pie cita apakštipa vai pat citas saimes receptoriem.

Sākotnēji jaunu receptoru ligandu skrīnings notiek modeļos *in vitro*. Tāpēc paralēli jaunu zāļu līdzekļu meklējumiem tiek pētītas dažādas šūnu līnijas, lai noskaidrotu kādus receptorus šūnas ekspresē, kā arī katras šūnu līnijas īpatnības un piemērotību pētījumu mērķiem.

Darba mērķis:

Izmantojot šūnu modeļus *in vitro*, atklāt jaunus MKR ligandus sintētisko MSH11–13 analoģu un citu ar G proteīnu saistīto receptoru ligandu vidū, un noteikt MKR agonistu ietekmi uz MKR ekspresiju dažādās šūnu līnijās.

Darba uzdevumi:

1. Noskaidrot MKR lokalizācijas īpatnības peļu melanomas šūnu līnijā B16-F1, kura dabīgi ekspresē MKR pirmo apakštipu (MKR1) un producē pigmentu melanīnu. Pētīt α -MSH un tā sintētiskā analoģa NDP-MSH saistīšanās kinētiku pie receptoriem.
2. Izmantojot peļu makrofāģu šūnu līniju RAW264.7, kura dabīgi ekspresē MKR1 un MKR3, izpētīt α -MSH un tā C gala fragmenta MSH11-13 ietekmi uz MKR blīvumu šo šūnu membrānās normā, kā arī stimulējot šūnas ar iekaisumu izraisošām vielām – baktēriju lipopolisaharīdiem (LPS) un interferonu γ (IFN γ).
3. Noteikt MKR1 lokalizācijas ilgumu no cilvēku ādas izolētu primāro fibroblastu šūnu membrānās *in vitro* un α -melanocītstimulējošā hormona (α -MSH) ietekmi uz cikliskā adenozinmonofosfāta (cAMF) līmeni ilgstoši šūnu barotnēs kultivētām šūnām.
4. Pētīt citu ar G proteīnu saistīto receptoru ligandu - P vielas (SP) antagonista spantīda I un κ opiātreceptoru agonistu dinorfīnu - spēju saistīties ar cilvēku MKR *in vitro*, kā arī noteikt MKR lomu spantīda I pretiekaisuma darbībā.
5. Pētīt sintētisko MSH11-13 lineāro un ciklisko analoģu saistīšanos ar MKR. Ligandu-receptoru saistīšanās procesā izvērtēt peptīdu stereouzbūves lomu, peptīdu cAMF stimulācijas spēju un salīdzināt MSH11-13 peptīdu pretiekaisuma darbību, izmantojot slāpekļa oksīda (NO) veidošanās testu makrofāģu šūnu līnijā RAW264.7, kura reaģē uz iekaisuma aģentu kairinājumu ar pastiprinātu NO sintēzi.

Iegūtie rezultāti liecina, ka atklāti jauni MKR ligandi. Tie ir MK struktūrai neradniecīgi peptīdi - P vielas receptoru ligands spantīds I un κ opiātreceptoru ligandi

dinorfīni, kas saistās pie MKR *in vitro*. Izmantojot MKR neselektīvo antagonistu HS024, pierādīta MKR loma spantīda I pretiekaisuma darbībā.

Atklāts, ka dinorfīni saistās pie MKR īpatnējā veidā: A1–17 ar līdzīgu afinitāti pie receptoru pāriem MKR1 un MKR3, MKR4 un MKR5; A2–17 ar līdzīgu afinitāti pie MKR1 un MKR4, MKR3 un MKR5. A2–11 saistās ar izteikti augstāku afinitāti un selektivitāti pie MKR1 nekā pie pārējiem MKR, bet gandrīz nesaistās pie MKR5. A1-13 saistās līdzīgi pilnai molekulai A1–17 pie MKR1–4, bet pie MKR5 ar 10 reizes augstāku afinitāti nekā dinorfīns A1-17. Šāda veida saistīšanās pazīmes atšķiras no α -MSH saistīšanās veida.

Pētījumi ar melanomas šūnu līniju B16-F1 parāda, ka no eksperimentiem ar transfektētām COS-7 un COS-1 šūnām adoptētā radioliganda NDP-MSH saistīšanās metode ir piemērota arī MKR dabīgi ekspresējošo šūnu pētījumos. MKR ekspresija dabīgās peļu šūnu līnijās – B16-F1, RAW264.7 un cilvēku ādas fibroblastos – ir mainīga un atkarīga no stimulācijas ar dažādiem aģentiem. LPS un IFN γ paaugstina MKR skaitu šūnas membrānās un stimulē NO sintēzi, kas liecina par iekaisuma procesu aktivēšanu. α -MSH un tā C gala fragments MSH11-13 darbojas pretēji LPS un IFN γ , samazinot MKR blīvumu peļu makrofāgu šūnās un inhibējot NO sintēzi, tādējādi uzrādot pretiekaisuma darbību *in vitro*. No cilvēku ādas izolētās primārās fibroblastu šūnas kultivētas barotnēs 6 pasāžu laikā zaudē MKR uz šūnu virsmas, kā arī cAMF producēšanas spēju kā atbildes reakciju uz α -MSH stimulāciju.

MSH11-13 un tā analogi nesaistās pie MKR un nestimulē cAMF sintēzi, tomēr tie inhibē NO pārprodukciju, kas liecina par šo peptīdu pretiekaisuma darbību. Analogu struktūras īpatnības: MSH11–13 un lineārajam analogam H-Lys-Pro-Val-NH₂ (II) abas amino grupas ir brīvas,

cikliskajiem analogiem Ac-Lys-Pro-Val (III) un Ac-Lys-Pro-DVal (IV)

ir brīvas α -amino grupas, bet atšķirīga Val konfigurāciju (IV ar DVal), ciklopeptīdiem c(Lys-Val) (V) un c(Lys-DVal) (VI) ϵ -amino grupas ir brīvas, bet L un DVal iekļauti ciklā. Peptīdu NO inhibīcijas spēja sarindojas: α -MSH > Ac-MSH11–13 (I) = H-MSH11–13 (II) > IV > III > V = VI.

Secinājumi

Šūnu līniju raksturošanas pētījumi apliecina, ka cilvēku ādas fibroblasti *in vitro* ātri zaudē MKR uz šūnu virsmas. Dabīgās šūnu līnijas - peļu melanomas šūnu līnija

B16-F1 un peļu makrofāgu šūnu līnija RAW264.7 ilgstoši ekspresē MKR uz šūnu virsmas. Tomēr agonistu ietekmē B16-F1 šūnās novēro MKR blīvuma samazināšanos.

Peptīdu struktūras-aktivitātes pētījumi ļauj secināt, ka cikliskie MSH11-13 analogi vājāk nekā lineārie MSH11-13 peptīdi inhibē iekaisuma aģentu izraisīto NO pārprodukciju šūnās. Sintētisko MSH11-13 analogu sērijā visbrīvākā konfigurācija ir lineāriem peptīdiem, kuri attiecīgi uzrāda lielāku NO inhibīcijas efektu. Cikliskie peptīdi ar 13-locekļu cikliem (III un IV) ir ar ierobežotu kustības brīvību, bet peptīdi V un VI ir nekustīgi 6-locekļu diketopiperazīna gredzeni. MSH11-13 analogs ar *DVal* (III) uzrāda četras reizes spēcīgāku NO pārprodukcijas inhibīciju nekā analogs ar *LVal* (IV), kas norāda uz streoizomērijas lomu un ļauj ieteikt ķīmiķiem sintezēt jaunus analogus ar D-aminoskābēm peptīdu struktūrā, lai uzlabotu to pretiekaisuma darbību. Atklātās struktūras determinantes varētu izmantot arī nepeptīdu uzbūves vielu sintēzei, lai iegūtu jaunus pretiekaisuma līdzekļus.

Eksperimentāli pārbaudot iepriekš teorētiski izteikto hipotēzi par iespējamu *DTrp-Nle-NH₂* un *DTrp-Arg-NH₂* motīvu saturošo peptīdu saistīšanos pie MKR, tika atklāti jauni MKR ligandi SP un opiātreceptoru ligandu vidū – spantīds I un dinorfīni. Šie dati apliecina ar G proteīnu saistīto receptoru ligandu izraisīto signālkaskāžu savstarpēju mijiedarbību, kas, ja šos ligandus pētītu klīnikā, varētu izpausties kā medikamentu blaknes.

ABSTRACT

Discovery of human genomic code and following cloning of new receptor genes significantly promoted fundamental studies on the receptor physiological roles as well as stimulated development of new drugs which selectively influence corresponding cell target without side effects on other signaling pathways.

Since cloning of five melanocortin receptor (MCR) in years 1992–1993, studies on the MCRs and their ligands are included in many fundamental research projects as well as in projects financed by pharmaceutical companies aimed to the target-based drug discovery. However, development of a new drug is long process, in average taking 12–15 years, and during this period new hypotheses appear, and applied science may influence a novel drug development strategies.

Initially the physiological role of MCRs was described as regulation of pigmentation therefore the first synthetic analog of natural hormone α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) – $\text{Nle}^4\text{-DPhe}^7\text{-MSH}$ or NDP-MSH, or melanotan I (MTI) in clinics was tested as pigmentation-stimulating drug. However, the latest studies on the MCRs are aimed to the treatment of melanoma, obesity, inflammation and sexual disorders. Novel MSH analogs melanotan II (MTII) and PT-141 in clinics are tested as drugs to treat sexual disorders whereas the MCR subtype 3 (MCR3) selective agonists are supposed to be anti-inflammatory agents, and MCR4 agonists to be anti-obesity drugs.

In organism cells co-operate. They receive different autocrine and paracrine stimuli and respond with the cell-characteristic responses. One of them is expression of the different receptor proteins. As a role, a pool of expressed receptors on cell membranes are changing, and different receptors could be in reciprocal or co-operative relationships. However, there still is too little information about cross binding of the ligands of different receptor families. It is suggested that ligands belonging to one receptor family might bind to the receptors of another receptor family as well.

Initially the screening of the novel ligands is carried out by using test-systems *in vitro*. Therefore, in parallel with intensive synthetic work a different cell lines are tested for the suitability to serve as corresponding receptor donors or for the characterization of cell intrasignalling pathways.

The goal of this study:

To discover new MCR ligands between MSH11-13 analogues and ligands of other G protein coupled receptors by using cell test-systems *in vitro* as well as to study in-depth the influence of MCR agonists on the MCR expression in different cell lines.

Tasks:

1. To clarify peculiarities of localization of MCR on mouse melanoma cell line B16-F1 which naturally expresses MCR1 subtype and produces pigment melanin. To study kinetics of the α -MSH and NDP-MSH binding to the MCRs.
2. To study MCR expression in mouse macrophage cell line RAW264.7 in resting cells and stimulated with bacterial lipopolysaccharides (LPS) and interferon- γ (IFN- γ) as well as to determine the influence of α -MSH and its C terminal tripeptide MSH11-13 on the receptor density on the cells.
3. To study duration of the MCR localization on human primary skin fibroblast cells and the cell generation of cAMP in long-term cultures.
4. To examine binding of substance P and κ opiate receptor ligands to the MCRs *in vitro* as well as to prove melanocortin-ergic component in the substance P antagonists' Spantide I anti-inflammatory action.
5. To find essential structure-activity determinants for the anti-inflammatory activity of MSH11-13 linear and cyclic analogs. To evaluate the capacity of MSH11-13 and its analogs to bind to MCRs, to stimulate cAMP and to regulate a production of nitric oxide (NO) in RAW264.7 cells that respond to inflammatory stimuli with the overproduction of NO.

The obtained results show that new MCRs ligands between peptides with structure non-relative to melanocortins are discovered, namely, Spantide I and dynorphins A. By using nonselective MCRs antagonist HS024 the MCR-ergic mechanism of anti-inflammatory action of Spantide I was proved.

Dynorphins bind to MCRs in peculiar manner: A1-17 with similar affinity to MCR1 and MCR3, MCR4 and MCR5; A2-17 with similar affinity to MCR1 and MCR4, MCR3 and MCR5; A2-11 shows higher affinity and selectivity to MCR1 whereas almost does not bind to MCR5. A1-13 resembles full dynorphine A molecule binding to MCR1-4 but binds to MCR5 with 10-fold higher affinity as A1-17. Such binding pattern is different from that of α -MSH.

Studies on the mouse melanoma cell line B16–F1 show that from COS cells adopted NDP-MSH radioligand binding assay is suitable for naturally MCRs expressing cells. MCR expression on mice B16–F1, RAW264.7 and human skin fibroblast cells are changing and depends on cell culturing environment as well as cell stimulation with different agents. LPS and IFN γ increase number of the MCRs simultaneously with NO overproduction in RAW264.7 cell line. The NO overproduction is taken as sign of inflammation. α -MSH and MSH11–13 act as anti-inflammatory agents and decrease NO production simultaneously with the down regulation of MCRs expression.

Human fibroblast cultures loose MCR1 on the cell surface after 6 passages. The binding studies revealed localization of MCR1 on cell membranes during 1–3 passages.

MSH11–13 and its analogues inhibit NO overproduction. However, they do not bind to MCRs and do not stimulate cAMP production. Structural determinants for MSH11–13 and its linear analog H-Lys-Pro-Val-NH₂ (II) were free amino groups. Cyclic analogs

Ac-Lys-Pro-Val (III) and Ac-Lys-Pro-DVal (IV) have free α -amino groups but
 $\text{I} \quad \text{I}$ $\text{I} \quad \text{I}$
 different Val configuration (L and D). The cyclopeptides c(Lys-Val) (V) and c(Lys-DVal) (VI) have free ϵ -amino groups whereas L un DVal is inside the cycle. The potency order of these peptides to inhibit NO overproduction is following: α -MSH > Ac-MSH11–13 (I) = H-MSH11–13 (II) > IV > III > V = VI.

The obtained data allowed us **to conclude** that during 6 passages human fibroblasts loose MCR on their surface, mice cell lines B16-F1 and RAW264.7 maintain MCR in long-term. However, MCR agonists down regulate MCRs on B16-F1 cells. We have discovered the role of cyclization and stereoizomerization in the anti-inflammatory action of MSH11–13 analogues. Linear peptides have the most flexible configuration and show the most pronounced NO inhibition. Stereo selectivity is demonstrated as ability of peptide IV (with DVal) four times stronger than peptide III to inhibit NO overproduction. On the basis of structure determinants a design of non-peptide substances with anti-inflammatory drug properties may be recommended.

The discovery of novel MCRs ligands between opiate and substance P receptor ligands confirms the hypothesis of possible G protein coupled receptor cross-talk that in clinics might cause side effects of novel drugs designed on the basis of the ligands of these receptors.

Publikāciju saraksts

Šis promocijas darbs ir veidots kā publicēto rakstu kopa un ietver sešas publikācijas (skat. zemāk). Tekstā publikācijas apzīmētas ar romiešu cipariem I-VI.

Promocijas darbā iekļauti arī vēl nepublicēti dati.

I. Muceniece R., Krigere L., Suli-Vargha H., Wikberg JE. Effects of alpha-melanotropin C-terminal tripeptide analogues on macrophage NO production. *Peptides*, 2003; V24: 701-707.

II. Krīgere L., Saleniece Kr., Rumaks J., Muceniece R.. Binding of a substance P antagonist, spantide I, to melanocortin receptors. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 2003; V57:158-164.

III. Krīgere L., Liepinsh E., Kirjanova O., Saleniece Kr., Korotejeva O., Zvejniece L., Dambrova M., Muceniece R.. Binding peculiarities of a melanocyte stimulating hormone and its analogue [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH to melanocortin receptor subtype 1 on mouse melanoma B16-F1 cells. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 2003; V57:164-168.

IV. Štāmere B., Krīgere L., Saleniece K., Vikmanis U., Muceniece R. Studies on the interaction between the opioid and melanocortin-ergic systems: dynorphin binding to melanocortin receptors. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 2004; V58:9-14.

V. Krīgere L., Saleniece Kr., Zvejniece L., Liepiņš E., Vilšķērsts R., Dambrova M., Muceniece R. Melanokortīnu receptora 1.apakštīpa ekspresijas regulācija makrofāgu šūnu līnijā RAW264.7. *Latvijas Universitātes raksti*, 2006; Nr.694: 60-67.

VI. Muceniece R., Riekstiņa U., Vrublevska Kr., Krigere L., Saleniece Kr., Cakstiņa I., Ancans J. Primary human fibroblastic cells *in vitro* loose ability to express cell surface melanocortin receptor. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 2007; accepted.

Promocijas darba laikā ir bijusi sadarbība ar pētniekiem citos projektos. Šīs sadarbības laikā publicēti raksti:

I. Muceniece R., Saleniece Kr., Riekstina U., Krigere L., Tirzitis G., Ancans J. Betulin binds to melanocortin receptors and antagonizes alpha-melanocyte stimulating hormone induced cAMP generation in mouse melanoma cells. *Cell Biochem. Funct.* 2007 Jul 2; online.

II. Muceniece R., Zvejniece L., Kirjanova O., Liepinsh E., Krigere L., Vilskersts R., Baumanė L., Gordjusina V., Kalvinsh I., Wikberg J.E.S., Dambrova M. beta-MSH inhibits brain inflammation via MC_{3/4} receptors and impaired NF-κB signalling. *J. Neuroimmunol.*, 2005; V169:13-19.

III. Muceniece R., Zvejniece L., Kirjanova O., Liepinsh E., Krigere L., Baumanė L., Kalvinsh I., Wikberg JE., Dambrova M. beta- and gamma-melanocortins inhibit lipopolysaccharide induced nitric oxide production in mice brain. *Brain Res.*, 2004; V 995:7-13.

Par rezultātiem ir ziņots zinātniskajās konferencēs un kongresos:

1. Krigere L., Saleniece Kr., Vrublevska Kr., Riekstina U., Muceniece R. Substance P receptor antagonist spantide-I binds to melanocortin receptors and inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in murine macrophage cell line RAW.264.7. *Neuropeptides 2007: functions, dysfunctions&therapeutic options.* Santorini, Greece 19-21 April, 2007, Abstract book page 65.

2. Burmistris R., Rukmane J., Krigere L., Vrublevska Kr., Enins A., Muceniece R. Dispensing of the psychotropic drugs via two community pharmacies during 2002-2003 years. *European Society of Clinical Pharmacy, 6th ESCP Spring conference, 2006, 25-27 May, Vilnius, Lithuania, PC-40, 30p.*

3. Krīgere L., Saleniece K., Muceniece R., Dambrova M., Tirzitis G. The betulin binding to the GABA and benzodiazepine receptors in the mice brain. The IX International Congress „Actual problems of creation of new medicinal preparations of natural origin”, Phytopharm 2005, St. Peterburg, June 22-25, 2005, 805p.

4. Krīgere L., Rumaks J, Muceniece R. Anti-inflammatory activity of alfa-melanocyte-stimulating hormone C-terminal tripeptide analogues. International conference Pharmacology in Latvia:stepping into the 21st century. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, 2004, 58, A11.

5. Krīgere L., Rumaks J., Mežapuķe R., Žarkova O., Dambrova M., Muceniece R.. D-triptofānu saturošo peptīdu saistīšanās pie melanokortīnu receptoriem. LU 61.konference, Rīga, 2003, 19.lpp.

SAĪSINĀJUMI

AKTH	adrenokortikotropais hormons
α -MSH	α -melanocīt-stimulējošais hormons
β -LPH	β -lipotropīns
cAMF	cikliskais adenozinmonofosfāts
GASS	γ -aminosviestskābe
GDF	guanozinmonofosfāts
IFN γ	interferons γ
IBMX	3-izobutil-1-metilksantīns
I κ B	inhibitorais kappab proteīns
iNOS	inducējamā slāpekļa oksīda sintāze
IC ₅₀	inhibējošā koncentrācija 50
IL-10	interleikīns 10
K _i	inhibīcijas konstante
LPH	lipotropīns
LPS	baktēriju lipopolisaharīdi
NED	naftiletilēndiamīns
MK	melanokortīni
MKR	melanokortīnu receptori
MTI	melanotāns I
MTII	melanotāns II
POMK	proopiomelanokortīns
PKA	proteīnkināze A
SP	P viela
TM	transmembrānu domēns
U/ml	darbības vienības/ml

SATURS

ANOTĀCIJA	3
PUBLIKĀCIJU SARAKSTS	10
SAĪSINĀJUMI	13
1. IEVADS	16
2. LITERATŪRAS APSKATS	19
2.1. Endogēnie melanokortīni.....	19
2.1.1. Melanokortīnu atklāšanas vēsture un nomenklatūra.....	19
2.1.2. Melanokortīnu primārā struktūra.....	20
2.1.3. Melanokortīnu izplatība CNS un perifērajos audos.....	21
2.2. Melanokortīnu receptori.....	22
2.2.1. Melanokortīnu receptoru atklāšana.....	22
2.2.2. MKR lokalizācija un fizioloģiskā loma.....	24
2.2.3. Receptoru dimēri.....	26
2.2.4. MKR apakštipu fizioloģiskās lomas raksturojums.....	27
2.2.4.1. Pirmais apakštips (MKR1).....	27
2.2.4.2. Otrais apakštips (MKR2).....	28
2.2.4.3. Trešais apakštips (MKR3).....	29
2.2.4.4. Ceturtais apakštips (MKR4).....	30
2.2.4.5. Piektais apakštips (MKR5).....	31
2.3. Dabīgie hormoni un sintētiskie peptīdi kā MKR ligandi.....	32
2.4. MKR ligandu agonistiskās un antagonistiskās darbības.....	34
izvērtēšanas metodes	
2.5. α -MSH C gala tripeptīds un tā analogi.....	37
2.6. MKR pētījumos lietotās šūnu līnijas.....	39
3. MATERIĀLI un METODES	42
3.1. Reāģenti.....	42
3.2. Pētāmie peptīdi.....	42
3.3. Šūnu līnijas.....	43
3.4. Šūnu kultūras.....	44
3.4.1. Tripsinizēšana un šūnu skaitīšana.....	44
3.4.2. Šūnu skaita noteikšana.....	45
3.4.3. Šūnu transfektēšana.....	45
3.5. MKR DNS ekspresijas vektori	45
3.6. Ligandu–receptoru saistīšanās noteikšana.....	46
3.7. Slāpekļa oksīda līmeņa mērījumi.....	47
3.8. cAMF līmeņa mērījumi.....	47
3.8.1. cAMF saistīšanas proteīna sagatavošana.....	48
3.9. Datu apstrāde.....	48

4. REZULTĀTI.....	49
4.1. α -MSH un tā analoga [Nle ⁴ , DPhe] α -MSH MKR saistīšanās kinētikas.....	49
raksturojums peļu melanomas šūnu B16-F1 līnijā	
4.2. P vielas antagonista spantīda I saistīšanās pie MKR.....	52
4.3. Spantīda I ietekme uz NO veidošanos RAW264.7 šūnu līnijā.....	54
4.4. Dinorfīnu saistīšanās pie MKR.....	55
4.5. Cilvēka ādas primāro fibroblastu MKR1 ekspresijas un cAMF veidošanās pētījumi.....	56
4.6. α -MSH11-13 analogu saistīšanās pie MKR.....	58
4.7. MSH11-13 un tā analogu ietekme uz cAMF līmeni B16-F1 un RAW264.7 šūnās.....	59
4.8. Slāpekļa oksīda veidošanās RAW264.7 šūnās.....	60
4.9. α -MSH un MSH11-13 ietekme uz MKR1 ekspresiju makrofāgu šūnu līnijā RAW264.7.....	62
5. DISKUSIJA.....	65
5.1. NDP-MSH un α -MSH saistīšanās kinētika pie MKR.....	65
5.2. Cilvēka ādas primāro fibroblastu MKR1 raksturojums.....	67
5.3. Spantīda I saistīšanās pie MKR1 un tā ietekme uz NO veidošanos.....	68
5.4. Dinorfīnu saistīšanās pie MKR raksturojums.....	69
5.5. MSH11-13 un tā analogu ietekme uz MKR mediētajiem procesiem.....	69
5.5.1. MSH11-13 ietekme uz MKR1 lokalizāciju makrofāgu šūnu membrānās.....	69
5.5.2. MSH11-13 un tā analogu stereouzbuves loma.....	71
6. SECINĀJUMI.....	73
7. PATEICĪBAS.....	74
8. LITERATŪRA.....	75

1. IEVADS

Melanokortīnu receptori (MKR) un to ligandi jau kopš cilvēku receptoru klonēšanas 1992.-1993.g. ieguvuši nozīmīgu vietu gan bioloģisko procesu fundamentālajos pētījumos, gan farmaceitisko firmu finansētajos jaunu zāļu radīšanas projektos. Tomēr jaunu zāļu izstrādāšana ir ilgs process, kas aizņem vidēji 12-15 gadus, kuru laikā notiek daudzi pētījumi, un tajos iegūtie jaunie rezultāti var būtiski izmainīt zāļu radīšanas stratēģiju. Tā ir noticis arī melanokortīnu pētījumu jomās. Sākotnēji MKR saistīja tikai ar pigmentācijas regulēšanu organismā. Pirmais sintētiskais α -melanocīt-stimulējošā hormona (α -MSH) analogs ar aizvietotām aminoskābēm α -MSH molekulā – Nle-DPhe-MSH jeb NDP-MSH, jeb melanotāns I (MTI) tiek klīniski pārbaudīts kā pigmentāciju veicinošs medikaments (Hadley and Dorr, 2006). Tomēr vēlākie MKR pētījumi ir velīti ne tik daudz pigmentācijas procesiem, cik ādas vēža, aptaukošanās problēmas, iekaisuma procesu un seksuālo traucējumu novēršanai. Jaunākie analogi melanotāns II (MTII) un PT-141 tiek pētīti klīniski kā erekcijas traucējumu novēršanas līdzekļi (Hadley and Dorr, 2006).

Sākotnēji liela mēroga vielu skrīningu veic modeļos *in vitro*, izmantojot dažādas šūnu kultūras. Tomēr, kā liecina pēdējā laika pētījumi, katra šūnu līnija vēl ir par maz izpētīta gēnu ekspresijas un signālceļu ziņā. Tā, piemēram, MKR tikai nesen tika atklāti uz imūnās sistēmas šūnām. Tad ilgu laiku uzskatīja, ka tās ekspresē tikai MKR pirmo apakštipu (MKR1), un tās var izmantot šī receptora pētījumiem, bet tagad iegūti dati par arī MKR trešā apakštipa (MKR3) lokalizāciju uz imūnās sistēmas šūnām (Catania *et al.*, 2004). Līdz ar to iegūtie dati jāpārskata, jo vairs nav iespējams apgalvot, ka MKR1 ir atbildīgs par MKR ligandu pretiekaisuma darbību un jāmeklē īpaši selektīvi MKR1 agonisti. Priekšplānā izvirzījušies MKR3 selektīvu ligandu meklējumi. Vēl vairāk, mainās pat klasiskie priekšstati par ar G proteīnu saistīto receptoru funkcionēšanu. Līdz 2005.g. valdīja uzskats, ka šīs ģimenes receptori piesaista ligandus kā monomēri. Tomēr jaunākās publikācijas liecina, ka šūnu membrānās veidojas receptoru dimēri vai pat oligomēri (Mandrika *et al.*, 2005). Nav pat vēl zināms, ko tas mainīs jaunu receptoru ligandu pētījumos, kādas jaunas hipotēzes tiks izvirzītas.

Šūnu darbību, bioķīmiskos procesus un pielāgošanos ārējās vides apstākļiem ietekmē metabolismā iesaistītās vielas un dažādi kairinātāji, kas regulē šūnu vairošanos, diferenciaciju, apoptozi vai nekrozi. Jo labāk būs raksturotas šūnu līnijas, jo labāk *in*

vitro iegūtie rezultāti atbildīs *in vivo* rezultātiem. Tāpēc tiek pētītas vairākas dažādu šūnu līnijas, lai noskaidrotu katras līnijas īpatnības. Šajā darbā tika pētītas peļu melanomas, makrofāgu un cilvēku ādas fibroblastu šūnas, lai noskaidrotu MKR ekspresijas īpatnības un kinētiku, kādā notiek ligandu saistīšanās pie receptoriem.

Organismā šūnas nedarbojas izolēti. Tās vienlaicīgi saņem dažādus autokrīnos un parakrīnos signālus un atbild ar šūnai raksturīgām, specifiskām reakcijām. Ekspresēto receptoru kopums uz šūnas membrānas ir mainīgs, daudzi receptori sadarbojas savā starpā, citi atrodas recīprokās attiecībās. Līdz šim ir ļoti maz informācijas par vienas ģimenes receptoru ligandu spēju saistīties pie cita apakštipa vai pat citas saimes receptoriem. Šajā darbā tika pārbaudīta iespējamā P vielas antagonistu saistīšanās ar MKRs. Fizioloģiski P viela darbojas pretēji melanokortīniem, bet tās antagonistiem iekaisuma testos ir novērota melanokortīniem daļēji līdzīga farmakoloģiska aktivitāte.

Arī melanokortīni, kuru darbību iepriekš attiecināja tikai uz to saistīšanos ar specifiskiem MKR, spēj ietekmēt arī citas – nemelanokortīnērgiskās sistēmas, kas savukārt piedalās sāpju un psihoemocionālā stāvokļa regulācijā. Vielu darbības mehānismi bieži vien ir atšķirīgi, kaut arī farmakoloģiskie efekti ir līdzīgi. Melanokortīnu mijiedarbību ar opiātu receptoru signālceļiem apstiprināja fakts, ka MKR antagonists HS014 uzrāda analgētisku darbību, stimulējot opiātu receptorus. Šajā darbā tika pētīta opiātu receptoru ligandu dinorfīnu spēja saistīties ar MKRs, un tika atklāts, ka tiešām starp dinorfīniem un to fragmentiem ir peptīdi ar MKR ligandu potenciālu.

Melanokortīni veidojas no liela priekšteča – proopiomelanokortīna (POMK), bet tālākais MSH peptīdu metabolisms šūnās nav līdz galam noskaidrots. Lai gan MSH11–13 endogēnā izcelsme nav pierādīta un MSH11–13 pat nesaistās ar MKR, tripeptīds MSH11-13 tiek pētīts paralēli MKR ligandiem kā pretiekaisuma viela. Šajā pētījumā, izvērtējot MSH11-13 lineāro un ciklisko analogu darbību, tika noskaidrota peptīdu stereouzbuves loma to pretiekaisuma darbībā.

Darba mērķis:

Izmantojot šūnu modeļus *in vitro*, atklāt jaunus MKR ligandus sintētisko MSH11–13 analogu un citu ar G proteīnu saistīto receptoru ligandu vidū, un noteikt MKR agonistu ietekmi uz MKR ekspresiju dažādās šūnu līnijās.

Darba uzdevumi:

1. Noskaidrot MKR lokalizācijas īpatnības peļu melanomas šūnu līnijā B16-F1, kura dabīgi ekspresē MKR pirmo apakštipu (MKR1) un producē pigmentu melanīnu. Pētīt α -MSH un tā sintētiskā analoga NDP-MSH saistīšanās kinētiku pie receptoriem.
2. Izmantojot peļu makrofāgu šūnu līniju RAW264.7, kura dabīgi ekspresē MKR1 un MKR3, izpētīt α -MSH un tā C gala fragmenta MSH11-13 ietekmi uz MKR blīvumu šo šūnu membrānās normā, kā arī stimulējot šūnas ar iekaisumu izraisošām vielām – baktēriju lipopolisaharīdiem (LPS) un interferonu γ (IFN γ).
3. Noteikt MKR1 lokalizācijas ilgumu no cilvēku ādas izolētu primāro fibroblastu šūnu membrānās *in vitro* un α -melanocītstimulējošā hormona (α -MSH) ietekmi uz cikliskā adenozinmonofosfāta (cAMF) līmeni ilgstoši šūnu barotnēs kultivētām šūnām.
4. Pētīt citu ar G proteīnu saistīto receptoru ligandu - P vielas (SP) antagonista spantīda I un κ opiātreceptoru agonistu dinorfīnu - spēju saistīties ar cilvēku MKR *in vitro*, kā arī noteikt MKR lomu spantīda I pretiekaisuma darbībā.
5. Pētīt sintētisko MSH11-13 lineāro un ciklisko analogu saistīšanos ar MKR. Ligandu-receptoru saistīšanās procesā izvērtēt peptīdu stereouzbūves lomu, peptīdu cAMF stimulācijas spēju un salīdzināt MSH11-13 peptīdu pretiekaisuma darbību, izmantojot slāpekļa oksīda (NO) veidošanās testu makrofāgu šūnu līnijā RAW264.7, kura reaģē uz iekaisuma aģentu kairinājumu ar pastiprinātu NO sintēzi.

Darbs tika veikts doktorantūras un pēcdoktorantūras studiju laikā LU Medicīnas fakultātē, sadarbojoties ar Latvijas Organiskās Sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratoriju (vad. Dr.farm. M.Dambrova), Upsalas universitātes Farmācijas fakultāti (Zviedrija) un Eotvos universitātes Peptīdu ķīmijas grupu (Ungārija).

2. LITERATŪRAS APSKATS

2.1. Endogēnie melanokortīni

2.1.1. Melanokortīnu atklāšanas vēsture un nomenklatūra

Pētot hipofīzes ekstrakta ietekmi uz vardes ādas pigmentāciju (Fuchs, 1912), tika izteikta hipotēze, ka hipofīze izdala kādu vielu, kura stimulē vardes ādas tumšīnāšanos. Tā pirmo reizi tika aprakstīta melanokortīnu bioloģiskā aktivitāte. Tomēr līdz aktīvās molekulas formulas noskaidrošanai pagāja 43 gadi (Lerner and Lee, 1955). Atklātais peptīds tā darbības dēļ tika nosaukts par α -melanocīt-stimulējošo hormonu (α -MSH). Vēlāk tika noskaidrots, ka eksistē vairāki MSH peptīdi, kuriem ir kopīgs priekštecis – liela molekula proopiomelanokortīns (POMK), kas tiek sašķelta ar divu audu tipam raksturīgu konvertāžu PC1 un PC2 palīdzību (Tanaka, 2003; Koning *et al.*, 2006). 240 aminoskābju atlikumu garā proteīna POMK aminoskābju sekvenču ir identiskas hipofīzē, citās smadzeņu struktūrās un perifērajos audos (Smith and Funder, 1988). Centrālajā nervu sistēmā POMK-imunoreaktīvie neironi veido divas nozīmīgas neirālas sistēmas: 1) no hipotalāma mugurējās daļas šūnu ķermeņiem, 2) smadzeņu stumbra šūnu ķermeņiem, kuru neironi projicējas dažādās CNS daļās, tajā skaitā *telencephalon*, *diencephalon*, *mesencephalon*, smadzeņu stumbru un muguras smadzenēs (Low *et al.*, 1994).

POMK šķeloties veidojas melanokortīni, pie kuriem pieder adrenokortikotropais hormons (AKTH) un MSH peptīdi, kā arī veidojas vairāki citi bioloģiski aktīvi POMK fragmenti, arī β endorfīns un lipotropīni. MSH peptīdi ir α -MSH, β -MSH un γ 1, γ 2, γ 3-MSH (Uhler and Herbert, 1983; Bloom *et al.*, 1980). 2003. gadā dzeloņzivis un dzeloņrajas POMC gēnos tika atklāts jauns δ -MSH peptīds (Dores *et al.*, 2003). Prohormona konvertāze PC1 ģenerē AKTH, bet PC2, nošķelot no AKTH pirmās 13 aminoskābes, veido α -MSH peptīdu. AKTH molekulā pirmās 13 aminoskābes ir identiskas α -MSH aminoskābju secībai; tas norāda uz šī tridekapeptīda izcelšanos no AKTH. Savukārt β -MSH struktūra norāda uz tā izcelšanos no lipotropīna (LPH). PC konvertāzes ir šūnu intracelulārajā vidē šķīstoši enzīmi un galvenokārt lokalizējas neironu liela blīvuma serdes vezikulās un endokrīnajās šūnās. Galvenais melanokortīnu sintēzes avots ir hipofīze. Šūnas, kas ekspresē POMK, ir hipofīzes vidējās daļas melanotropās un priekšējās daļas kortikotropās šūnas. α -MSH un β -lipotropīns

(β -LPH) ir pazīstami kā hipofīzes vidējās daivas galvenie hormoni.

Visbiežāk POMK enzimatiskā šķelšana notiek vietās, kur divas polāras aminoskābes veido peptīda saiti: Arg-Arg (R-R), Lys-Lys (K-K), Arg-Lys (R-K), Lys-Arg (K-R).

2.1.2. Melanokortīnu primārā struktūra

MK ģimenes peptīdi atšķiras viens no otra ar aminoskābju sekvencēm un ķēdes garumu (1. att.). Vienīgi α -MSH N-gals ir acetilēts. Bez tam α -MSH un γ_1 -MSH C galā satur aminogrupu. Taču tie visi, izņemot δ -MSH, satur farmakoforo vienību jeb kopējo tetrapeptīdu His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹. Iespējams, šīs struktūras trūkuma dēļ δ -MSH nesaistās pie MKR.

AKTH

H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Lys-Lys-Arg-Arg- Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe- Pro-Leu-Glu-Phe-OH

α -MSH

Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

γ_1 -MSH

H-Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-NH₂

γ_2 -MSH

H-Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-Gly-OH

γ_3 -MSH

H-Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe-Arg-Arg-Asn-Gly-Ser-Ser-Ser-Ser-Gly-Val-Gly-Gly-Ala-Ala-Gln-OH

β -MSH

H-Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH

δ -MSH

Ser-Met-Glu-Val-Arg-Gly-Trp-OH

1.att. Melanokortīnu peptīdu primārā struktūra.

Pasvītrots MSH peptīdu kopējais fragments jeb farmakoforā vienība

1. attēlā ir redzams, ka α -MSH aminoskābju sekvence ir identiska pirmajām 13 aminoskābēm AKTH ķēdē. α -MSH veido 3 endogēnas formas: dezacetilēto, monoacetilēto un diacetilēto. Dezacetilētais α -MSH var veidoties par α -MSH jeb acetilēto formu (Verburg-van Kemenade *et al.*, 1987). Acetilētais α -MSH galvenokārt izdalās hipofīzes melanotropajās šūnās, savukārt hipotalāmā - α -MSH dezacetilētā

forma. γ -MSH peptīdu struktūru ir līdzīga, jo tikai viena papildus aminoskābe (glicīns, Gly) γ_2 -MSH molekulas C galā atšķir šo peptīdu no γ_1 -MSH.

2.1.3. Melanokortīnu izplatība CNS un perifērajos audos

Pagājušā gadsimta astoņdesmito gadu literatūrā atrodami daudzi pētījumi par α -MSH un AKTH sintēzi, atrašanos un funkcionālo lomu (Eberle, 1988). Smadzenēs α -MSH atklāts hipofīzē un hipotalāmā, perifērijā – aknās, nierēs, placentā, aizkuņģa dziedzerī, ādā, zarnās un imunokompetentajās šūnās. α -MSH peptīda imunoreaktivitāte tika pētīta astoņdesmitajos gados un tika atklāta trīs CNS rajonos: hipotalāma *nucleus arcuatus*, hipotalāma dorsolaterālajā rajonā un *nucleus tractus solitarius* (Eberle, 1988). No šiem smadzeņu rajoniem izejošās šķiedras projicējas visās smadzenēs, arī hipotalāmā, talāmā, vidussmadzenēs, *amygdala*, smadzenītēs, muguras smadzenēs, hipokampā un lielajās smadzeņu puslodēs. Savukārt γ -MSH peptīda klātbūtne atklāta atsevišķos CNS apvidos, zarnu neironos un virsnieru medulārajā daļā (Eberle, 1988).

γ -MSH imunoreaktivitāte noteikta POMK ekspresējošos neironos - *nucleus arcuatus* un *nucleus cornu commissuralis* (Bloom, 1980), kā arī citos CNS rajonos. α -MSH un γ -MSH klātbūtne nervos, kas inervē smadzeņu stumbra baroreceptoru rajonus, norāda uz iespējamo MSH peptīdu ietekmi uz kardiovaskulāro sistēmu (Palkovits, 1987).

β -MSH sākotnēji tika izolēts no hipofīzes ekstrakta, tad tika noteikts, ka tā struktūra atbilst β -LPH 37-58 rajonam, bet vēl vēlāk β -MSH atklāja hipotalāmā un precizēja tā struktūru, kas atbilst β -LPH 41-58 sekvencei (Catania *et al.*, 2004). α -MSH, γ -MSHs un AKTH ir difūzi lokalizēti arī perifērijā (1. tabula).

1. tabula. Melanokortīnu peptīdu izplatība organismā

Peptīdi	CNS un perifērie audi
	Hipofīze
α -MSH, γ -MSH AKTH	<i>Pars intermedia</i>
	<i>Pars anterior</i>
β -MSH	Hipotalāms un citas smadzeņu struktūras
	Perifērie audi
AKTH	Virsnieru dziedzeris, kuņģis, resnā zarna un tievās zarnas, aknas, plaušas, olnīcas un liesa
α -MSH	Virsnieru dziedzeris, divpadsmitpirkstu zarna, sirds, tievās zarnas, aknas, plaušas, olnīcas, placenta, liesa, skeleta muskuļi, āda, muguras smadzenes, sēklinieki un vairogdziedzeris
γ -MSH	Virsnieru dziedzera garoza, sirds, nieres, olnīcas, kuņģis un asinsvadi

2.2. Melanokortīnu receptori

2.2.1. Melanokortīnu receptoru atklāšana

Pētot MSH peptīdus, tika atklāts, ka tiem piemīt ļoti plašs bioloģiskās aktivitātes spektrs. Tomēr pirms receptoru atklāšanas nebija iespējams izskaidrot to darbības mērķobjektus. 1992.gadā vienlaicīgi divas zinātnieku grupas – Zviedrijā un ASV – ziņoja par pirmā apakštipa (MKR1) atklāšanu (Chhajlani and Wikberg, 1992; Mountjoy *et al.*, 1992). Tas bija sākums piecu MKR saimes (MK1-5R) atklāšanai. Pielietojot molekulārās klonēšanas metodes, 1993. gadā tika identificēti vēl trīs garākie MKR apakštipi – MKR3, MKR4 un MKR5 (Chhajlani *et al.*, 1993; Gantz *et al.*, 1993a; Gantz *et al.*, 1993b). MKR2 tika klonēts vienlaicīgi ar MKR1 (Mountjoy *et al.*, 1992). Tika noskaidrots, ka MKRs pieder ar G proteīnu saistīto receptoru ģimenei, kuras receptoriem raksturīgi 7 transmembrānu (TM) rajoni, un tie iekļauti rodopsīniem līdzīgajā grupā (A klase).

Ar G proteīnu saistītie receptori nosaukti pēc to spējas saistīties ar guanidīna nukleotīdiem. G proteīna neaktīvā forma ir trimērs, kas piesaistījies pie guanozīndifosfāta (GDF). Pēc liganda saistīšanās receptors dod signālu G proteīnam,

un tā rezultātā GDF tiek aizvietots ar guanozīntrifosfātu (GTF). Tad G proteīns disociē vienā GTF apakšvienībā un dimērā. G proteīna funkcijas ir atkarīgas no spējas disociēt monomērā alfa un dimērā, kas apvieno beta un gamma apakšvienības. Alfa vienības ir atšķirīgas pēc struktūras, un mūsdienās ir atklātas jau 26 dažādas alfa vienības. Ir zināmas arī 5 beta un 11 gamma vienību struktūras. Kā trimērs G proteīns ir neaktīvs, jo GDF ir piesaistīts pie tā alfa vienības. Pēc liganda piesaistīšanās GDF atdalās no alfa vienības. Tā kā GTF koncentrācija šūnā ir lielāka par GDF, tad GTF konkurē uz brīvo vietu un tūlīt piesaistās G proteīnam. GTF piesaistīšanās izraisa alfa vienības disociāciju no kompleksa. Beta/gamma dimērs aktivē adenilciklāzi - enzīmu, kurš izraisa cikliskā adenozinmonofostāta (cAMF) veidošanās pieaugumu. Gan monomērs, gan dimērs darbojas tālāk uz savu mērķobjektu membrānā vai citozolā. Šo notikumu ķēde bieži stimulē cAMF veidošanos. cAMF ir šo receptoru sekundārā signālpārneses molekula. Alfa daļai pašai ir GTF-āzes aktivitāte, un tā lēni hidrolizē GTF atpakaļ par GDF. Kad tas ir noticis, tad alfa vienība reasociējas pie beta/gamma dimēra, un receptors pāriet neaktivētā formā (Wikberg, 1999; Wikberg *et al.*, 2000). Receptors pēc aktivēta G proteīna atbrīvošanās saistās ar citu neaktīvu trimēru, kas ir izveidojies šūnā, un cikls sākas no jauna. Liganda-receptora komplekss īsā laikā var aktivēt daudzas G proteīna molekulas. Tādējādi liganda signāls tiek daudzkārtīgi palielināts.

G proteīnu darbība ir daudzveidīga. Tos sagrupē grupās pēc tālākā signāla. Piemēram, Gs stimulē cAMF veidošanos, Gt – cGMF veidošanos. Citos gadījumos beta/gamma dimērs ir aktīvā daļa, citos abas - gan alfa, gan dimērs – iedarbojas uz efektoru. Kopīgs ir tas, ka visi G proteīni aktivē enzīmus, kuri stimulē sekundāro signālmolekulu sintēzi, vai piesaistās pie receptoriem, kuri atver jonu kanālus, vai iedarbojas uz citiem receptoriem.

Ar G proteīnu saistīto receptoru saime ir ļoti liela, un tie tiek grupēti vēl citās kategorijās – ģimenēs.

MKR ir tik mazu gēnu produkti, ka zinātnieki pat uzskata, ka MKR ir līdz šim vismazākie zināmie ar G proteīnu saistītie receptori. Cilvēka MKR1, MKR1, MKR3, MKR4 un MKR5 receptoru proteīnu sekvences ir, attiecīgi, 317, 297, 361, 333 un 325 aminoskābju atlikumu garumā. MKR ir raksturīgi īsi N gala (25-39 aminoskābes) un C gala (17-21 aminoskābes) rajoni, kā arī ļoti īsa otrā ekstracelulārā cilpa

(9 aminoskābes). Visiem MK receptoriem C galā ir vairāki Cys atlikumi, kam varētu būt nozīme taukskābju piesaistīšanā, kuras tālāk nodrošina receptoru nostiprināšanos šūnas plazmātiskajā membrānā (Tatro, 1996; Wikberg, 1999). Visiem MKR subtipiem N gala domēnos ir vairākas potenciālās N glikozilēšanās vietas.

MK receptoriem ir liela aminoskābju ķēdītes līdzība savā starpā (2.tabula). MKR3, MKR4 un MKR5 aminoskābju secība 55-61% ir identiska, visvājāko radniecību (43-46%) uzrāda MKR1 un MKR2 receptori. Visi MK receptori saistās ar G proteīna Gs subvienību, stimulē adenilcikliāzi un līdz ar to cAMP veidošanos.

2. tabula. Aminoskābju sekvenču līdzība (%) pieciem klonētajiem cilvēka melanokortīnu receptoriem (Schiöth *et al.*, 1995; Schiöth *et al.*, 1996b)

	MC1R	MC2R	MC3R	MC4R	MC5R
MC1R	100	38	45	47	44
MC2R		100	42	46	44
MC3R			100	42	57
MC4R				100	60
MC5R					100

2.2.2. MKR lokalizācija un fizioloģiskā loma

Pēc receptoru klonēšanas plaši tika izvērsti receptoru lokalizācijas pētījumi. Izmantojot poliklonālās un monoklonālās antivielas pret katru receptoru, tika noteikta MKR izplatība organismā. Atklājās, ka MKR4 galvenokārt ir lokalizēts smadzenēs, toties MKR1 smadzenēs ir sastopams tikai *periaqueductal gray* rajonā (Xia *et al.*, 1995a). MKR3 un MKR5 ir atrodami gan smadzenēs, gan perifērijā. MKR2 ir AKTH receptors, kurš ir lokalizēts tikai virsnierēs un nedaudz taukaudos (Catania *et al.*, 2004).

3.tabula. MKR apaštipu izplatība audos

MK receptors	Audi un orgāni
MKR1	Melanocīti, melanoma, imūnās sistēmas šūnas, smadzeņu atsevišķas struktūras, taukaudi, <i>testis</i>
MKR2	Virsnieres, taukaudi
MKR3	Smadzenes, placenta, <i>duodenum</i> , aizkuņģa dziedzeris, kuņģis, sirds, makrofāgi
MKR4	Smadzenes
MKR5	Smadzenes, āda, virsnieres, liesa, aizkrūts dziedzeris, <i>testis</i> , olnīcas, muskuļi, plaušas, taukaudi, aknas, kaulu smadzenes, dzemde, kuņģis un vairogdziedzeris

Noskaidrotā MKR lokalizācija papildināja MK peptīdu jau zināmās un potenciālās darbības uzskaitījumu, ko apstiprināja vai atklāja bez MKR gēnu (*knock-out*) peļu pētījumi (Catania *et al.*, 2004).

Melanokortīnu regulētie fizioloģiskie efekti, kas tiek realizēti ar MKR starpniecību (Blabock *et al.*, 1985; Catania and Lipton, 1998; Boston, 1999; Wong *et al.*, 1997; Wikberg *et al.*, 2000; Catania *et al.*, 2004; Ichiyama *et al.*, 1999):

- pigmentācija
- motivācija, atmiņa, spēja mācīties
- uzvedības reakcijas
- iekaisums
- sāpes
- ķermeņa temperatūra
- asinsspiediens, asinsvadu tonuss, asins plūsma
- nervu augšana
- sebuma sekrētu un feromonu sekrēcija
- asins glikozes līmenis
- pārtikas uzņemšana
- erekcija un seksuālā uzvedība

Šie jaunākie atklājumi parāda MKR lomu un norāda mērķobjektus jaunu zāļu pētījumiem.

Salīdzinājumam 4. tabulā parādīti MSH peptīdu fizioloģiskie efekti, kas bija zināmi pirms receptoru klonēšanas un līdz pagājušā gadsimta deviņdesmitajiem gadiem netika skaidroti ar MK saistīšanos pie receptoriem afinitāti un selektivitāti.

4. tabula. Melanokortīnu izraisītie fizioloģiskie efekti (Eberle, 1988)

MSH peptīdi	Mērķobjekts	Fizioloģiskie efekti
α -MSH	Āda	Stimulē melanoģenēzi melanocītos
α -MSH	Adenohipofīze	Inhibē prolaktīna izdalīšanos Modulē LH izdalīšanos Stimulē hGH izdalīšanos
α -MSH,	Tauku dziedzeri	Stimulē ādas tauku sekrēciju
α -MSH, β -MSH	Adipocīti (trušiem)	Stimulē lipolīzi
α -MSH, β -MSH γ_3 -MSH	Virsnieru garoza	Stimulē aldosterona sekrēciju Modulē AKTH efektus
α -MSH β -MSH	Imūnā sistēma	Inhibē IL-1 ierosinātās imūnreakcijas (pretiekaisuma īpašības)
α -MSH, γ -MSH	Sirds un asinsvadi	Pastiprina sirds kontrakcijas Paaugstina asinsspiedienu
α -MSH, γ_2 -MSH	Nieres	Palielina nātrijurēzi
α -MSH	Acis	Stimulē gaismas caurlaidības izmaiņas

2.2.3. Receptoru dimēri

Agrāk uzskatīja, ka ar G proteīnu saistītie receptori funkcionē tikai kā monomēri. Tomēr jaunākie atklājumi liecina, ka ar G proteīnu saistītie receptori var veidot dimērus vai lielus oligomērus (Milligan, 2004). Dimēru veidošanās var notikt starp radniecīgiem receptoriem (heterodimerizācija) vai viena tipa receptoriem (homodimerizācija). Dimerizācija starp MKR1 un MKR3 tika pierādīta pavisam nesen

(Mandrika *et al.*, 2005). Atklāts, ka MKR1 un MKR3 receptori regulē imūnās sistēmas reakcijas un bieži ir lokalizēti uz vienām un tām pašām šūnām (Wikberg *et al.*, 2000; Catania *et al.*, 2004), kur to tuvais novietojums pieļauj heterodimēru veidošanos. Pētījumi par MKR4 homodimerizāciju jeb spēju savstarpēji veidot dimērus atklāja jaunus faktus. Tā tika pierādīts, ka funkcionāli neaktīvi mutanti spēj dimerizēties ar normāli funkcionējošu receptoru un nomākt tā aktivitāti. Neaktīvo receptoru mutantu nefunkcionēšanas dēļ klīnikā nonākušajam pacientam novēroja smagu aptaukošanos (Biebermann *et al.*, 2003). Pārbaudot ligandu saistīšanos ar receptoru dimēriem, atklājās, ka MKR1 un MKR3 dimēri saista ligandus tāpat kā monomēri (Mandrika *et al.*, 2005). Katram receptoram ir tikai viena liganda saistīšanas vieta. Iespējams, ka dimēriem ir loma receptoru internalizācijā vai saišu veidošanā starp citiem receptoriem, pārslēdzot signālpārnesi pa dažādiem signālceļiem (Jordan and Devi, 1999).

2.2.4. MKR apakštipu fizioloģiskās lomas raksturojums

2.2.4.1. Pirmais apakštips (MKR1)

MKR1 tika atklāts pigmentšūnu ļaundabīgā audzēja jeb melanomas šūnās (Mountjoy *et al.*, 1992; Chhajlani and Wikberg, 1992), un vēlāk tika pierādīts, ka situācijā, kad normāli funkcionējošie melanocīti pārveidojas par ļaundabīgās melanomas šūnām, MKR1 ekspresijas līmenis vidēji pieaug 10 līdz 20 reizes (Loir *et al.*, 1999; Beyer *et al.*, 1990). MKR1 kodējošais reģions satur būtisku vienkāršu nukleotīdu polimorfismu (SNP's), kā rezultātā veidojas fenotipiskas matu un ādas pigmentācijas variācijas. Atsevišķas MKR1 mutācijas ir saistītas ar paaugstinātu melanomas rašanās risku (Wikberg *et al.*, 2000). Ar imunohistoķīmijas metodi, izmantojot MKR1 antivielas, tika atklāta MKR1 lokalizācija melanocītos un citās ādas šūnās. Vesela pieauguša cilvēka ādā MKR1 tika atrasts mata folikula epitēlijā, sebocītos un sviedru dziedzera kanāla epitēlijā (Bohm *et al.*, 1999). Šim receptoram ir nozīme ādas pigmentācijas un dzīvnieku apmatojuma krāsas veidošanās procesos. Mūsdienās ir klonēts daudzu zīdītāju (piemēram, grauzēju, govju) un nezīdītāju (putnu) sugu MKR1 (Wikberg, 1999). MKR1 ekspresija tika noteikta arī Leidiga šūnās sēkliniekos, *corpus luteum* luteīna šūnās un placentas trofoblastiskās šūnās (Wikberg *et al.*, 2000), makrofāgos un monocītos (Hartmeyer *et al.*, 1997), neitrofilos (Catania *et al.*, 1996; Chiao *et al.*, 1998), endotēlija šūnās, fibroblastos (Boston and Cone, 1996),

keratinocītos (Luger *et al.*, 1997) un mikroglijas šūnu tipos (Wong *et al.*, 1997). MKR1 atrašanās uz imūnās sistēmas šūnām pēdējā laikā ir pievērsusi īpašu uzmanību saistībā ar šī receptora funkcionālo lomu iekaisuma procesos un MSH peptīdu pretiekaisuma darbību. Izmantojot peļu makrofāgu šūnu līniju RAW264.7, kura ekspresē MKR1, tika pierādīta α -MSH peptīda un tā fragmentu pretiekaisuma darbība (Mandrika *et al.*, 2001).

Izmantojot *in situ* hibridizācijas metodi, MKR1 ekspresija smadzenēs tika atklāta tikai smadzeņu garozas pelēkās vielas neironos (Xia *et al.*, 1995) un hipofīzē (Chhajlani, 1996), taču netika konstatēta citos smadzeņu rajonos. Tādējādi tiek pieņemts, ka MKR1 nav nozīmīgas ietekmes uz CNS funkcijām. MKR1 saistās ar α , β un γ -MSH peptīdiem, taču MKR1 un α -MSH mijiedarbība tiek uzskatīta par noteicošo ādas pigmentācijas un melanomas veidošanās procesos.

2.2.4.2. Otrais apakštips (MKR2)

MKR2 tiek saukts arī par AKTH receptoru, jo citi MSH peptīdi nesaistās pie šī receptora (Schiöth *et al.*, 1996a). Saistoties ar MKR2 subtipu, AKTH regulē steroidogēnēzi virsnierēs (Hruby *et al.*, 1995). Dabiska MKR2 gēna mutācija varētu būt saistīta ar glikokortikoīdu nepietiekamību (Weber *et al.*, 1993). Vislielākā MKR2 ekspresija atrasta virsnieru garozā, lielākoties *zona glomerulosa* un *zona fasciculata*, kā arī dažās izkaisītās šūnās virsnieru *medulārajā daļā*, un peļu, bet ne cilvēku taukaudos (Chhajlani, 1996; Boston, 1999), kur šis receptora subtips varētu būt iesaistīts stresa izraisītā lipolīzē, ko mediē no hipofīzes izdalītais AKTH. Taču MKR2 nav atrasts hipofīzē un hipotalāmā (Xia and Wikberg, 1996a). Cāļiem atrasta MKR2 ekspresija gan liesā, gan virsnieru dziedzerī, kas norāda, ka putnu receptoriem salīdzinājumā ar zīdītāju receptoriem ir papildu funkcijas. (Takeuchi *et al.*, 1998; Takeuchi and Takahashi, 1998). MKR2 mRNS noteikta arī cilvēka ādā, tādējādi norādot uz šī receptora subtipa un kortikotropīna iespējamu jaunu lomu ādas fizioloģijā (Slominski *et al.*, 1996).

Tā kā šis receptors ir atšķirīgs ligandu saistīšanas ziņā no pārējiem MK receptoriem (Schiöth *et al.*, 1996a), tad šajā darbā aprakstītajos pētījumos tas nav iekļauts.

2.2.4.3. Trešais apakštips (MKR3)

1993. gadā MKR3 tika identificēts, klonēts un ar RT-PCR metodi atrasts smadzeņu, placentas un zarnu audos (Gantz *et al.*, 1993a). Šis receptora subtips dominējoši ekspresējas gandrīz visās CNS struktūrās (Gantz *et al.*, 1993a; Xia and Wikberg, 1997). Relatīvi augsts MKR3 blīvums ir smadzeņu struktūrās, kuras pieder mezolimbiskai dopamīnerģiskai sistēmai. Šī dopamīnerģiskā sistēma piedalās atalgojuma procesu regulācijā, tādējādi MKR3 pētījumi saista MK-erģisko sistēmu ar atkarības veidošanās procesiem (Lindblom *et al.*, 1998; Jansone *et al.*, 2004a). Tomēr nav izslēgta arī MKR4 ietekme, jo tieši MKR4 selektīvs antagonists HS131 bloķēja α -MSH izraisīto dopamīna un tā metabolīta līmeņu pieaugumu mezolimbiskajā sistēmā (Lindblom *et al.*, 2001). Radioligandu saistīšanās pētījumos noteikts, ka pie MKR3 ar visaugstāko afinitāti saistās γ_1 un γ_2 -MSH peptīdi (Schiöth *et al.*, 1995; Schiöth *et al.*, 1996b).

Veicot smadzeņu akūta iekaisuma eksperimentu sēriju, tika pierādīta MKR3 galvenā loma MSH peptīdu pretiekaisuma darbībā (Getting *et al.*, 1999; Muceniece *et al.*, 2004; Muceniece *et al.*, 2005; Muceniece *et al.* 2006). Ir pierādīta MSH peptīdu loma iekaisuma procesu regulācijā un noskaidrots atslēgas posms to pretiekaisuma darbībai. Tas ir: NF-kappaB translokācijas uz šūnas kodolu inhibīcija un sekojošas inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes (iNOS jeb NOS II) ekspresijas samazināšana (Muceniece *et al.*, 2004; Mandrika *et al.*, 2001). Miera stāvoklī šūnu citoplazmā atrodas kappaB proteīni kompleksā ar inhibitoro proteīnu (IkappaB). Saņemot signālu, IkappaB disociē no kompleksa kā atbilde uz proteīna fosforilēšanu un degradējas. Atbrīvotais dimērs NF-kappaB translocējas uz kodolu un aktivē specifiskus gēnus (Mandrika *et al.*, 2001). NF-kappaB tiek aktivēts, šūnai reaģējot uz mitogēniem, iekaisuma citokīniem un oksidatīvo stresu.

Pēc MKR3 vadošās lomas noskaidrošanas smadzeņu eksperimentālā iekaisuma laikā paplašinājās MKR3 selektīvo ligandu pētījumi, jo mūsdienās tieši MKR3 agonistiem tiek paredzēts jaunu pretiekaisuma zāļu potenciāls. Bez tam MKR3 tika atklāts arī uz imūnās sistēmas šūnām, kas parāda MKR3 lomu perifēro iekaisumu procesu regulācijā (Lipton *et al.*, 1998; Catania *et al.*, 2004).

Pēdējos gados tika atklāta MKR loma metabolisma un seksuālās uzvedības regulēšanā. Kaut gan tiek uzskatīts, ka noteicošā loma šajos procesos ir MKR4, tomēr

nav izlēgta arī MKR3 piedalīšanās signālpārnēsē, jo pre-erekcijas stāvoklī dzīvniekiem pieaug smadzeņu MKR3 blīvums (*upregulation*) (Wessells *et al.*, 1998; Argiolas, 1999; Argiolas *et al.*, 2000; Giulliano, 2004). Bez tam pētījumi parāda, ka anabolie androgēnie steroīdi izraisa hipotalāmā spēcīgu MKR3 blīvuma pieaugumu (Wikberg *et al.*, 2000). Ir izteikta hipotēze, ka žurku mātītēm seksuālo uzvedību nosaka MKR3 stimulācija (Nocetto *et al.*, 2004; Cragolini *et al.*, 2000).

Svara un ēšanas uzvedības regulācija notiek sadarbojoties abiem smadzeņu receptoriem MKR3 un MKR4 (Cone, 2006). Ar abu MKR gēnu defektiem (*knock-out*) ģenētiski modificētām pelēm ir novērotas svara un ēšanas paradumu izmaiņas. Īpaši daudzsološs ir atklājums, ka bez MKR3 gēna (*knock-out*) peles ir aptaukojušās, bet tām neattīstās II tipa diabēts, taču pelēm bez MKR4 gēna II tipa diabēts attīstās (Butler and Cone, 2003). Šo atklājumu varētu izmantot diabēta pētījumos.

2.2.4. 4. Ceturtais apakštips (MKR4)

MKR4 ekspresija ir pierādīta zīdītāju embrijā visā ontogēneses attīstības laikā (Kistler-Heer *et al.*, 1998). MKR4 ir plaši izplatīts CNS un pārstāvēts gandrīz katrā smadzeņu rajonā: galvas smadzeņu garozā, talāmā, hipotalāmā, hipokampā, smadzeņu stumbrā un muguras smadzenēs (Mountjoy *et al.*, 1994; Gantz *et al.*, 1993b). Izpētot cilvēka 20 orgānus, MKR4 ekspresija perifērajos audos netika konstatēta (Chhajlani, 1996). Tomēr ir pētījumi, kas parāda MKR4 iespējamo ekspresiju cilvēka adipocītos (Chagnon *et al.*, 1997). Saistību starp barības uzņemšanu un melanokortīnu receptoriem atklāja 1994. gadā, kad endogēnam *agouti* peptīdam atklāja antagonistisku iedarbību uz MKR4 (Lu *et al.*, 1994). Tomēr vispārliciecinākos pierādījumus 1997.gadā sniedza pirmo reizi iegūtās MKR4 *knock-out* peles (Huszar *et al.*, 1997), kurām novēroja ļoti smagu aptaukošanos un ko apstiprināja visi tālākie pētījumi (Butler and Cone, 2002). Izrādījās, ka MKR4 trūkums pelēm izraisa tukluma sindromu, kas līdzīgs *agouti* tukluma sindromam (Huszar *et al.*, 1997). Atklājums, ka MKR4 ir nozīmīga loma barības uzņemšanas uzvedības kontrolē, veicinājis jaunu selektīvu MKR4 ligandu sintēzi un polimorfisma pētījumus plašās cilvēku populācijās (Lim *et al.*, 2000; Wikberg *et al.*, 2000; Catania *et al.*, 2004). MKR4 gēna kodējošā reģiona mutācijas ir saistītas ar dominējošām autosomāli iedzimtām smagām aptaukošanās formām (Fan *et*

al., 1997). Daudzie pētījumi norāda uz MKR4 agonistu iespējamo pielietojumu aptaukošanās ārstēšanā, savukārt MKR4 antagonisti varētu būt izmantojami anoreksijas ārstēšanai (Schiöth, 2000; Schiöth, 2001; Vergoni *et al.*, 1998).

Citi pētījumi norāda uz MKR4 varbūtējo lomu atkarības procesos (Alvaro *et al.*, 1996), jo hroniska morfīna vai kokaīna ievadīšana izraisa MKR4 ekspresijas inhibīciju smadzeņu rajonos, kas saistīti ar opiātu atkarību.

Daži pētījumi norāda uz MKR4 nozīmi kardiovaskulārās sistēmas regulācijā, jo α -MSH un AKTH izraisīto arteriālā spiediena paaugstinājumu iespējams inhibēt, intracerebroventrikulāri ievadot endogēno MKR4 antagonistu *agouti* signālpeptīdu (Dunbar and Lu, 1999; Guarini *et al.*, 1997; Guarini *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1996).

Iespējams, ka ar MKR4 līdzdalību tiek mediēts arī α -MSH neirotrofais efekts - bojātu perifēro nervu saaugšana. (Van der Kraan *et al.*, 1999).

Centrālajai MKR4 aktivēšanai ir būtiska loma luteinizējošā hormona un prolaktīna sekrēcijas regulēšanā (Wikberg *et al.*, 2000).

Galvenā īpatnība, kas atšķir MKR4 no pārējiem melanokortīnu receptoriem, ir tā ļoti zemā saistīšanās spēja ar γ -MSH peptīdiem, bet nedaudz augstāka affinitāte pret β -MSH salīdzinājumā ar α -MSH un AKTH (Schiöth *et al.*, 1996b).

2.2.4.5. Piektais apakštips (MKR5)

MKR5 ir plaši izplatīts perifērajos audos: virsnieru dziedzerī, taukaudos, aknās, nierēs, plaušās, limfmezglos, kaula smadzenēs, tīmusā, krūšu dziedzeros, sēkliniekos, olnīcās, dzemdē, kuņģī, ādā, liesā, zarnās, skeleta muskuļos, kā arī galvas un muguras smadzenēs (Chhajlani *et al.*, 1993; Labbe *et al.*, 1994). Pie tam skeleta muskuļos no visiem melanokortīnu receptoriem tika atklāts tikai MKR5 (Griffon *et al.*, 1994). MKR5 bagātīgi ekspresējas eksokrīno dziedzeru (asaru, prostatas, aizkuņģa dziedzera, Harderiana) audu sekretorajā epitēlijā. Tomēr, kamēr nebija iegūta bez MKR5 gēna (*knockout*) pele, šī proteīna funkcijas nevarēja noskaidrot. Ar MKR5 gēna deficīta peļu palīdzību tika atrasts, ka šis receptora subtips stimulē grauzēju tauku dziedzeru un feromonu izdalīšanos (Wikberg *et al.*, 2000). Vēlāk pierādīja, ka MKR5 trūkums samazina feromonu sekrēciju un uzbrūkošo agresivitāti (Morgan *et al.*, 2004a), bet stimulē aizsardzības uzvedību peļu tēviņiem (Morgan *et al.*, 2004b).

MKR5 saistās ar α -MSH, AKTH, β -MSH un γ -MSH līdzīgi kā MKR1, taču šī saistīšanās ir ar daudz zemāku afinitāti nekā šo peptīdu saistīšanās spēja ar citiem MKR (Schiöth *et al.*, 1996b). Jāatzīst, ka dažādos organisma audos MKR5 funkcijas joprojām paliek neskaidras. Ir dati par MKR5 gēna mutācijām, kas cilvēkiem izpaužas kā liekais svars (Chagnon *et al.*, 1997), bet selektīvu ligandu trūkums liedz eksperimentāli apliecināt MKR5 saistību ar svara regulāciju.

MKR plašā izplatība dažādos audos un atšķirīgā afinitāte attiecībā uz melanokortīnu peptīdiem liecina par MKR daudzveidīgo funkcionālo nozīmi organismā, un tās izziņai un noskaidrošanai joprojām nepieciešams veikt vēl daudz pētījumu.

2. 3. Dabīgie hormoni un sintētiskie peptīdi kā MKR ligandi

Pēc cilvēka receptoru klonēšanas sākās ļoti intensīvi selektīvu ligandu meklējumi. Lai pātrinātu iespējamo receptoru ligandu sintēzi, tika izmantotas ligandu–receptoru saistīšanās simulācijas metodes ar datorprogrammu palīdzību, teorētiskie ligandu–receptoru saistīšanās modeļi, vielu kombinatoriālās bibliotēkas, fāgu displejs un mutācijas receptoru struktūrā (Grieco *et al.*, 2002; Szardenings *et al.*, 1997; Szardenings *et al.*, 2000; Prusis *et al.*, 1997; Prusis *et al.*, 2001a; Prusis *et al.*, 2001b). Modelējot receptoru struktūru, tika izmantotas dažādas pieejas – punktveidīgās mutācijas un himēru receptori. Tika konstatēts, ka α -MSH piesaistei pie MKR1 ir būtiskas divas aminoskābes: trešā transmembrānu (TM) segmenta Asp¹¹⁷ (D117) un sestā TM segmenta His²⁶⁰ (H260) (Frändberg *et al.*, 1994; Frändberg, 1998). Bez tam uzskata, ka šīm aminoskābēm ir nozīme kopējās MKR struktūras uzturēšanā (Schiöth *et al.* 1997a; Schiöth *et al.*, 1997b).

Pirmie sintētiskie peptīdi līdzīgi dabīgajiem MSH peptīdiem bija lineāri. Viens no pirmajiem un joprojām visvairāk eksperimentos izmantotajiem lineārajiem sintētiskajiem peptīdiem ir NDP-MSH ([Nle⁴-D-Phe⁷] α -MSH jeb melanotāns-I. NDP-MSH uzrāda augstu saistīšanās afinitāti pret visiem MKRs. NDP-MSH plaši izmanto radioligandu saistīšanās pētījumos radiojodētas formas veidā (Schiöth *et al.*, 1995; Schiöth *et al.*, 1996a; Schiöth *et al.*, 1996b). Vēlāk secināja, ka lineārie MSH

peptīdi ir par kustīgiem, lai panāktu precīzu liganda saistīšanās vietas noteikšanu. Tādēļ tika sintezēta mazu, nekustīgu ciklisku MSH „serdes” peptīdu sērija, piemēram, [Cys⁴, Cys¹⁰]α-MSH(4-10), kuriem tika atklāta samērā zema afinitāte, bet tie ļāva izveidot liganda-receptoru saistīšanas vietas modeli (Prusis *et al.*, 1997; Prusis *et al.*, 2001a; Prusis *et al.*, 2001b). Izrādījās, ka augstu afinitāti var sasniegt ar cikliskiem laktāma peptīdiem, kuru molekulās būtisko četru aminoskābju farmakoforā (His-Phe-Arg-Trp) LPhe aizvieto ar DPhe. Viens no šiem peptīdiem, kas tiek plaši pielietots melanokortīnu fizioloģisko efektu izpētē, ir metaboliski stabils MKR neselektīvais agonists melanotāns-II jeb MTII (Hadley *et al.*, 1989; Muceniece *et al.*, 2007 In press; Wikberg *et al.*, 2000). Ar fāgu displeja metodi tika atrasts ļoti selektīvs MKR1 ligands – MS04, kura struktūru tālāk optimizējot, tika radīti MS05, MS06 un MS09 peptīdi (Szardenings *et al.*, 2000; Muceniece *et al.*, 2001). Selektīvākie peptīdi joprojām tiek izmantoti kā vielas analizatori un ir iekļauti peptīdus tirgojošo firmu katalogos (5.tabula).

5. tabula. Nozīmīgāko MKR ligandu struktūras (Schiöth, 2001; Wikberg, 2001)

Peptīdi	Ligandu struktūras
NDP-MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
MTII	Ac-Nle- <u>Asp</u> -His-D-Phe-Arg-Trp- <u>Lys</u> -NH ₂
MS05	Ser-Ser-Ile-Ile-Ser-His- L-Phe-Arg- L-Trp-Gly-Lys-Pro-Val- NH ₂
MS09	Ser-Ser-Ile-Ile-Ser-His- D-Phe-Arg- L-Trp-Gly-Lys-Pro-Val- NH ₂
RO27-3325	Butiril-His-Phe-Arg-Trp-N-methyl glycine- NH ₂
HS131	(cyclo (S-S)-Ac-L-Cys ⁵ -Gly ⁶ -D-Nal ⁷ -L-Cys-NH ₂ ¹⁰) α-MSH ⁵⁻¹⁰
HS014	Ac- <u>Cys</u> -Glu-His-D-Nal-Arg-L-Trp-Gly- <u>Cys</u> -Pro-Pro-Lys-Asp- NH ₂
SHU9119	Ac-Nle- <u>Asp</u> -His-D-Nal-Arg-Trp- <u>Lys</u> -NH ₂
HS024	Ac- <u>Cys</u> -Nle-Arg-His-D-Nal-Arg-Trp-Gly- <u>Cys</u> -NH ₂
HS028	Ac- <u>Cys</u> -Glu-His- <u>dCl</u> -D-Phe-Arg-Trp-Gly- <u>Cys</u> -Pro-Pro-Lys-Asp-NH ₂

Piezīme. Aminoskābju atlikumi, kas cikliskajos savienojumos veido gredzenus, tiek pasvītroti ar līniju. Nle, norleicīns; DNal, β-(-2-naftil)-Dalanīns; dCl-DPhe, 3,4-dihloro-Dfenilalanīns; DPhe, D-fenilalanīns; LPhe, L- fenilalanīns.

Lai gan ir atrasti selektīvi ligandi visiem receptoru apakštīpiem, lielākā daļa sintētisko peptīdu – līdzīgi kā dabīgie hormoni – vislabāk saistās pie MKR1 (6.tabula).

6. tabula. Dabīgo ligandu un sintētiskā analoga NDP-MSH saistīšanās ar MKR

(Schiöth *et al.*, 1995; Schiöth *et al.*, 1996c; Schiöth *et al.*, 1997a; Schiöth *et al.*, 1997b)

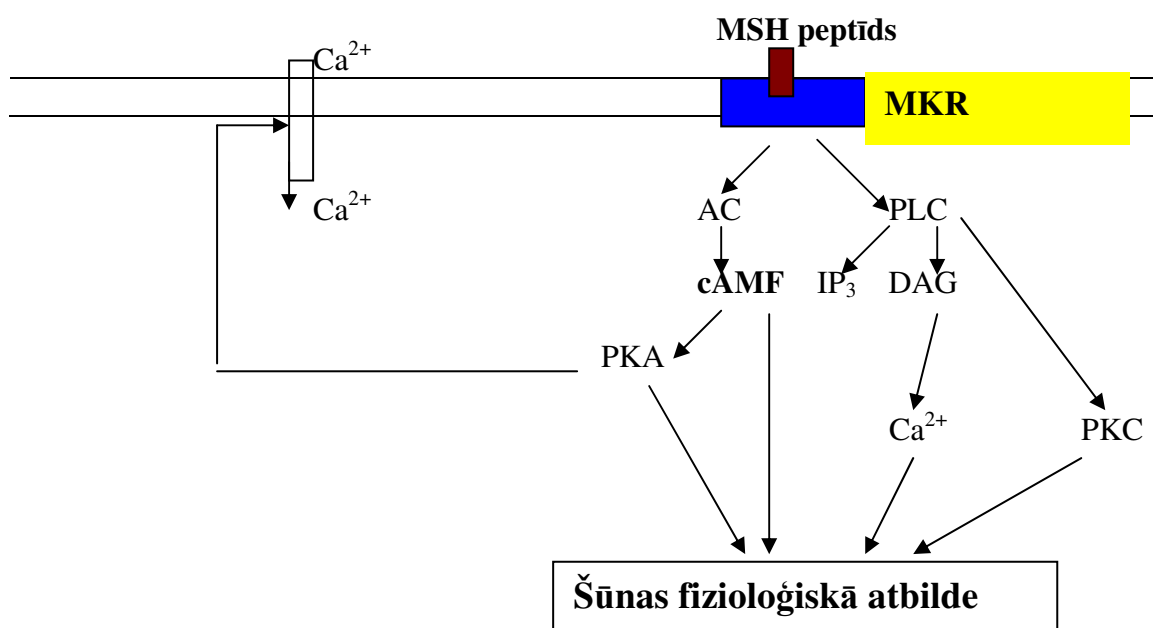
Melanokortīnu receptoru subtipi	MSH peptīdu saistīšanās tendence ar MKR subtipiem
MKR1	NDP-MSH> α -MSH> β -MSH> γ_1 -MSH
MKR2	AKTH
MKR3	NDP-MSH> γ_1 -MSH> γ_3 -MSH> β -MSH> γ_2 -MSH> α -MSH>AKTH
MKR4	NDP-MSH>> β -MSH> α -MSH>AKTH> γ_1 -MSH
MKR5	NDP-MSH>> α -MSH> β -MSH>AKTH> γ_1 -MSH

2.4. MKR ligandu agonistiskās un antagonistiskās darbības izvērtēšanas metodes

Visi pieci MKR pieder ar G proteīnu saistīto receptoru ģimenei, un to stimulācija aktivē adenilātciklāzi un regulē cAMP veidošanos (Cremer *et al.*, 1995; Wikberg *et al.*, 2000). Kaut arī cAMP sintēze nav vienīgais MKR signālpārneses ceļš, tieši cAMP līmeņa mērījumi tiek izmantoti, lai noteiktu, vai MKR ligands darbojas kā agonists vai antagonists. cAMP ir klasiska signālpārneses molekula, kurai ir CREB (*cAMP response element binding protein*) aktivācijas loma. Signāls tiek raidīts caur Ser/Thr kināzēm un proteīnkināzi A (PKA).

Sākotnēji plazmas membrānā G proteīna aktivācija izraisa adenilciklāzes aktivāciju, kam seko cAMP līmeņa pieaugums. cAMP izraisa regulatorās vienības (R) piesaistīšanos pie PKA un šis PKA-R komplekss tālāk izraisa katalītiskās (C) PKA-C apakšvienības atbrīvošanos, kura pasīvā transporta ceļā migrē uz kodolu. Katalītiskās vienības porcijas fosforilē mērķobjektus gan citozolā, gan kodolā. Beigu mērķis ir fosfotāze I, kura pārtrauc PKA darbību. Process notiek pēc atgriezeniskās saites principa (*feedback*). CREB ir viens no galvenajiem PKA kodola mērķiem. Gēnu transkripcijas ātrums ir proporcionāls fosforilētā CREB līmenim kodolā. Lēnā gēnu transkripcija, kā atbilde uz cAMP pieaugumu šūnā, ir izskaidrojama ar lēno ātrumu, ar kādu brīvā PKA-C vienība difūzē kodolā. Tipiski fosforilētā PKA-C vienība sasniedz

maksimālo līmeni kodolā 30 min pēc stimulācijas, bet defosforilācija notiek daudzu stundu garumā. Savukārt cAMF veidošanās notiek ātri, sasniedzot maksimumu 15 min laikā. Tomēr cAMF pieaugums šūnā kā atbildes reakcija uz šūnas stimulāciju ar MSH peptīdiem nav vienīgais signālpārneses ceļš. Ir dati, kuros ir parādīts MKR3 fosfoinozitola signāla pārneses ceļš, kura rezultātā veidojas inozitolfosfāts-3 (IP₃) (Konda *et al.*, 1994) (2. att.). Pievienojot cAMF antagonistus lielās koncentrācijās šūnu kultūrām pirms α-MSH vai AKTH pievienošanas, iespējams novērst IP₃ samazināšanos un intracelulārā Ca²⁺ līmeņa pieaugumu. Tādējādi MKR3 var būt saistīts ar divām sekundāro „mesendžeru” sistēmām: proteīnkināzes A PKA/cAMF un IP₃/Ca²⁺. IP₃/Ca²⁺ sistēmu kontrolē PKA, iesaistot to fosforilācijas regulēšanā (Wikberg *et al.*, 2000).



2. attēls. MKR signāla transdukcijas ceļš, ko ierosina melanokortīnu saistīšanās pie MKR (Gantz, 1993).

AC, adenilātciklāze; cAMF, cikliskais adenozinmonofosfāts; DAG, diacilglicerols; IP₃, inozitola 1,4,5-trifosfāts; MKR, melanokortīna receptors; PKA, proteīnkināze A; PKC, proteīnkināze C; PLC, fosfolipāze C.

MKR5 varētu būt saistīts arī ar Jak/STAT signāla transdukcijas ceļu (Buggy, 1998).

Vēlāk tika pierādīta MSH peptīdu ietekme uz slāpekļa oksīda (NO) producēšanos šūnās, kas atklāja nozīmīgu faktu, ka ne tikai pilnai molekulai α -MSH, bet arī tā C gala tripeptīdam – kaut arī tas nesaistās ar MKR – piemīt pretiekaisuma darbība un NO pārprodukcijas nomākuma spēja (Mandrika *et al.*, 2001; Star *et al.*, 1995). Tādējādi arī NO noteikšanas tests tika ieviests melanokortīnu mimētiķu pētījumos. Tā tika pierādīts, ka, piemēram, gan MS05, gan MS09 papildus cAMF stimulācijai spēj inhibēt iekaisuma mediatora NO produkciju makrofāgu šūnās (Szardenings *et al.*, 2000). Pētījumi parādījuši vēl vienu nozīmīgu faktu: ne vienmēr receptoru saistīšanās afinitāte korelē ar spēju stimulēt vai inhibēt signālpārneses mediatoru sintēzi vai darbību. Tā *in vivo* eksperimentos sintētiskajam MKR4 agonistam RO27-3325 (Benoit *et al.*, 2000) tika parādīta spēcīga ietekme uz ēšanas uzvedību, taču šis savienojums uzrādīja salīdzinoši zemu afinitāti pret cilvēka MKR4 (7.tabula) (Schiöth *et al.*, 1996b). Bez tam RO27-3325 uzrādīja tikai 40% no tās cAMF stimulācijas, ko izraisa α -MSH (Szardenings *et al.*, 2000).

7. tabula. Sintezēto MKR agonistu un antagonistu salīdzinošās saistīšanās afinitātes (K_i , nM) ar cilvēka MKR1, MKR3, MKR4 un MKR5 (Wikberg *et al.*, 2000)

	MKR1	MKR3	MKR4	MKR5
Agonisti				
NDP-MSH	0.085	0.40	3.8	5.1
Melanotan-II	0.67	34	6.6	46
MS05	0.87	1100	>100 000	>100 000
MS09	0.16	6.5	46	270
RO27-3325	33 000	340 000	250 000	>300 000
Antagonisti				
SHU9119	0.71	1.2	0.36	1.1
HS014	110	54	3.2	690
HS024	19	5.5	0.29	3.3

Pēdējā laikā sintezēti dažādi MKR antagonisti. Viens no pirmajiem sintezētajiem MKR antagonistiem bija cikliskais MSH peptīdu analogs SHU9119, kurš darbojas gan kā neselektīvais MKR3/MKR4 antagonists, gan daļējs agonists attiecībā pret MKR1 un MKR5 (Hruby *et al.*, 1995). Tā kā SHU9119 neuzrāda selektivitāti ne pret vienu MKR, tā pielietošana eksperimentālos pētījumos MKR klasifikācijai ir ierobežota.

Tālākie ciklisko peptīdu pētījumi atklāja pirmo selektīvo MKR4 antagonistu HS014 (Schiöth *et al.*, 1998a; Schiöth *et al.*, 1998b). Taču tas – līdzīgi kā SHU9119 – darbojas arī kā MKR1 un MKR5 parciālais agonists un uzrāda antagonistiskas īpašības pret MKR3 (Schiöth *et al.*, 1999). Žurkām intracisternāla SHU9119 un HS014 ievadīšana izraisa apetītes un ķermeņa masas palielināšanos (Kask *et al.*, 1998; Kask *et al.*, 1999; Kask *et al.*, 2000). MKR4 antagonists HS014 bloķē leptīna izraisīto ķermeņa svara samazināšanās efektu eksperimentālajiem dzīvniekiem. Cits ciklisks melanokortīnu peptīdu analogs ir HS024, kas atšķirībā no HS014 uzrāda apmēram 10 reizes labāku saistīšanos ar MKR4 (7. tabula). Diemžēl, HS024 darbojas kā antagonists pret visiem MKR. Intracerebroventrikulāri ievadot HS024, tas izraisa no devas atkarīgu barības patēriņa palielināšanos žurkām (Kask *et al.*, 1998; Kask *et al.*, 2000). Nesen sintezētie MKRs ligandi tiek izmantoti eksperimentālos pētījumos kā MSH peptīdu modeļanalogi. 2002. un 2003. gadā tika sintezēti vairāki selektīvi MKR3 un MKR4 agonisti un antagonisti (Grieco *et al.*, 2002; Kavarana *et al.*, 2002; Balse-Srinivasan *et al.*, 2003), kuri papildina komerciāli pieejamo peptīdu klāstu.

Tādējādi kopš receptoru klonēšanas ir sintezēts un eksperimentāli pārbaudīts liels skaits lineāru un ciklisku MSH peptīdu analogu. Šobrīd intensīvi tiek meklēti jauni selektīvi nepeptīdu ligandi. Interesanti ir dati par 1,4-dihidropiridīnu savienojumu cerebrokrastu, kas ir uzrādījis afinitāti tikai pret MKR4 (Jansone *et al.*, 2004b), norādot, ka dihidropiridīnu struktūra varētu optimāli atbilst MKR4 saistīšanās vietām. Cita maza molekula THIQ (Sebhat *et al.*, 2002) arī uzrādīja ļoti augstu selektivitāti un afinitāti pret MKR4, tomēr *in vivo* pretiekaisuma un ēšanas uzvedības ietekmēšanas efektivitātes ziņā atpalika no MT-II (Cepoi *et al.*, 2004; Muceniece *et al.*, 2007 In press).

Kaut gan ir liels publikāciju skaits un paveikts intensīvs pētniecības darbs, tikai neliels skaits MKR mimētiķu ir nonākuši līdz klīniskajiem pētījumiem. Tie ir trīs peptīdi. MT-II un PT-141 tiek klīnikā pārbaudīts pret erekcijas traucējumiem, savukārt MT-I kā pigmentācijas veicināšanas līdzeklis (Hadley and Dorr, 2006).

2.5. α -MSH C gala tripeptīds un tā analogi

Melanokortīnu degradācija joprojām nav līdz galam izpētīta. Ir zināms, ka audos esošās POMK konvertāzes nosaka MSH peptīdu rašanos, bet peptidāžu, kas sašķeļ MSH peptīdus, *in situ* ietekme nav īpaši pētīta. Žurku asins paraugos α -MSH

sadalīšanās ātrums ir vienāds gan endogēnajiem, gan sintētiskajiem peptīdiem. MSH peptīdu pussabrukšanas laiks ir atkarīgs no temperatūras svārstībām: 37°C inkubētiem paraugiem tas ir 39 min, bet uz ledu inkubētiem paraugiem 54 min (Wilson *et al.*, 1982). Sevišķi nenoturīga ir α -MSH Phe⁷-Arg⁸ saite, kas tiek uzskatīta par primāro šķelšanās vietu. Pārraujot Phe⁷-Arg⁸ saiti, eksopeptidāzes sadala fragmentus brīvās aminoskābēs.

Aprakstīti atsevišķi *in vitro* α -MSH metabolisma pētījumi, bet tajos nav parādīta C gala tripeptīda endogēnā veidošanās. Tomēr, neraugoties uz nepierādīto endogēno izcelsmi, tripeptīds Lys-Pro-Val-NH₂ tiek pētīts paralēli pilnai α -MSH molekulai tā spēcīgās pretiekaisuma darbības dēļ. MSH11-13 līdzīgi kā α -MSH inhibē kodola transkripcijas NF- κ B nonākšanu šūnas kodolā, inducējamās NO sintāzes (iNOS) ekspresiju un NO producēšanos (Mandrika *et al.*, 2001).

Ņemot vērā NDP-MSH augsto afinitāti, ideja aizvietot L aminoskābes ar D aminoskābēm ir tikusi izmantota arī MSH11-13 analoģu sintēzē. Izrādījās, ka sintētiskie MSH11-13 analogi ar DPro vai DVal bija farmakoloģiski aktīvāki par MSH11-13 (Moustafa *et al.* 2002; Haddad *et al.* 2001; Uehara *et al.* 1993; Hiltz *et al.* 1991; Lipton and Catania 1997). Nesen tika pierādīta MSH11-13 un tā analoģu pretsēņu darbība (Catania *et al.* 2005) un uz polistirēna lodītēm imobilizēta MSH11-13 spēja inhibēt audzēju nekrozes faktora α (TNF α) stimulēto NF- κ B aktivitāti (Kelly *et al.* 2005). MSH11-13 līdzīgi kā pilna hormona molekula pēc centrālas vai perifēras ievadīšanas samazina endotoksīnu (lipopolisaharīdu), interleikīnu IL-1, IL-6 vai TNF α izraisīto temperatūras paaugstināšanos (Lipton and Catania, 1998), samazina arī išēmijas/reperfūzijas šūnas bojājumus pēc išēmijas un inhibē neitrofilu uzkrāšanos, kā arī NO produkciju (Chiao *et al.*, 1998).

Neskaidrību un pretrunīgu datu par MSH11-13 darbības mehānismu ir daudz. Neskaidra joprojām ir iedarbība uz MKR. Pētījumā ar MKR1 receptora gēnu transfektētām CHO šūnām MSH11-13 stimulēja intracelulāro kalcija jonu līmeni tajās, bet neiedarbojās uz netransfektētām šūnām (*wild type*) (Elliot *et al.* 2004), tā netieši norādot uz saistību ar MKR1 signālceļiem. Tomēr šīs saistības mehānisms ir joprojām neskaidrs, jo radioligandu saistīšanās testā nav pierādīta MSH11-13 saistīšanās pie MKR.

2.6. MKR pētījumos lietotās šūnu līnijas

MKR1 ir atrasti uz vairākām melanomas šūnu līnijām un kopā ar MKR3 uz imūnās sistēmas šūnām. Tomēr uz šādām šūnām receptoru blīvums nav liels, tāpēc radioligandu eksperimentos vajag lielu daudzumu šūnu, un vielu skrīninga izmaksas pieaug. Bez tam līdz šim nav atklātas dabīgas šūnu līnijas ar MKR4 un MKR5 receptoriem. Tāpēc tiek meklētas citas metodes, piemēram, šūnu transfekcija. Ar šūnu transfekciju saprot šūnu apstrādi ar attiecīgā receptora gēnu fragmentu – kurš tieši ir atbildīgs par receptora proteīna aminoskābju sekvenci – iestrādātu ekspresijas vektorā. Tā saucamo DNS konstruktus (attiecīgā gēna DNS ligēta ekspresijas vektorā) iestrādā liposomās, lai šūnas to vieglāk uzņemtu. Ne visas šūnas uzņem svešo DNS un producē svešo proteīnu. Tomēr, šūnām daloties, vajadzīgo šūnu skaits trīs dienu laikā pieaug un ir izmantojams eksperimentos. Ja dabīgām šūnu līnijām receptoru skaits uz šūnu ir 1000-7000, tad transfektētām šūnām tas sasniedz 100000–1000000 receptoru uz šūnu. Tādējādi iespēja transfektēt šūnas ar attiecīgā receptora DNS konstruktus dod iespēju efektīvi pārbaudīt daudzu ligandu afinitāti un selektivitāti. Sākotnēji eksperimentos tika izmantotas šūnu līnijas, kurās nav MKR - COS-1 un COS-7, CHO, HEK293 un HeLa (Kapas *et al.*, 1996; Schiöth *et al.*, 1995; Schiöth *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2005; Chai *et al.*, 2007. Uz šo šūnu pamata ir izveidotas stabilās šūnu līnijas, kuras producē MKR daudzās paaudzēs. Transfektētās šūnas ir iespējams izmantot arī sekundāro signālpārneses molekulu, piemēram, cAMF, IP₃, kalcija jonu u.c. mērījumiem, lai noteiktu, vai viela darbojas kā agonists vai antagonists. Nepārveidotās šūnas tiek izmantotas kā kontroles šūnas.

Vēl veiksmīgāku vielu skrīningu nodrošināja insektu šūnu pārveidošanas metodes izstrādāšana. Insektu šūnu Sf9 un Sf21 līnijas tiek inficētas ar receptoru DNS nesošiem bakulovīrusiem. Ekspresijas vektorā ielikta DNS vēl papildus tiek iestrādāta bakulovīrusa molekulā. Šādi modificēts bakulovīruss, inficējot šūnas, tajās ievieto savu DNS kopā ar svešo DNS (*insert*) konstruktus. Jaunā tehnoloģija ir vēl lētāka par zīdītāju šūnu transfektēšanu un pieļauj liela mēroga vielu skrīningu, izmantojot robotus. Arī MKR tika radīti bakulovīrusu konstrukti, ar kuriem inficētas Sf9 šūnas uzrādīja MSH peptīdiem atbilstošas ligandu saistīšanās afinitātes (Schiöth *et al.*, 1996c).

Tomēr specifisku funkciju pētījumiem noder šūnas, kuras dabīgi ekspresē MKRs. Lai pētītu MK ietekmi uz cAMF producēšanos un pigmentāciju plaši tiek izmantota peļu melanomas šūnu līnija B16-F1. B16-F1 šūnas satur daudz pigmenta melanīna. Tāpēc mikroskopā šīm šūnām var novērot melnu krāsojumu. Pagājušā gadsimta sešdesmito gadu pētījumi parādīja, ka α -MSH peptīds spēlē būtisku lomu ādas pigmentācijas intensitātes palielināšanā cilvēkiem (Eberle, 1988). α -MSH un AKTH sintezējas cilvēka epidermā kā atbildes reakcija ultravioletās radiācijas ietekmei. Neilgi pēc MKR1 subtipa klonēšanas parādījās publikācijas, kurās parādīts, ka MKR1 gēns kontrolē zīdītāju apmatojuma krāsu. Populāciju pētījumi atklājuši vairāk nekā 20 alēļu MKR1 gēna variantus. MKR1 aktivācija stimulē cAMF veidošanos, tālāk notiek pigmentācijas enzīmu (ieskaitot tirozināzi) iesaistīšanās un melanīna veidošanās. MKR1 ir arī liela nozīme eumelanīna (melns/brūns) un faeomelanīna (sarkans/dzeltens) pigmentācijas veidošanās regulācijā zīdītāju melanocītos (Schiöth *et al.*, 1999). α -MSH citu sinerģētisku mitogēnu faktoru klātienē darbojas kā normālu melanocītu augšanas stimulators. Tādējādi MSH peptīdiem, darbojoties kopā ar citiem faktoriem, ir būtiska nozīme melanocītu šūnu proliferācijas procesos *in vivo* (Halaban, 2000). Melanocītu ļaundabīgā pārveidošanās par melanomu izraisa augšanas autonomiju, kā arī ir saistīta ar neskaitāmu augšanas faktoru un receptoru veidošanos audzēja šūnās. Melanomas audzēja šūnās konstatēts augsts α -MSH imunoreaktivitātes līmenis, un melanoma šūnu līnijas ekspresē 20 reizes augstāku MKR1 mRNS salīdzinājumā ar normālo melanocītu aktivitāti (Loir *et al.*, 1997).

B16-F1 šūnas izmanto arī pretmelanomas vielu pētīšanai un vakcīnu izstrādāšanai, pagaidām gan vakcīnas pētījumi notiek tikai ar pelēm (Wu *et al.*, 2007).

Melanokortīni var veidoties no POMK ne tikai hipofīzē, bet arī imūnajās šūnās un līdz ar to var piedalīties imūnās sistēmas regulācijā. Paaugstināts α -MSH līmenis asins plazmā atrasts AIDS un sepses pacientiem (Airaghi *et al.*, 1999; Catania *et al.*, 2000). Imunokompetentās šūnas producē no POMK veidojošos peptīdus kā atbildes reakciju uz nekognitīvu (bakteriālu, virālu) stimulu. Makrocīti, monocīti un tuklās šūnas arī producē α -MSH. Melanokortīnu peptīdi būtiski inhibē NO un TNF α izdalīšanos no mikroglijas šūnām. Tādējādi ir pierādīts, ka dažādas šūnu līnijas var izmantot ar iekaisumu saistīto MK efektu pētījumos. Peļu makrofāgu šūnu līnija RAW264.7 ir viena no tām. 1995.g. šūnu līnijā RAW 264.7 tika aprakstīta autokrīnā iNOS jeb NOS II

regulācija ar α -MSH (Star *et al.*, 1995). Mūsdienās šīs šūnas tiek plaši izmantotas, lai *in vitro* raksturotu MSH peptīdu un mimētiķu pretiekaisuma darbību visos posmos, sākot no NO sintēzes līdz NF- κ B translokācijai kodolā inhibīcijai, kā arī lai noteiktu dažādu citokīnu gēnu ekspresiju (Mandrika *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2006). Nesen atrasts, ka ne tikai α -MSH molekula, bet arī tās īsāki fragmenti (α -MSH1-10) un α -MSH11-13) var būtiski nomākt NF- κ B producēšanos MKR ekspresējošās makrofāgu šūnu līnijās, kuras apstrādātas ar iekaisuma reaģentiem, piemēram, ar LPS un IFN γ (Mandrika *et al.*, 2001). RAW264.7 šūnās bez MKR1 tika atklāts arī MKR3 un pierādīts, ka MKR signālceļi makrofāgu šūnu līnijā izraisa interleikīnu-10 (IL-10) producēšanās pieaugumu (Lam *et al.*, 2006). Tādējādi RAW264.7 šūnas kalpo kā dabīgais MKR1 un MKR3 avots pētījumos par iekaisuma procesu saistību ar MK.

3. MATERIĀLI UN METODEDES

3.1. Reaģenti

Visi reaģenti, izņemot pētāmos peptīdus un šūnu audzēšanas barotnes, tika pirkti no *Sigma/Aldrich* pārstāvniecības Latvijā NotaBene. Radioaktīvie ligandi [¹²⁵J]-NDP-MSH un [³H]cAMF tika saņemti no *Amersham Bioscience* (Zviedrija). Visi šūnu audzēšanai nepieciešamie reaģenti un barotnes tika pirkti no *Life Technologies*, Zviedrijā.

3.2. Pētāmie peptīdi

Pētāmie peptīdi (1.tabula) tika nopirkti no Francija, *Saxon Biochemicals GMBH* Vācija un *Bachem* Šveice. MSH11-13 analogi tika saņemti no Dr. Helga Suli-Vargha (Peptīdu ķīmijas grupa Eotvos Universitāte, Ungārijā). Peptīdi tika šķīdināti 0.9% NaCl šķīdumā un uzglabāti – 20 C⁰. Eksperimentos vielu atšķaidījumi tika veikti ar metodei atbilstošu buferšķīdumu.

8. tabula. Promocijas darbā pētīto peptīdu struktūras

Nr.	Peptīda kods	Aminoskābju sekvenca
1.	α-MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
2.	NDP-MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH ₂
3.	MSH11-13	Ac- Lys-Pro- Val-NH ₂
4.	SP	₂ HN-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH ₂
5.	Spantīds-I	DArg-Pro-Lys-Pro-Gln-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Leu-NH ₂
6.	α-neo-endorfīns	₂ HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-OH
	Dinorfīni	
7.	D-A1-17	₂ HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH
8.	D-A2-17	₂ HN-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH
9.	D-A2-11	₂ HN-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-OH
10.	D-A1-13	₂ HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-OH
11.	D-A1-6	₂ HN- Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-OH

12.	Dinorfīns B (D-B)	${}^2\text{HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-OH}$
13.	Met-enkefalīns	${}^2\text{HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH}$
14.	Leu-enkefalīns	${}^2\text{HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH}$
	MSH11-13 analogu kodi	
15.	I	Lys-Pro-Val-NH ₂
16.	II	Ac-Lys-Pro-Val-NH ₂
	III	Ac-Lys-Pro-Val I _____ I
17.	IV	Ac-Lys-Pro-DVal I _____ I
18.	V	c(Lys-Val)
19.	VI	c(Lys-DVal)

3.3. Šūnu līnijas

No ATCC šūnu bankas ASV nopirkta dabīgi MKR ekspresējošas līnijas: peļu makrofāgu šūnu līnija RAW264.7 (ATCC TIB-71) un peļu melanomas šūnu līnija B16-F1 (ATCC CRL-6323), un MKR neekspresējoša šūnu līnija COS-7 (ATCC CRL-1651). Cilvēku primāro fibroblastu šūnas tika saņemtas no Vācijas šūnu bankas *Cell Systems, St. Katharinen*.

3.4. Šūnu kultūras

Katra šūnu līnija tika kultivēta barotnēs saskaņā ar šūnu līniju sertifikātu. COS-7, B16-F1 un cilvēku fibroblastu šūnu kultivēšanai tika izmantota Dulbecco's barotne ar 10% liellopu embrija seruma piedevu (FBS) un antibiotikām 1% penicilīns/streptomīns, pretsēņu preparātu – 0.5% amfotericīnu. RAW264.7 šūnas tika audzētas barotnē RPMI-1640 ar 10% FBS un 1% antibiotiku piedevu.

Šūnu audzēšana notika šūnu inkubatorā 37⁰ C temperatūrā, 5% CO₂ atmosfērā. Šūnas tika audzētas barotnēs, līdz tās par 80% aizpildīja audzēšanas plates (parasti sterilās 100 mm petri plates). Tad šūnas tika tripsinizētas ar 0.25% tripsīna/EDTA šķīdumu, ar pipeti savāktas, pārnestas centrifugēšanas stobriņos, centrifugētas 2000 rpm 5 min. Pēc centrifugēšanas virsējais slānis tika noliets un izmantotas nogulsnējušās šūnas. Tad šūnas tika resuspendētas barotnē vai eksperimentam piemērotā buferšķīdumā un saskaitītas. Šūnu skaitīšanai tikai izmantots mikroskops un hemacitometrs.

B16-F1, RAW264.7 un primārās fibroblastu šūnas dabīgi ekspresē MKR, tāpēc tās tūlīt pēc konfluences (vismaz 80% plates aizpildījums) sasniegšanas tika izmantotas attiecīgiem eksperimentiem.

3.4.1. Tripsinizēšana un šūnu skaitīšana

Tripsīna šķīdums tiek pievienots šūnu kultūrām pēc barotnes noliešanas ar aprēķinu 75 cm^2 traukam – 2.5-5 ml, 150 cm^2 – 5-10 ml.

Tripsīns izraisa šūnu disociāciju no plates plastmasas, un šūnas var savākt ar pipeti no audzēšanas platēm un centrifūgas stobriņos nocentrifugēt. Tripsīna inaktivācijai pievieno FBS vai tripsīna inhibitora šķīdumu 1:1.

Hemocitometram ir 2 kameras, katra no tām sadalīta 9 blokos, kuri ir atdalīti ar trīs līnijām. Katrs bloks sastāv no 16 kvadrātiņiem. Uzliekot segstikliņu, šķidrums aizņem 0.1 mm, tāpēc totālais tilpums tiek rēķināts kā 1/10000 ml.

1. Raugoties mikroskopā, saskaita šūnas 1 blokā.
2. Šo skaitu reizina ar 10000 = šūnu skaits/ml, ja šūnu suspensija nav atšķaidīta pirms skaitīšanas. Ja ir, tad vēl reizina ar atšķaidījumu.

3.4.2. Šūnu skaita noteikšana

Lai atšķirtu dzīvās šūnas no mirušām, izmanto krāsvielas, piemēram, tripānzilo, eritrozīnu B, nigrozīnu, kristālvioleto utt. Krāsvielas iekrāso mirušas šūnas, kuru raksturīga pazīme ir tā, ka to membrānas ļauj krāsvielai ieplūst šūnā. Šūnu dzīvotspējas noteikšanai (*cell viability*) noskalo brīvo krāsvielu, šūnas šķīdina 0.1 M NaOH šķīdumā un uzkrāto krāsvielu šūnu lizātos mēra ar mikroplašu lasītāju pie izmantotajai krāsvielai raksturīgās absorbcijas viļņu garuma.

Ja mirušu šūnu skaits pārsniedz 20%, tad tiek skaitītas dzīvās šūnas, kurās krāsvielas nav ieplūdušas. Eksperimentos, kuros izmanto tikai šūnu membrānas, šūnu dzīvotspēja nav svarīga.

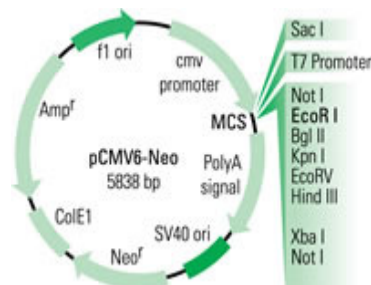
3.4.3. Šūnu transfektēšana

COS-7 šūnas neekspresē MKR, tāpēc tās tika transfektētas ar pētāmo receptoru DNS konstruktiem ekspresijas vektoros. Ependorfa mēģenē ielej 70 μ l OptiMEM barotnes, pievieno 20 μ l Lipofectin reaģenta un apmēram 1 μ g plazmīdu DNS uz 1 miljonu šūnu. Inkubē apmēram 1 min istabas temperatūrā.

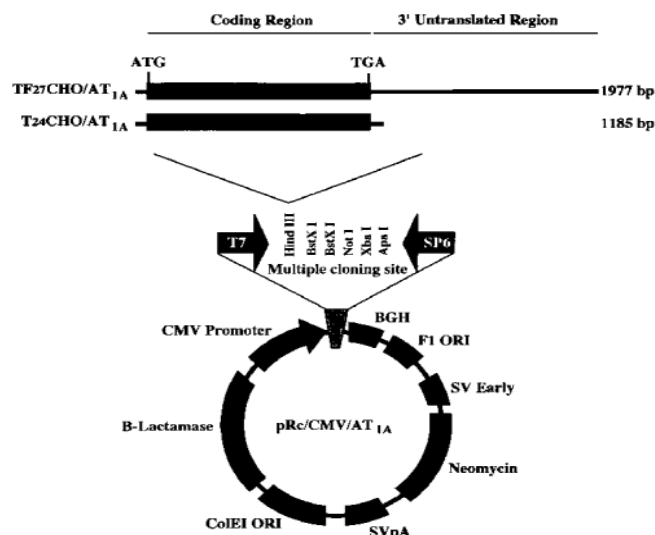
COS-7 šūnu monoslānim nolej audzēšanas barotni un uzlej OptiMEM barotni, kurā pilinot pievieno sagatavoto DNS maisījumu ar lipofektīnu. Inkubē šūnu inkubatorā 5-24 stundas. Tad nomaina OptiMEM uz parasto šūnu audzēšanas barotni un audzē šūnas CO₂ inkubatorā 48 stundas. Pēc tam šūnas tripsinizē un saskaita.

3.5. MKR DNS ekspresijas vektori

MKR1 un MKR5 proteīnam atbilstošās DNS tika klonētas pRc/CMV ekspresijas vektorā (*Invitrogen*), MKR3 un MKR4 atbilstošās DNS tika klonētas pCMV/neo ekspresijas vektorā (saņemti kā dāvana no prof. Ira Gantz, Mičigānas universitāte, ASV), (attēli 3 un 4).



3. att. pCMV/neo vektors (*Origene* katalogs)



4. att. pRc/CMV ekspresijas vektora struktūra (*Invitrogen katalogs*)

3.6. Ligandu-receptoru saistīšanās noteikšana

Radioligandu–receptoru saistīšanās metode tika veikta, izmantojot šūnu monoslāni 96 lauciņu platēs, kā aprakstīts Schiöth *et al.*, 1995. Šūnas tika sadalītas pa 100000 katrā lauciņā 50 μ l–os buferšķīdumā, kas bija pagatavots no MEM (*Minimum essential medium*) ar 0.2% liellopu seruma albumīna, 1 mM 1,10-fenantrolīna, 0.5 mg/L leupeptīna, 200 mg/L bacitracīna un 25 mM HEPES piedevām, pH=7.4.

Šūnas tika inkubētas ar iezīmēto ligandu [¹²⁵J]NDP-MSH, kurš tika pievienots 0.2 nM koncentrācijā, pētot konkurences līknes, bet, pētot piesātinājuma līknes līdz pārākuma piesātinājuma koncentrācijai, – 15 nM. Nespecifiskā saistīšanās tika noteikta ar NDP-MSH 1 μ M koncentrācijā. Pētāmās vielas tika pievienotas dažādās koncentrācijās.

Pēc iezīmētā liganda un pētāmo peptīdu pievienošanas šūnas tika inkubētas 2 stundas CO₂ inkubatorā. Pēc inkubācijas šūnas divreiz tika noskalotas ar buferi un izšķīdinātas 0.1 M NaOH šķīdumā. Izšķīdināto šūnu radioaktivitāte tika skaitīta ar *Wallac-Wizard* gamma skaitītāju, un iegūtie dati analizēti ar datorprogrammu *GraphPad Prism*. Aprēķinot receptoru skaitu uz 1 šūnu, tika pieņemts, ka viena NDP-MSH molekula saistās ar vienu receptora molekulu. Eksperimenti tika veikti ar 2–3 paralēliem mērījumiem un atkārtoti 3–4 reizes.

3.7. Slāpekļa oksīda līmeņa mērījumi

Peļu makrofāgu šūnas RAW264.7 tika audzētas un pavairotas šūnu barotnē RPMI-1640. Eksperimentam šūnas tika sadalītas pa 500 000 šūnu katrā lauciņā 96 lauciņu platē. Atbilstoši eksperimenta plānam daļa šūnu netika stimulētas, un tās izmantoja kontrolei, citas tika stimulētas ar baktēriju lipopolisaharīdiem (LPS) (no *Escherichia coli*) un interferonu γ (IFN- γ) dažādās koncentrācijās, kā arī ar endotoksīniem (LPS 100 ng/ml + IFN- γ 5 darbības vienības/ml) kopā ar α -MSH un citiem pētījumā lietotiem peptīdiem dažādās koncentrācijās. Pēc 16 stundu inkubācijas šūnu inkubatorā 50 μ l no šūnu barotnes katra lauciņa tika pārnesti uz citu 96-lauciņu plati, un 50 μ l barotnes tika pievienots Griesa reaģents (Green *et al.*, 1982). Pēc 10 min izveidojies krāsojums atbilda NO metabolīta nitrīta koncentrācijai. Šī krāsojuma absorbcija tika mērīta pie viļņu garuma 540 nm ar *Novo Biolabs* mikroplašu lasītāju (*Molecular Devices*). Nitrītu koncentrācija tika izrēķināta pēc līdzīgos apstākļos iegūtas NaNO₂ standartlīknes.

Eksperimenti tika veikti ar 2–3 paralēliem mērījumiem un atkārtoti 3–4 reizes.

Griesa reakcija un reaģenti

1. 0.1% N-1-naftiletīlēndiamīna dihidrohlorīda šķīdums ūdenī (NED)
2. 1% sulfanilamīda šķīdums 5 % fosforskābē
3. 0.1 M nātrija nitrīta šķīdums (standartlīknei)

1. Pagatavo darba šķīdumus un ļauj pastāvēt 30 min istabas temperatūrā.
2. Pārnes 50 μ l inkubēto šūnu barotnes katrā 96-lauciņu plates lauciņā.
3. Pievieno 50 μ l sulfanilamīda šķīduma.
4. Inkubē 5-10 min istabas temperatūrā tumšā vietā.
5. Pievieno 50 μ l NED šķīduma
6. Inkubē 5-10 min, kamēr veidojas purpursarkans krāsojums.
7. Mēra 30 min laikā, jo pēc tam krāsa izzūd.

3.8. cAMF līmeņa mērījumi

Šūnas pēc tripsinizēšanas un centrifugēšanas inkubē 30 min 37⁰ C ūdens vannā DMEM barotnē bez FBS, pievienojot 0.5 mM 3-izobutil-1-metilksantīnu (IBMX), lai

inhibētu fosfodiesterāzes aktivitāti un sintezējusies cAMF saglabātos. Pēc šīs apstrādes šūnas sadala pa 50000 katrā 96-lauciņu plates lauciņā. Barotni nocentrifugē un nolej, bet šūnu monoslānim pievieno 0.05 ml DMEM+IBMX, kurā izšķīdinātas pētāmās vielas dažādās koncentrācijās. Šūnas inkubē 20 min šūnu inkubatorā, tad nocentrifugē, un cAMF ekstrahē ar 4.4 M HClO₄. Pēc 5 min skābi neutralizē ar 5 M KOH/1 M TRIS buferi un centrifugē. cAMF koncentrācija šūnu lizātos tika mērīta ar cAMF saistīšanas proteīna metodi (Nordstedt and Fredholm, 1990). cAMF saistīšanas proteīns tika iegūts no liellopu virsnierēm. cAMF koncentrāciju paraugos izrēķināja pēc cAMF standartlīknes, kura tika iegūta, mērot zināmas koncentrācijas cAMF paraugus. Eksperimenti tika atkārtoti 3–4 reizes.

3.8.1. cAMF saistīšanas proteīna sagatavošana

Liellopu virsnieres tiek atbrīvotas no taukiem un medulārā slāņa audiem. Atlikušos audus homogenizē 10 tilpumos ar 100 mM TRIS/HCL, pH 7.4, 250 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% 2-merkaptoetanolā un 0.25 M saharozes, izmantojot Ultra-Turrax. Homogenātu izkāš caur marli un centrifugē 30000g 60 min pie 4 °C. Izmanto supernatantu, kurā ir šķīstošie proteīni. Nosaka proteīnu koncentrāciju un atšķaida līdz 16mg/ml, safasē pa 1 ml un uzglabā saldētavā -20 °C. Šādi sagatavotu cAMF saistīšanas proteīnu var uzglabāt saldētavā 2 gadus.

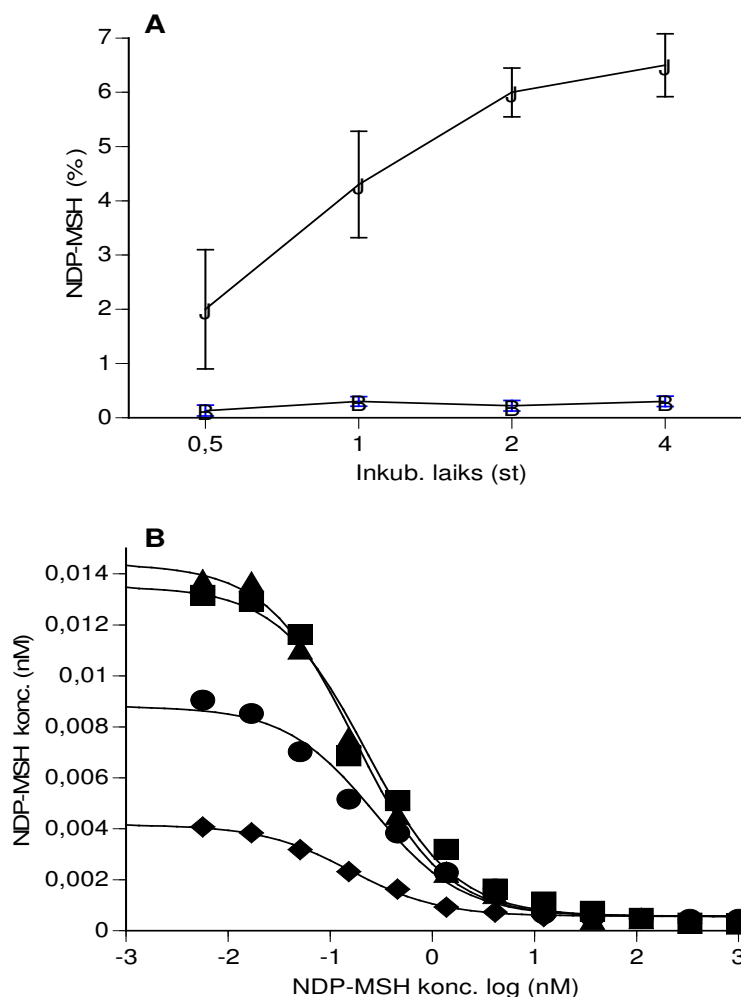
3.9. Datu apstrāde

Datu apkopošanā un statistiskajā analīzē tika izmantotas programmas Microsoft Excel 2000 for Windows un GraphPad Prism 3.00. Rezultātu ticamība noteikta ar *one-way* ANOVA ar sekojošu parametrisko Bonferroni multiplās salīdzināšanas testu un *Student's t*-testu (*2-tailed t test*). Rezultāti tika aprēķināti kā vidējais ± vidējā kvadrātiskā kļūda (S.E.M) un uzskatīti par ticamiem, ja *p* vērtība līdzinās vai ir mazāka par 0.05.

4. REZULTĀTI

4.1. α -MSH un tā analoga [Nle⁴, D-Phe] α -MSH MKR saistīšanās kinētikas raksturojums peļu melanomas šūnu B16-F1 līnijā

Piesātinājuma līkne iezīmētajam peptīdam [¹²⁵J]NDP-MSH tika iegūta, ņemot peptīdu lielā pārākumā, lai pēc iespējas visi receptori tiktu piesātināti. Par piesātinājumu liecina iezīmētā liganda mērījumi, kas parāda, ka tikai 6–7% radioaktīvās iezīmes ir piesaistījušies šūnu paraugiem (5A. attēls), bet pārējā brīvā, nesaistītā iezīmes daļa ir pēc šūnu nocentrifugēšanas atdalīta no saistītās.



5. att. Iezīmētā liganda NDP-MSH piesātinājuma (A) un konkurences (B) līknes dažādā šūnu inkubēšanas laikā.

Attēlā 5A augšējā līkne atspoguļo kopējo saistīšanos, apakšējā līkne - nespecifisko saistīšanos. Starpība starp šiem mērījumiem ir specifiskā saistīšanās. NDP-MSH saistīšanās %-os pie šūnu

membrānām ir attēlota kā daļa no eksperimentā izmantotās iezīmes daudzuma. Attēlā 5B. NDP-MSH saistīšanās pie receptoriem līknes pēc 0.5 h (rombi), pēc 1 h (apļi), pēc 2 h (trijstūri) un pēc 4 h (kvadrāti). Eksperimenti tika atkārtoti 3 reizes un paraugi mērīti dublikātos.

Nespecifiskā saistīšanās tika noteikta, nobloķējot receptorus ar 1 μM NDP-MSH. Kā redzams 5A attēlā, laika gaitā pieaug NDP-MSH saistīšanās pie receptoriem un pēc 2 stundām sasniedz plato. 5B. attēlā ir parādītas NDP-MSH konkurences ar [^{125}J]NDP-MSH līknes, kuras tika iegūtas, inkubējot šūnas ar peptīdiem 0.5; 1; 2 un 4 stundas. Kā redzam, ir novērojama no šūnu inkubēšanas laika atkarīga neiezīmētā peptīda konkurence. Tomēr visās līknēs ir redzams, ka, neatkarīgi no inkubēšanas laika, sākot no 10 nM, NDP-MSH izraisa pilnīgu iezīmes izspiešanu no saistīšanās vietām.

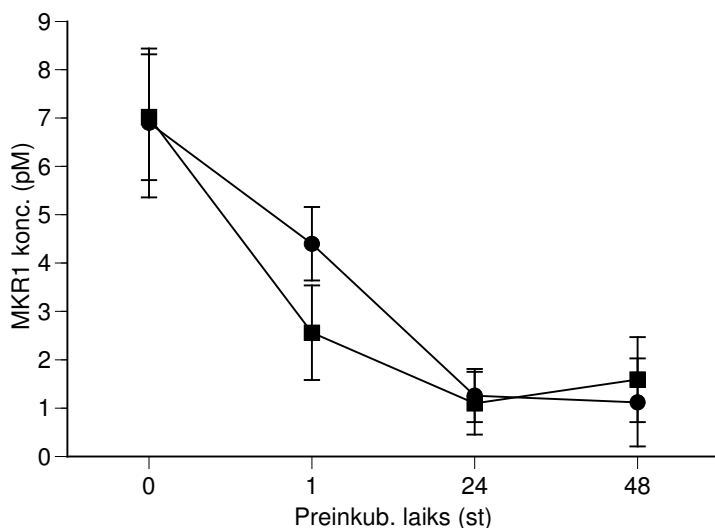
Pagarinot inkubācijas laiku (9. tabula), novēro NDP-MSH inhibīcijas konstantes (K_i) nelielu pieaugumu. Tomēr atšķirības nav statistiski ticamas.

9. tabula. NDP-MSH inhibīcijas konstantes (K_i)

Peptīdi	0.5 h K_i (nM)	1 h K_i (nM)	2 h K_i (nM)	4 h K_i (nM)
NDP-MSH	0.046 ± 0.038	0.051 ± 0.033	0.060 ± 0.008	0.102 ± 0.02

Eksperimenti tika atkārtoti trīs reizes, katru paraugu ņemot dublikātos.

Inkubējot šūnas 1 stundu ar α -MSH un NDP-MSH 1 μM koncentrācijā, tika panākta receptoru skaita samazināšanās uz šūnu virsmas (*down-regulation*) (6. attēls). Receptoru proteīna koncentrācija samazinājās laika intervālā līdz 24 h, tad palika nemainīga līdz 48 h. Apmēram 20% no receptoru līmeņa saglabājās uz šūnām un nebija pakļauti receptoru internalizācijai vai desensitizācijai.



6. att. Aprēķinātā MKR1 koncentrācija pēc šūnu stimulācijas ar MSH peptīdiem pirms iezīmētā liganda pievienošanas inkubācijas videi.

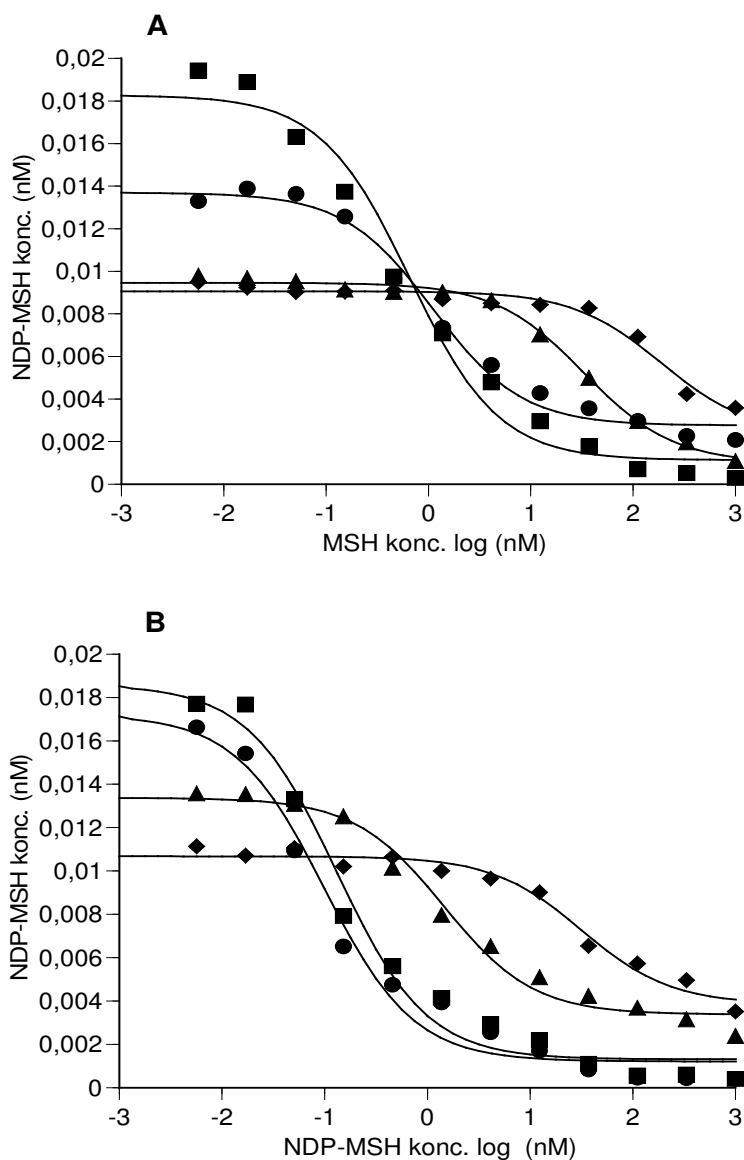
Receptoru koncentrācijas izmaiņas laika gaitā NDP-MSH ietekmē attēlotas līknē ar aplū simbolu, α-MSH – ar kvadrātiem.

Eksperimenti atkārtoti 3 reizes, katrs mērījums veikts dublikātos.

Attēlā redzamas vidējās vērtības ± S.E.M.

Netika novērotas ticamas atšķirības abu peptīdu darbībā.

Dažādos laika intervālos iegūtas konkurences līknes uz šūnām pēc to preinkubācijas ar α-MSH (7A. attēls) un NDP-MSH (7B. attēls) arī parāda receptoru skaita samazināšanos (*down-regulation*) vai iekļūšanu šūnas citozolā. Līknes slīpums, ko nosaka, aprēķinot Hilla koeficientu, netika izmainīts. Tomēr pēc 24 un 48 h konkurences līknes varēja novērot tikai ar augstākām peptīdu koncentrācijām. Arī laika intervālā starp 24 un 48 stundām tika novērota konkurence, jo līkne ir nobīdīta pa labi uz augstāko koncentrāciju pusi.



7. att. α -MSH (A) un NDP-MSH (B) konkurence ar iezīmēto NDP-MSH (ordināta) dažādos šūnu preinkubācijas ar peptīdiem laika intervālos. Šūnas tika inkubētas noteiktu laiku ar peptīdiem pirms iezīmētā [125 J]NDP-MSH pievienošanas. Apzīmējumi: 48 h rombi, 24 h trijstūri, 2 h kvadrāti un 1 h apli. Eksperimenti tika atkārtoti 3 reizes, ņemot katru paraugu dublikātos.

4.2. P vielas antagonista spantīda I saistīšanās pie MKR

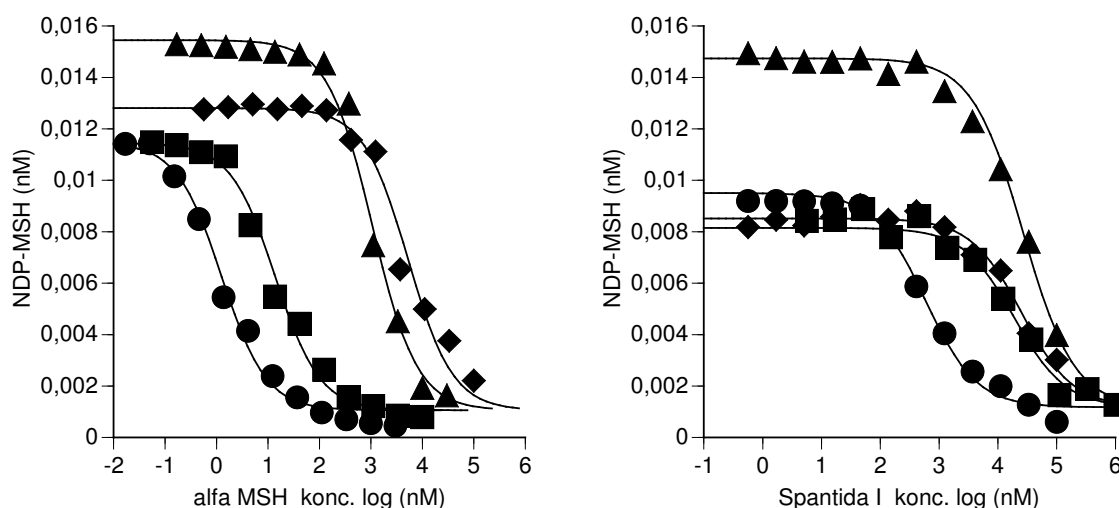
Ar MKR DNS transfektētas COS-7 šūnas tika izmantotas, lai raksturotu P vielas un tās antagonista spantīda I saistīšanos pie MKR. Atklājās, ka P viela nesaistās pie MKR, bet spantīdam I tika novērota saistīšanās pie visiem MKR subtipiem (10. tabula). Spantīds I saistās ar izteiktu selektivitāti pret MKR1, taču pie citiem MKR tas saistās ar līdzīgām afinitātēm.

10. tabula. α -MSH, spantīda I and P vielas K_i vērtības (vidējais \pm S.E.M)

Ligands	MKR1	MKR3	MKR4	MKR5
	K_i (nM)	K_i (nM)	K_i (nM)	K_i (nM)
α -MSH	0.132 ± 0.043	14.2 ± 1.25	760 ± 39	4054 ± 142
Spantīds I	1236 ± 470	19929 ± 1435	22848 ± 194	17825 ± 1523
P viela	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. – nav saistīšanās Eksperimenti tika atkārtoti trīs reizes ar paraugu dublikātiem.

Spantīda I konkurences līknes tika salīdzinātas ar α -MSH (8. attēls). Kā redzams, abi peptīdi izkonkurēja iezīmi no saistīšanās vietām pilnīgi. Nespecifiskā saistīšanās tika novērota aptuveni 10%.



8. att. α -MSH un spantīda I konkurence ar iezīmēto NDP-MSH par saistīšanos pie MKR.

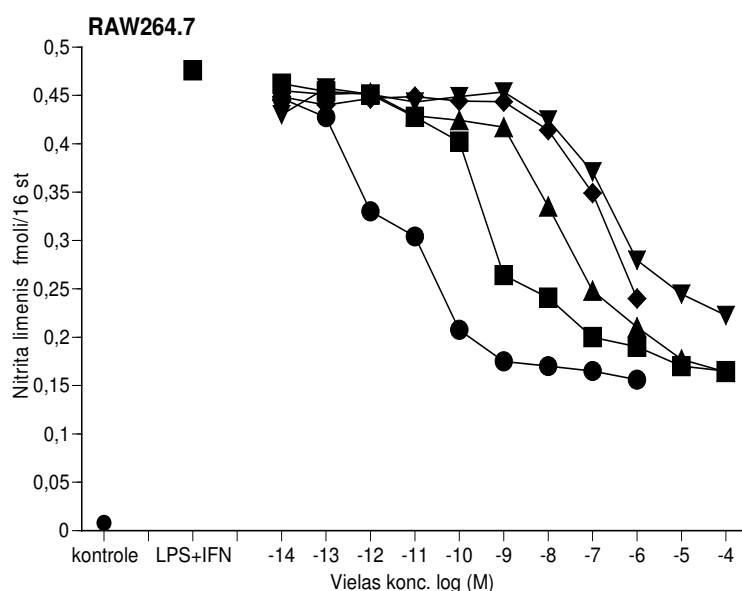
Apzīmējumi: MKR1 -apļi, MKR3 – kvadrāti, MKR4 trijstūri un MKR5 – rombi.

Eksperimentos novērotais dažāda līmeņa iezīmes saistīšanās maksimums pie dažādiem MKR ir izskaidrojams ar dažādu šūnu transfekcijas ar receptoru DNS efektivitāti. Tomēr tas neietekmē atbilstošu vielu afinitātes mērījumus. Par to liecina kontroles mērījumi ar α -MSH un aprēķinātā α -MSH afinitāte.

4.3. Spantīda I ietekme uz NO veidošanos RAW264.7 šūnu līnijā

Lai izraisītu NO pārprodukciju, RAW264.7 šūnas tika vienlaicīgi stimulētas ar LPS 100 ng/ml un IFN γ 5 U/ml. Pēc 16 stundām tika novērota izteikta NO līmeņa stimulācija salīdzinājumā ar kontroles šūnām (9. attēls). NO līmenis tika aprēķināts pēc NaNO₂ standartlīknes.

Spantīds I un α -MSH tika pievienots šūnu paraugu barotnei vienlaicīgi ar LPS un IFN γ , kā arī vieni paši bez endotoksīniem 16 stundas pirms NO mērījumiem. Kontroles šūnām ne α -MSH, ne spantīds I neuzrādīja nekādu ietekmi uz bazālo NO līmeni (dati att. nav parādīti). 9. attēlā redzams, ka spantīds I inhibē NO produkciju augstākās koncentrācijās kā α -MSH, tomēr efektivitātes ziņā abi peptīdi darbojas līdzīgi – NO līmenis tiek samazināts apmēram par 60%. Taču netiek sasniegts kontroles NO līmenis.



9. att. Spantīda I un α -MSH izraisītā NO pārprodukcijas inhibīcija makrofāgu šūnu līnijā. Apzīmējumi: α -MSH – apli, spantīds I - kvadrāti, α -MSH + HS024 100 nM – rombi, spantīds I + HS024 100 nM – trijstūri uz augšu, spantīds I + HS024 1 μ M – trijstūri uz leju. LPS 100 ng/ml un IFN γ 5 U/ml tika pievienoti vienlaicīgi šūnu barotnei ar pētāmām vielām dažādās koncentrācijās 16 h pirms NO mērīšanas. Uz ordinātas parādītais nitrīta līmenis aprēķināts uz 1 šūnu. Eksperimenti atkārtoti 3 reizes, un paraugi mērīti dublikātos.

Lai pārbaudītu, vai šis spantīda I efekts notiek ar MKR starpniecību, 15 min pirms peptīdu pievienošanas šūnām tika pielikts HS024 konstantā 100 nM un 1 μ M koncentrācijā. Tika novērots, ka HS024 nobloķēja α -MSH iedarbību jau koncentrācijā

100 nM, taču, lai panāktu līdzīgu efektu ar spantīdu I, vajadzēja šūnām pievienot HS024 desmit reizes lielākā koncentrācijā (1 μM).

Šūnu dzīvotspēja tika noteikta, lai kontrolētu šūnu skaita samazināšanos, kas varētu kļūdaini tikt pieņemta par vielu NO līmeņa samazināšanas efektu. Rezultāti (dati nav parādīti) liecina, ka dzīvo šūnu skaits neatšķiras kontroles un eksperimenta šūnām.

4.4. Dinorfīnu saistīšanās pie melanokortīnu receptoriem

Veiktie eksperimenti liecina, ka enkefalīni, neoendorfīns, dinorfīns-B un dinorfīns-A1-6 nekonkurē ar [¹²⁵J]NDP-MSH par saistīšanos ar MKR (11. tabula). Citi dinorfīni saistījās ar samērā zemu afinitāti. Lai gan visi dinorfīni uzrādīja zemu afinitāti pret MKR, dinorfīnu saistīšanās veidā tika novērota likumsakarība – līdzīga saistīšanās pie diviem receptoru apakštipiem. Dinorfīns A1-17 saistījās ar līdzīgu afinitāti pie pāriem MKR1 un MKR3, MKR4 un MKR5. Dinorfīns A2-17 uzrādīja līdzīgas afinitātes, saistoties pie MKR1 un MKR4, bet ļoti zemu afinitāti pret MKR3 un MKR5. Vēl īsāks dinorfīna A fragments 2-11 saistījās ar izteikti augstāku afinitāti un selektivitāti pie MKR1 nekā pie pārējiem MKR. Pie tam A2-11 gandrīz nemaz nesaistījās pie MKR5. Dinorfīns A1-13 saistījās līdzīgi pilnai molekulai (A1-17) pie MKR1-4, uzrādot pat apmēram 10 reizes augstāku afinitāti pret MKR5 kā pilna dinorfīna A molekula. Šāda veida saistīšanās pazīmes atšķiras no melanokortīniem, piemēram, α-MSH.

11. tabula. Dinorfīnu saistīšanās afinitātes pie melanokortīnu receptoriem (vidējā $K_i \pm S.E.M$)

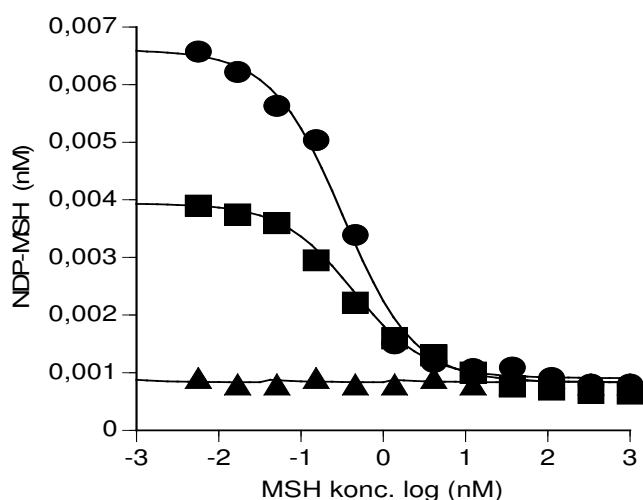
Peptīds	MKR1		MKR3		MKR4		MKR5	
	(nM)	S.E.M	(nM)	S.E.M	(nM)	S.E.M	(nM)	S.E.M
α-neo-endorfīns	>100000		>100000		>100000		>100000	
D-B	>100000		>100000		>100000		>100000	
D-A(1-17)	6860	281	6296	414	70779	3605	179290	64612
D-A(2-17)	2339	886	40065	30357	5990	143	60638	39362
D-A(2-11)	6944	567	>100000		114285	2780	>300000	

D-A(1-13)	9353	603	8782	308	70352	3425	14236	2741
D-A(1-6)	>100000		>100000		>100000		>100000	
Met-enkefalīns	n.		n.		n.		n.	
Leu-enkefalīns	n.		n.		n.		n.	
α -MSH	0.210	0.08	22	3.4	432	76	5400	377

D– dinorfīns; n –nesaistās

4.5. Cilvēka ādas primāro fibroblastu MKR1 ekspresijas un cAMF veidošanās pētījumi

Primāro fibroblastu šūnas tika audzētas līdz konfluences sasniegšanai, tad izmantotas radioligandu saistīšanās testā. Kā pozitīvās kontroles tika izmantotas α -MSH saistīšanās līknes (10.attēls).



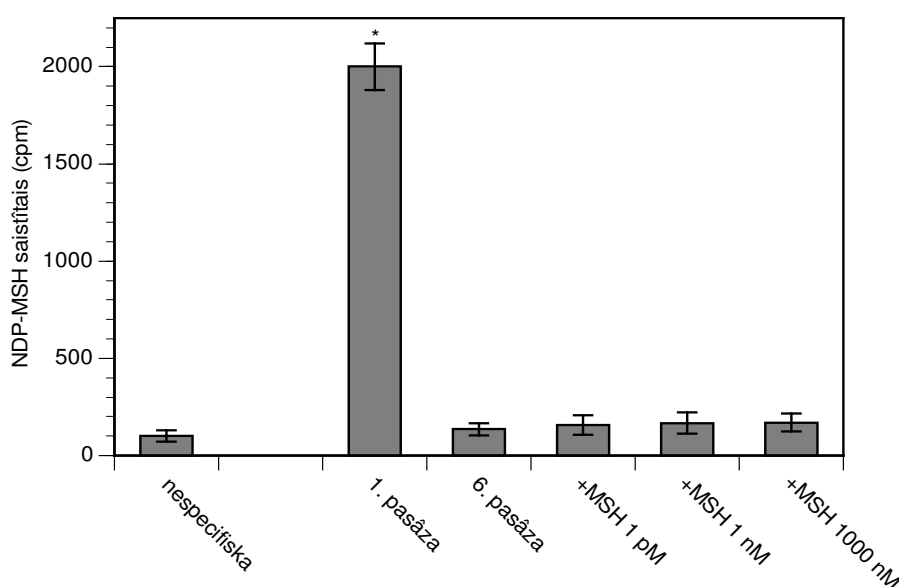
10. att. α -MSH saistīšanās pie MKR fibroblastu šūnu membrānās.

Mērījumi veikti pēc pirmās konfluences sasniegšanas (apļi), pēc 3 šūnu pārsēšanas reizēm (kvadrāti) un pēc 6 pārsēšanas reizēm (trijstūri).

Ekspierimenti atkārtoti trīs reizes, katrs mērījums veikts ar triplikātiem.

Tika atrasts, ka α -MSH konkurences līknes ir raksturīgas šim peptīdam un aprēķinātā K_i vērtība 0.12 ± 0.034 nM atbilst agrāk publicētajai α -MSH afinitātei pret MKR1 (Schiöth *et al.*, 1996). Tomēr iegūtie rezultāti, veicot radioligandu saistīšanas testu atkārtoti, liecina, ka pēc vairākkārtīgas šūnu pavairošanas un pārsēšanas laika

gaitā mākslīgā barotnē zūd fibroblastu spēja ekspresēt MKR1. Par to liecina saistīšanās līknes pazemināšanās pēc 3 pārsēšanas reizēm un pēc sešām pasāžām tuvošanās 0 stāvoklim (10. attēls). Lai pārlicinātos par šūnu atbildētspēju uz hormonu stimulāciju, pēc sestās pārsēšanas reizes šūnu barotnei tika pievienots α -MSH 10^{-12} M, 10^{-9} M un 10^{-6} M koncentrācijā. Tomēr, kā redzams 11. attēlā, radioaktīvā iezīme [125 J]NDP-MSH joprojām neiezīmēja MKR uz fibroblastu membrānām. Kā pozitīvā kontrole tika izmantota pirmā fibroblastu pasāža un kā negatīvā nespecifiskā NDP-MSH saistīšanās pie pirmās pasāžas šūnām, kad specifiskā saistīšanās bija nobloķēta ar 10 μ M α -MSH.



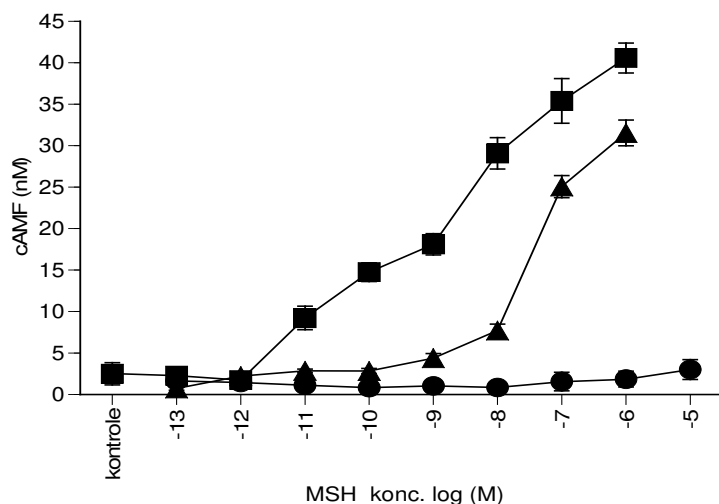
11. att. MKR lokalizācija cilvēka fibroblastu šūnās pēc stimulācijas ar α -MSH.

Ekspierimenti atkārtoti trīs reizes ar dublikātiem.

* $p \leq 0.05$ vs nespecifiskās saistīšanās kontrolei, ANOVA

cpm – radioaktivitātes mērvienība (*counts per minute*)

Lai pārlicinātos par receptoru funkcionalitāti, tika mērīts cAMP līmenis fibroblastu šūnās pēc vairākkārtējas konfluences sasniegšanas un šūnu pārsēšanas. Kā redzams 12. attēlā, α -MSH stimulē cAMP veidošanos no peptīda koncentrācijas atkarīgā veidā. α -MSH efekts sasniedz maksimumu 1 μ M koncentrācijā. Līdzīgi kā radioligandu-receptoru saistīšanās testā, pēc sešām pasāžām netika novērota α -MSH spēja stimulēt cAMP produkciju primārajās fibroblastu šūnās.



12. att. α -MSH cAMP veidošanās stimulācija fibroblastu šūnu kultūrā pēc 1. pasāžas (kvadrāti), pēc 3.pasāžas (trijstūri) un pēc 6.pasāžas (aplī).
Eksperimenti atkārtoti trīs reizes, un paraugi ņemti triplikātos.

4.6. α -MSH11–13 analoģu saistīšanās pie MKR

Lai izslēgtu šūnu līniju specifisku atbildi uz MSH C gala tripeptīda un tā analoģu saistīšanās spēju pie MKR, tika izmantotas dažādas šūnas – ar cilvēku MKR DNS transfektētas insektu šūnas Sf9 un dabīgās šūnu līnijas, kuras ekspresē MKR1 un MKR3 (RAW264.7), kā arī peļu melanomas šūnas B16–F1, kuras ekspresē MKR1. Kontrolē izmantotais α -MSH uzrādīja atbilstošas afinitātes pret visiem MKR (12. tabula). MKR uz RAW254.7 šūnu membrānām ir maz, apmēram 200–300 saistīšanās vietu/šūna, B16–F1 šūnas ekspresē vairāk – 3000–4000 saistīšanās vietu/šūna, bet transfektētas Sf9 šūnas ekspresē MKR vēl vairāk – 100000–200000 saistīšanās vietu/šūna. Receptoru skaits uz vienas šūnas membrānas tiek aprēķināts, ņemot vērā pie vienas šūnas piesaistīto NDP–MSH molekulu skaitu. Atbilstoši radioliganda NDP–MSH saistīšanās līknēm tiek aprēķināta NDP–MSH molārā koncentrācija, kas dod maksimālo specifisko saistīšanos. Tālāk tiek izmantota konstante – Avogadro skaitlis, kas nosaka 1 molā esošo molekulu skaitu. Pieņemot, ka viena NDP–MSH molekula saistās pie viena receptora, un saskaitot eksperimentā ņemtās šūnas, tiek aprēķināts piesaistīto NDP–MSH molekulu skaits, kas atbilst saistīšanās vietu jeb receptoru skaitam uz vienu šūnu.

Tika atklāts, ka MSH11-13 un tā analoģi nesaistās ne pie vienām šūnām, t.i. nekonkurē ar [¹²⁵J]NDP-MSH (12. tabula) pat 10 mM koncentrācijā.

12. tabula. Peptīdu saistīšanās inhibīcijas konstantes K_i (nM) pie melanokortīnu receptoriem dažādās šūnu līnijās

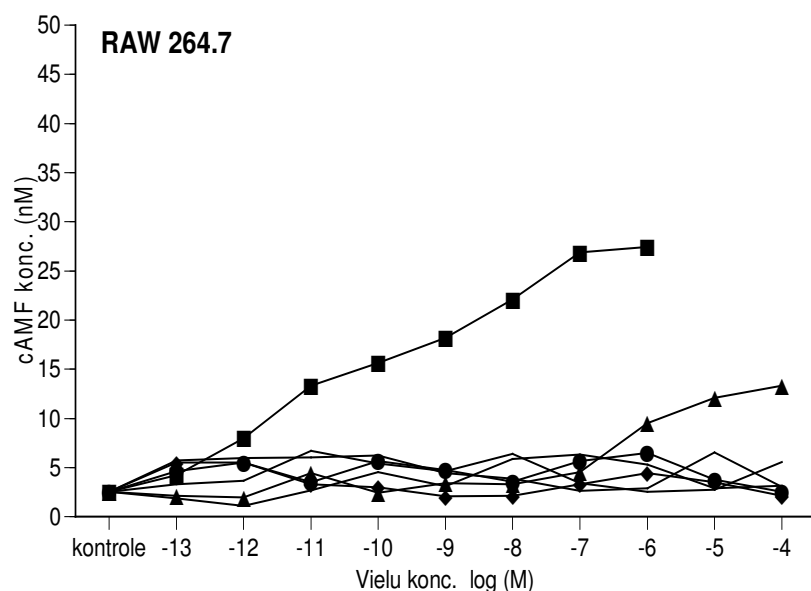
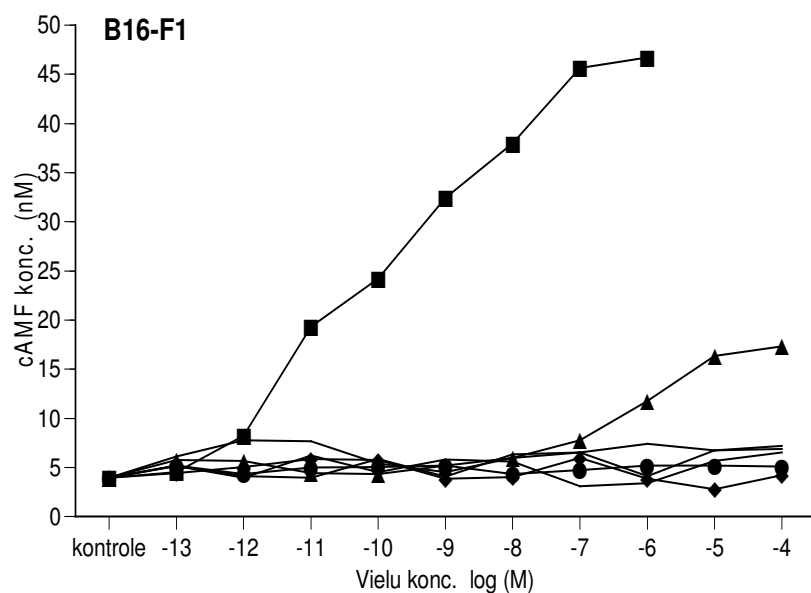
Peptīds	Sf9 MKR1	Sf9 MKR3	Sf9 MKR4	Sf9 MKR5	RAW264. 7	B16-F1
α -MSH	0.33 ± 0.04	26 \pm 3.4	702 \pm 21	6034 \pm 74	0.36 \pm 0.09	0.21 \pm 0.1
Lys-Pro-Val-NH ₂ (I)	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Ac-Lys-Pro-Val-NH ₂ (II)	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Ac-Lys-Pro-Val (III) I _____ I	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Ac-Lys-Pro-DVal (IV) I _____ I	n.	n.	n.	n.	n.	n.
DKLL (V)	n.	n.	n.	n.	n.	n.
DKLD (VI)	n.	n.	n.	n.	n.	n.

n=4, neatkarīgie eksperimenti, paraugi ņemti dublikātos

n. – nesaistās

4.7. MSH11–13 un tā analogu ietekme uz cAMF producēšanos B16-F1 un RAW264.7 šūnās

MSH peptīdiem ir raksturīga spēja stimulēt cAMF sintēzi šūnās. Pētot MSH fragmentu 11–13 un tā cikliskos, kā arī lineāros analogus, tika noskaidrots, ka vienīgi cikliskais MSH11–13 analogs ar DVal uzrādīja tendenci stimulēt cAMF veidošanos (13.attēls). Visi analogi, izņemot ciklo(Ac-Lys-Pro-DVal), neuzrādīja ietekmi uz cAMF sintēzi pat līdz 100 μ M koncentrācijai. Ciklo(Ac-Lys-Pro-DVal) sāka stimulēt cAMF sintēzi koncentrācijā 1 μ M. Tomēr tas arī 100 μ M koncentrācijā nerasniedza α -MSH efektu. Aprēķinātās EC₅₀ vērtības bija – α -MSH 121 \pm 23 pM un ciklo(Ac-Lys-Pro-DVal) 947.7 \pm 128 nM. Tā kā pārbaudīto vielu efekti neatšķīrās abās šūnu līnijās, tad tika secināts, ka novērotais MSH11–13 analoga efekts nav specifisks kādai konkrētai šūnu līnijai.



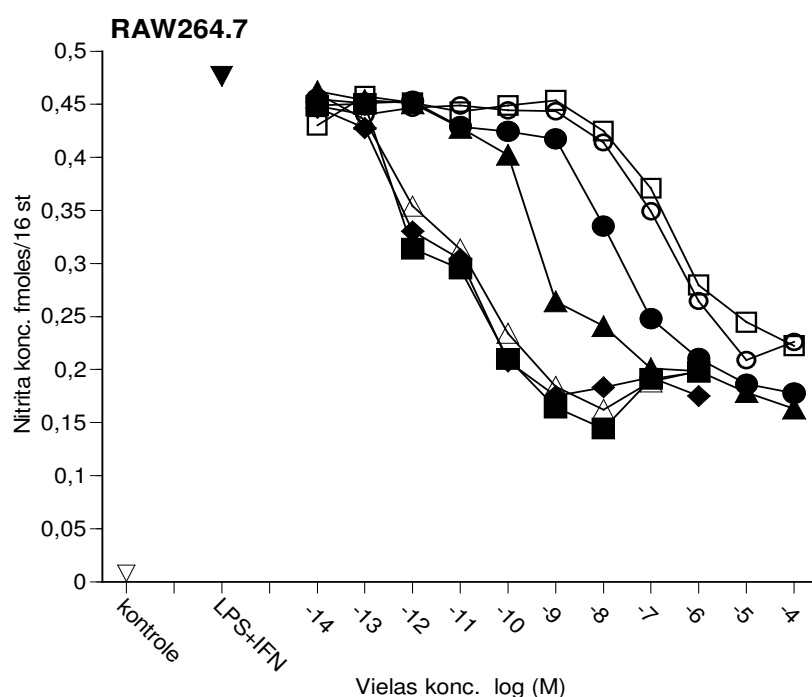
13. att. cAMF veidošanās stimulācija B16-F1 un RAW264.7 šūnās pēc peptīdu α-MSH (■), MSH11-13 (Δ), MSH11-13 analogu: II (◆), III (●), IV (▲), V (○) un VI (□) pievienošanas šūnu barotnei.

Katrs punkts atbilst vidējam lielumam no četriem neatkarīgiem mērījumiem.

4.8. Slāpekļa oksīda veidošanās RAW264.7 šūnās

Slāpekļa oksīda (NO) līmenis tika mērīts un aprēķināts pēc tā metabolīta nitrīta līmeņa. Nitrīta akumulācija RAW264.7 šūnu barotnē ir parādīta 14. attēlā. Novērojumi liecina, ka 16 h makrofāgu stimulācija ar LPS/IFN γ (attiecīgi 100 ng/ml un 5 U/ml) izraisīja ievērojamu nitrīta līmeņa pieaugumu salīdzinājumā ar nestimulētām šūnām. Kontroles nestimulētas šūnas producē ļoti maz NO.

α -MSH un MSH11-13 gan acetilētā, gan neacetilētā forma inhibēja LPS/ IFN γ izraisīto nitrīta līmeņa pieaugumu, kas atbilst NO pārprodukcijai. Aprēķinātās IC₅₀ vērtības bija atbilstoši 25 ± 10 pM, 80 ± 16 pM, 64 ± 21 pM. Inhibīcijas maksimālā atbilde visiem trijiem peptīdiem bija 60%. Ar šūnu dzīvotspējas testu, iekrāsojot šūnas ar tripānzilo un saskaitot šūnas ar mikroskopa palīdzību, tika pārbaudīts, ka NO producēšanās samazināšanu neizraisa dzīvo šūnu skaita samazināšanās. Tātad LPS/ IFN γ stimulācija neietekmēja šūnu dzīvotspēju, bet paaugstināja NO producēšanos. Pārbaudītie MSH11–13 analogi bija mazāk aktīvi. Šie peptīdi uzrādīja NO inhibīcijas spēju ar IC₅₀ vērtībām 18.4 ± 8.77 nM (III), 4.6 ± 1.23 nM (IV), 155 ± 67 nM (V) un 238 ± 87 nM (VI). Tomēr koncentrācijā 100 μ M visi MSH11–13 analogi – līdzīgi kā pilna hormona molekula – inhibēja 60% no endotoksīnu efekta. Neviens peptīds nenormalizēja NO pārprodukciju pilnīgi.



14. att. Peptīdu ietekme uz NO līmeni RAW264.7 šūnu līnijā pēc 16 h stimulācijas ar LPS (100 ng/ml) kopā ar IFN γ (5 U/ml).

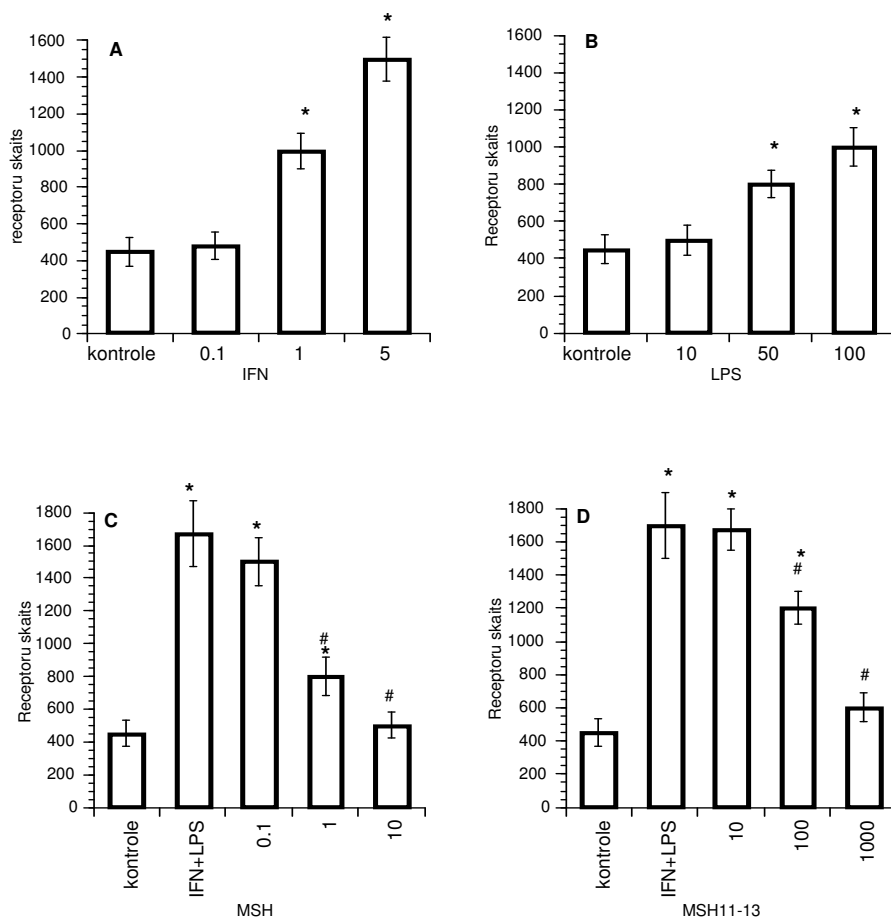
α -MSH (■), MSH11–13 (◆), MSH11–13 analogi: II (△), III (●), IV (▲), V (○) un VI (□).

Kontroles šūnas tika inkubētas ar (▼), un bez LPS/ IFN- γ (▽).

NO līmenis mērīts pēc nitrīta standartlīknes. Uz ordinātas atlikts vidējais mērījums no trīs neatkarīgiem eksperimentiem \pm S.E.M.

4.9. α -MSH un MSH11–13 ietekme uz MKR1 ekspresiju makrofāgu šūnu līnijā RAW264.7

Iegūtie rezultāti liecina, ka miera stāvoklī RAW264.7 šūnas ekspresē nelielu MKR receptoru skaitu, kas sasniedz 300–500 saistītšanās vietas uz šūnu (15. attēls).



15. att. α -MSH un MSH11-13 ietekme uz MKR skaitu ar IFN γ un LPS stimulētās šūnās. Kontrolē šūnas stimulētas ar PBS buferi. Att. 15A. IFN γ mērvienība uz abscisas ir darbības vienības/ml, 15B. LPS ng/ml, 15C α -MSH nM un 15.D. MSH11-13 nM. Att.C un D IFN γ koncentrācija ir 5 U/ml un LPS 100 ng/ml.

Rezultāti attēloti kā vidējais mērījums \pm S.E.M no trīs neatkarīgiem eksperimentiem.

* $P < 0.05$ salīdzinājumā ar kontroli

$P < 0.05$ salīdzinājumā ar IFN- γ un LPS datiem

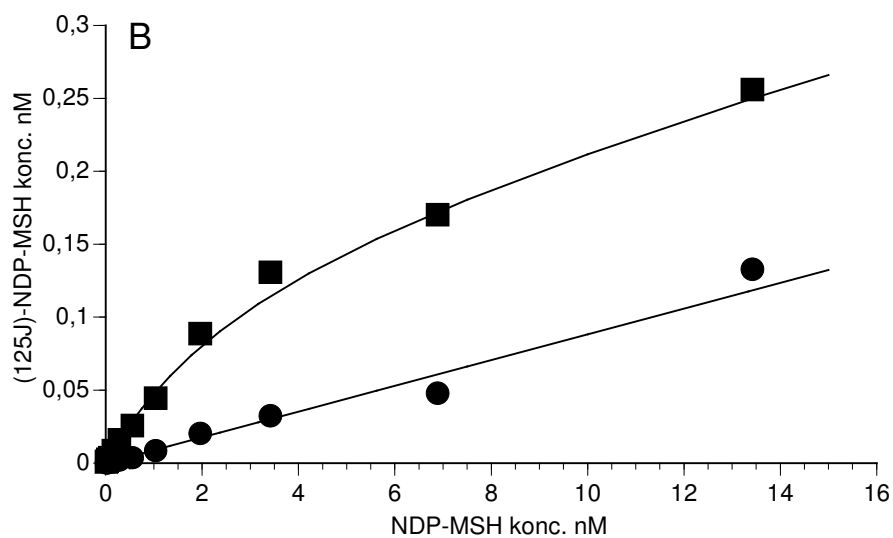
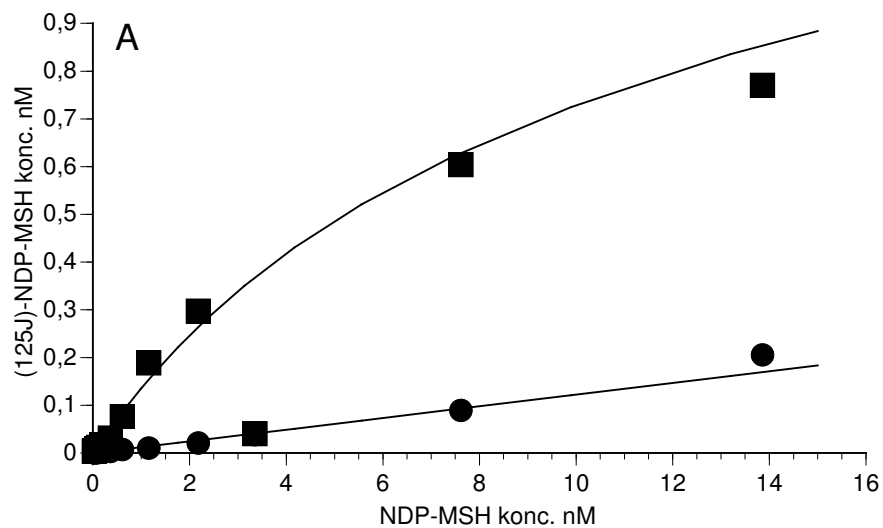
IFN γ koncentrācijās 1 un 5 U/ml pastiprina MKR1 ekspresiju uz šūnu membrānām līdz 1000–1500 saistītšanās vietām uz šūnu. LPS 50 un 100 ng/ml koncentrācijā palielina MKR1 skaitu uz šūnu attiecīgi līdz 800 un 1000. Kā liecina aprēķini, IFN γ ietekme izpaužas spēcīgāk nekā LPS. Pievienojot šūnu barotnei

vienlaikus IFN γ 5 U/ml + LPS 100 ng/ml, abu endotoksīnu efekti nesummējās, bet saglabājās IFN γ raksturīgais efekts.

α -MSH un tā C gala tripeptīds no 1 nM līdz 1 μ M koncentrācijā neietekmēja receptoru skaitu uz šūnu miera stāvoklī 16 stundu laikā (dati nav parādīti), bet stimulētajās šūnās atkarībā no koncentrācijas inhibē MKR pieaugumu. Kā redzams 15. attēlā,

α -MSH 10 nM koncentrācijā normalizē receptoru skaitu uz šūnu, kamēr MSH C gala tripeptīds (MSH11-13) šādu efektu uzrāda 100 reizes lielākā koncentrācijā – 1 μ M. Turklāt α -MSH statistiski ticamas atšķirības uzrāda jau 1 nM koncentrācijā, bet tā C gala tripeptīds – 100 nM koncentrācijā. Ne LPS, ne IFN γ paši nekonkurē ar iezīmēto ligandu NDP-MSH par saistīšanās vietām pie MKR1, un konkurences līknes neveidojas (dati nav parādīti).

16. attēlā parādītas NDP-MSH piesātinājuma līknes, kurām augšējā līkne atspoguļo totālo saistīšanos, bet apakšējā – nespecifisko saistīšanos. Starpība starp šīm līknēm ir specifiskā saistīšanās pie receptoriem. Specifisko saistīšanos var piesātināt, tāpēc tā sasniedz plato stāvokli, bet nespecifiskā saistīšanās (kā redzams no apakšējās līknes) pieaug lineāri, palielinoties iezīmētā liganda koncentrācijai, un nav piesātināma, jo nav atkarīga no receptoru skaita. Nespecifiskā saistīšanās tika noteikta ar 1 μ M neiezīmētā NDP-MSH. Šūnu barotnei pievienotais LPS (100 ng/ml) kopā ar IFN γ (5 darbības vienības/ml) palielināja starpību starp totālās un nespecifiskās saistīšanās līknēm, t.i., palielināja specifisko saistīšanos, sasniedzot specifiskās saistīšanās plato stāvokli ap 0.6–0.7 nM līmenī. Kontroles šūnās receptoru skaits ir mazāks, un tie tiek piesātināti, jau sākot no 0.15 nM (16B attēls). Tālāk NDP-MSH specifiskā saistīšanās nepieaug. Tomēr receptoru skaita izmaiņas neietekmēja radioaktīvā liganda NDP-MSH afinitāti. Abos gadījumos NDP-MSH disociācijas konstante bija $K_d=0.12\pm 0.03$ nM, saistoties ar MKR1. Nespecifiskā saistīšanās NDP-MSH kontroles šūnām un stimulētām šūnām nebija izmainīta. Nespecifiskā saistīšanās, palielinot NDP-MSH koncentrāciju, pakāpeniski pieauga no 0 līdz 0.1 nM.



16. att. NDP-MSH piesātinājuma līknes RAW264.7 šūnās.

16.A. pēc 16 h šūnu stimulācijas ar IFN γ 5 U/ml + LPS 100 ng/ml.

16.B. NDP-MSH piesātinājuma kontroles līknes. Nespecifiskā saistīšanās noteikta ar 1 μ M neiezīmēta NDP-MSH pievienošanu šūnu barotnei.

5. DISKUSIJA

5.1. NDP–MSH un α –MSH saistīšanās kinētika pie MKR

Receptoru-ligandu saistīšanās pētījumiem ir liela nozīme zāļu farmakoloģisko darbības mehānismu izskaidrošanā, jo lielākā daļa vielu nešķērso šūnas membrānu, bet savu darbību veic, iedarbojoties uz šūnas membrānas receptoriem.

Ar G proteīnu saistītiem receptoriem, pie kuriem pieder MKR, tiek piedēvēta liela nozīme farmācijā, jo ļoti daudzas endogēnas vielas iedarbojas uz šiem receptoriem, piemēram, neiromediatori – noradrenālīns, dopamīns, serotonīns, γ –aminosviestskābe u.c., hormoni – adrenalīns, P viela, melanokortīni, opiāti u.c. Endogēno vielu aizstājēji un antagonisti tiek meklēti, izmantojot attiecīgu ligandu–receptoru saistīšanas testus.

B16-F1 šūnu līnija nav vienīgā melanomas līnija, uz kuras atklāti MKR. Ir zināmas daudzas peļu un cilvēku melanomas šūnu līnijas. Starp cilvēku un peļu melanomas šūnām dažreiz novērotas ligandu saistīšanās atšķirības, galvenokārt tās ir atšķirības starp ligandu receptoru disociācijas konstantēm un MKR skaitu uz vienu šūnu. Pētījumi liecina, ka cilvēku melanomas šūnas ekspresē apmēram 10 reizes mazāk MKR kā peļu melanomas šūnas (Siegrist *et al.*, 1988; Siegrist *et al.*, 1989; Eberle *et al.*, 1991; Salazar-Onfray *et al.*, 2002). Tomēr cilvēku melanomas šūnām ir augstāka endogēno ligandu afinitāte salīdzinājumā ar peļu melanomas šūnām (Wong and Minchin, 1996). Ilgstoši iedarbojoties uz šūnu ar augstām agonistu koncentrācijām, var panākt receptoru skaita samazināšanos (*down-regulation*) un nejutību pret receptoru stimulāciju (Siegrist *et al.*, 1994). Līdz šim izmaiņas ligandu saistīšanās kinētikā pie B16-F1 šūnu MKR pēc ilgstošas šūnu stimulācijas nebija aprakstīta. Tomēr šādiem pētījumiem ir būtiska nozīme zāļu meklējumos, jo tad, kad šūnu līnijas tiek izmantotas jaunu vielu skrīningam, ir jāzina liganda-receptoru saistīšanās kinētikas konstantes, inkubēšanas ilgums, asociācijas/disociācijas konstantes, iespējamā receptoru internalizācija un tamlīdzīgi jautājumi. Mūsu eksperimentu rezultāti parādīja, ka specifiskas/nеспецифiskas NDP-MSH saistīšanās pie MKR1 attiecība ir 50:1. Līdzīgi rezultāti ir aprakstīti, pētot cilvēku melanomas šūnas (Eberle *et al.*, 1991). Aprēķinātās α -MSH un NDP-MSH saistīšanās inhibīcijas konstantes B16-F1 šūnās bija līdzīgas 2 h inkubācijas laikā aprēķinātajām konstantēm, izmantojot COS šūnas (Āfrikas zaļo pērtiķu nieru šūnu līnija) (Schiöth *et al.*, 1995). 2 h inkubācijas laiks kā optimāls laiks liganda saskarsmei ar receptoru tika atrasts ar COS-1 un COS-7 šūnu līnijām (Schiöth

et al., 1995). Vēlāk šī metode bez zinātniska pamatojuma empīriski tika pielietota arī dabīgi MKR ekspresējošām šūnām. Plānojot eksperimentus, mēs ņemām vērā literatūrā aprakstīto faktu (Eberle, 1988), ka ne tikai pārbaudāmā viela, bet pati iezīme, ja tā ir agonists, var izmainīt receptoru skaitu uz šūnu. Tā kā uz cilvēku melanomas šūnām MKR skaits nav liels, receptoru skaita zudums varētu radīt situāciju, kad pat NDP-MSH neuzrādītu saistīšanos (Sawyer *et al.*, 1980; Eberle, 1988). Mūsu dati liecina, ka NDP-MSH un α -MSH saistīšanos pie MKR1 uz B16-F1 šūnām raksturo lēna asociācija un disociācija, kā arī receptoru skaita samazināšanās pēc ilgstošas membrānu inkubācijas ar šo hormona piedevu šūnu barotnē. MKR1 internalizācija agonistu ietekmē ir jau aprakstīta (Wong and Minchin, 1996). Autori atklāja, ka NDP-MSH kopā ar receptoru tiek nogādāts lizosomās un degradēts. Receptoru internalizāciju pavada šūnas virspuses receptoru skaita samazināšanās. 96 h laikā netika novērota receptoru atgriešanās no citoplazmas šūnu membrānā un 48 h pēc receptoru stimulācijas ar NDP-MSH bija samazināts MKR mRNA līmenis. Autori (Wong and Minchin, 1996) uzskata, ka NDP-MSH inhibē receptoru riņķojumu (*turnover*). Mūsu pētījumi konkrēti ar B16-F1 šūnu līniju apstiprina faktu, ka MKR1 līmenis ir samazināts pēc ilgstošas šūnu stimulācijas gan ar NDP-MSH, gan ar α -MSH. Tomēr apmēram 14-20% receptoru ir rezistenti, un, kā liecina mūsu mērījumi, tie paliek uz šūnu membrānas pēc 24 h un 48 h. Astondesmitajos gados tika uzskatīts, ka MKR uz cilvēku melanomas šūnām nav pakļauti internalizācijai (Siegrist *et al.*, 1989), tomēr turpmākajos pētījumos, izmantojot imunohistoķīmijas metodi, tika parādīta šo receptoru internalizācija WM266-4 šūnu līnijā un cilvēku melanomas pēcoperācijas materiālā (Xia *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1995). Mūsu pētījumi apliecina, ka jo īpaši svarīgi ir izprast jebkura liganda saistīšanās kinētikas mehānismus. Pielāgojot esošās radioligandu saistīšanās metodes jaunām šūnu līnijām, tās var izmantot jaunu sintētisko un dabas vielu pētījumos. Šūnu līnijas, kas ekspresē receptorus, kuru ligandi ir dabīgie peptīdu hormoni, uz stimulāciju reaģē dažādi – gan ar receptoru ekspresijas palielināšanu, gan nomākšanu. Zinātniskajā literatūrā (Siegrist *et al.*, 1994) ir aprakstīts, ka - atkarībā no šūnu tipa un fizioloģiskiem apstākļiem - šūnās notiek gan receptoru skaita palielināšanās (*up-regulation*), gan samazināšanās. Dažādas cilvēku un grauzēju melanomas šūnu līnijas pēc to stimulācijas ar augstu α -MSH koncentrāciju var uzrādīt MKR1 koncentrācijas gan pieaugumu, gan samazināšanos attiecībā pret totālo šūnas proteīnu daudzumu. Kopumā var secināt, ka

no eksperimentiem ar MKR DNS transfektētām COS šūnām adoptētā radioligandu saistīšanās metode ir piemērojama arī B16-F1 šūnu līnijai.

5.2. Cilvēku ādas primāro fibroblastu MKR1 raksturojums

Nesen tika pierādīta MKR1 ekspresija cilvēku fibroblastos (Bohm *et al.*, 1999), kuri tika iegūti no jaundzimušo zēnu dzimumlocekļa priekšādiņas. MKR1 tika atrasts arī dermālās papillas šūnās, matu folikulos un saistaudu fibroblastos (Bohm *et al.*, 1999; Catania *et al.*, 2004; Bohm and Luger, 2004). Apgrieztās transkriptāzes polimerāzes reakcijā (*Reverse transcriptase polymerase chain reaction - RT-PCR*) no visiem klonētajiem MKR apakštīpiem tika pierādīta tikai MKR1 ekspresija fibroblastos un atklāts, ka α -MSH modulē ādas kolagēna ekspresiju (Bohm and Luger, 2004), uzrāda antifibrogēnu efektu (Bohm *et al.*, 2006) un inhibē audzēju nekrozes faktora α (TNF α) signālus (Hill *et al.*, 2006). Neonatālās priekšādiņas šūnās tika parādīta MKR1 imunoreaktivitāte un NDP-MSH saistīšanās vietas (Bohm and Luger, 2004). Tomēr pēc 30 pasāžām *in vitro* barotnēs MKR1 ekspresija samazinājās un šūnu membrānās pat nebija atrodamā (Bohm and Luger, 2004). Mēs radioligandu saistīšanās eksperimentos atklājām vēl ātrāku – pēc 6 pasāžām - membrānu receptoru zudumu uz pieaugušu cilvēku ādas primārajiem fibroblastiem. Iespējams, cilvēka vai dzīvnieka, no kura ādas tiek ņemtas šūnas, vecumam arī ir nozīme primāro šūnu kultivēšanā mākslīgās barotnēs. Ar imunoķīmijas metodēm tika pierādīts, ka MKR1 saglabājas atsevišķās fibroblastu šūnās citoplazmā (Bohm *et al.*, 2004), kur tos nerasniedz iezīmētais peptīds. Receptoru internalizācija jau iepriekš bija parādīta melanomas šūnās (Xia *et al.*, 1995). Mēs noteicām, ka cAMP stimulācija fibroblastos ir novērojama tik ilgi, kamēr šūnas ekspresē MKR1 uz savas membrānas. Tas liecina, ka šūnu citoplazmā esošie receptori nav funkcionāli aktīvi. Dažādi augšanas hormoni un faktori modulē receptoru ekspresiju un signālmolekulu izdalīšanos. Ir atklāts, ka fibroblastos notiek POMK šķelšana, un endogēni veidojas AKTH, α -MSH un β -endorfīns (Schiller *et al.*, 2001; Bohm and Luger, 2004), kuri varētu kalpot kā autokrīni/parakrīni receptoru ekspresijas modulatori. Tomēr mūsu eksperimentā fibroblastiem pievienotais α -MSH nespēja atjaunot šo šūnu funkcionalitāti, kura pēc sešām pārsēšanas reizēm bija zudusi. Tas, ka primārām šūnām ir vajadzīga endogēna šūnu sadarbība audos, ir apliecināts arī citos eksperimentos. Transgēnām pelēm, kurām ir MKR1 deficīts, nenovēroja nekādus ādas bojājumus, kaut gan normāliem dzīvniekiem visās ādas šūnās tiek ekspresēts MKR1, un

MKR1 ir pierādīta svarīga loma ādas funkcionēšanā (Robbins et al., 1993). Šis novērojums ļauj izteikt hipotēzi, ka organismam piemīt pašārstēšanās spēja un vienu bojātu signālceļu vietā pastiprinās citu signālceļu darbību. Ārpus organisma šūnu kultūras nesaņem citu šūnu palīdzību, un visu signālmolekulu komplektu mākslīgās barotnes nenodrošina.

5.3. Spantīda I saistīšanās pie MKR1 un ietekme uz NO līmeni

Veicot liela mēroga vielu kombinatoriālo bibliotēku skrīningu, tika atklāts, ka mazākā peptīda struktūra, kura stimulē vārdes ādas pigmentāciju ar MKR1 starpniecību, ir aminoskābju ķēdīte *D*Trp-Nle-NH₂ un *D*Trp-Arg-NH₂ (Quillan, 1995). Tika skrīnētas lielas peptīdu struktūru datu bāzes, lai atrastu peptīdus, kuri satur šādu motīvu. Teorētiski tika atrasts, ka P vielas, neirotenzīna, endotelīna sintētiskie analogi un vēl citi peptīdi varētu būt MKR ligandi (Quillan and Sadee, 1996). Tomēr ligandu-receptoru saistīšanās visiem minētajiem peptīdiem netika eksperimentāli pārbaudīta. P vielas antagonists spantīds I, kuram arī tika paredzēta spēja saistīties ar MKR, uzrāda melanokortīniem līdzīgu pretiekaisuma darbību (Annuziata *et al.*, 2001). Tāpēc mēs savos pētījumos iekļāvām spantīdu I un P vielu. P vielai ar melanokortīniem ir līdzīgas atrašanās vietas uz imūnās sistēmas šūnām (Neumann-Andersen *et al.*, 2001; Wikberg *et al.*, 2000; van Hagen *et al.*, 1999; Bae *et al.*, 2002). Spantīds I tika sintezēts jau 1984. gadā (Folkers *et al.*, 1984). Vēlāk sintezētie, strukturāli līdzīgie spantīds II un III bija mazāk neirotoksiski nekā spantīds I (Hakanson *et al.*, 1991; Folkers *et al.*, 1993). Tomēr spantīds I joprojām tiek izmantots kā laboratorijas viela, lai analizētu P vielas darbības mehānismus. Bez tam spantīds I atbrīvo histamīnu un ir izmantojams pētījumos par dzīvnieku elpošanas traucējumiem (Telgkamp *et al.*, 2002). Iepriekš publicētajos pigmentācijas testos spantīds I inhibēja α -MSH stimulēto pigmentu dispersiju vārdes melanoforos ar inhibīcijas koncentrāciju (IC₅₀) 483 ± 189 nM (Quillan and Sadee, 1996), bet neietekmēja cAMF līmeni. P viela neietekmēja α -MSH efektus pat 100 μ M koncentrācijā (Quillan and Sadee, 1996). Mūsu eksperimentos P viela nesaistījās pie MKR, savukārt spantīds I, kaut ar zemu afinitāti, tomēr saistījās pie visiem MKR ar izteiktu selektivitāti pret MKR1. Šie rezultāti apliecina teorētiskas ligandu-receptoru mijiedarbības paredzēšanas modeļu lietderību jaunu ligandu meklējumos. Turpmākajos pētījumos mēs noteicām MKR lomu spantīda I pretiekaisuma darbībā. Tika parādīts, ka spantīds I līdzīgi α -MSH spēj inhibēt LPS-

izraisīto NO pārprodukciju RAW264.7 makrofāgu šūnu līnijā. Neselektīvs MKR antagonists HS024 spēja antagonizēt spantīda I efektus. Tomēr spantīda I darbības pētījumā bija vajadzīga 10 reizes lielāka HS024 koncentrācija, lai panāktu ar α -MSH līdzīgu NO produkcijas nomākšanas inhibīciju. Tādējādi tika parādīta MKR loma spantīda I pretiekaisuma darbības mehānismā. Šie atklājumi apliecina atšķirīgu receptoru ģimeņu (melanokortīnu un neurokinīnu) sadarbības spēju (*cross-talk*).

5.4. Dinorfīnu saistīšanās pie MKR raksturojums

Endogēnos opiātus pārstāv enkefalīni, endorfīni un dinorfīni (Akil *et al.*, 1984). Ar opiātreceptoriem nesaistītas dinorfīnu saistīšanās vietas ir atklātas dažādos audos, bet šīs saistīšanās vietas nav identificētas kā konkrēti receptori. 1997.gadā tika parādīta dinorfīnu spēja inhibēt α -MSH izraisīto cAMF stimulāciju ar cilvēku MKR gēnu DNS transkriptētās šūnās (Quillan and Sadee, 1996). Šis atklājums iniciēja mūsu pētījumus par dinorfīnu saistīšanos pie MKR. Bez tam MKR sadarbība ar opiāt-erģisko sistēmu ir vairākārtīgi parādīta dažādos sāpju modeļos eksperimentāliem dzīvniekiem (Vriten *et al.*, 2001, Klusa *et al.*, 2001; Catania *et al.*, 2004). Pētījuma rezultāti liecina par īpatnēju dinorfīnu saistīšanās pie MKR veidu. Dinorfīni saistījās pie MKR ar zemu afinitāti ($K_i \approx \mu\text{M}$), kas ir pretrunā ar agrāk publicēto dinorfīnu spēju inhibēt cAMF līmeni ar IC_{50} 40–150 nM (Quillan and Sadee, 1996). Tomēr atklājums, ka dinorfīni, kas ir strukturāli no melanokortīniem ļoti atšķirīgi peptīdi, spēj saistīties ar MKR, ir nozīmīgs, jo patoloģiskās situācijās audos lokālais dinorfīnu līmenis ir augsts un saistīšanās pie citas saimes receptoriem ir reāla (Przewlocki and Przewlocka, 2001). Svarīgs secinājums ir arī tas, ka dinorfīnu struktūru var uzskatīt par modeļsavienojumu, uz kura pamata veidot jaunas peptīdu struktūras ar mērķi atrast jaunus MKR ligandus.

5.5. MSH11–13 un tā analogu ietekme uz MKR mediētajiem

procesiem šūnās

5.5.1. MSH11–13 ietekme uz MKR1 lokalizāciju makrofāgu šūnu membrānās

1989. gadā tika publicēts pētījums (Kameyama *et al.*, 1989) par ādas pastiprinātas pigmentācijas cēloni (pastiprināta pigmentācija dažreiz veidojas kā iekaisuma sekas). Šajā pētījumā pirmo reizi tika pieminēta $\text{IFN}\gamma$ spēja kopā ar α -MSH

(bet ne atsevišķi) stimulēt melanīna sintēzi JB/MS melanomas šūnās un vienlaikus stimulēt MK receptoru ekspresiju melanocītos. Ar šādu α -MSH potencējošo darbību tika skaidrots IFN γ efekts uz pigmentu sintēzi pēciekaisuma periodā. Par MSH11–13 spēcīgo pretiekaisuma darbību ir daudz publikāciju (Catania *et al.*, 2004; Mandrika *et al.*, 200; Cone, 2006). Tomēr joprojām nav atrasti receptori, uz kuriem MSH11–13 darbojas. Līdz šim vēl nav atklāts šī tripeptīda primārais mērķobjekts šūnas membrānā. Eksperimentos ar peļu makrofāgu šūnu līniju RAW264.7 pēc to stimulācijas ar endotoksīniem mēs pirmo reizi parādījām MSH11-13 netiešo saistību ar MKR-erģiskiem procesiem, par ko liecina atklātā tripeptīda spēja regulēt MK receptoru skaitu uz šūnu. Tomēr bija vajadzīga apmēram 100 reižu lielāka MSH11-13 koncentrācija, lai iegūtu efektu, kādu dod α -MSH šajā iekaisuma modelī. Šajā darbā pētītajām vielām α -MSH un tā C gala fragmentam ir kopīgas un atšķirīgas īpašības. Iespējams, makrofāgu šūnā eksistē atgriezeniskās saites mehānisms, kuru regulē signālmolekulu līmeņu izmaiņas, kas notiek šūnas iekšpusē. Ir zināms, ka dabīgie MSH peptīdi stimulē cAMF veidošanos šūnās, kas tālāk pārnes signālu šūnas iekšpusē. Tomēr MSH11-13 nestimulē cAMF veidošanos (Mandrika *et al.*, 2001) tāpēc iespējams, ka MSH11-13 gadījumā tiek iesaistītas citas signālmolekulas, piemēram, NO, jo iepriekšējos pētījumos tika parādīta MSH11-13 NO pārmērīgas producēšanās inhibīcijas spēja (Mandrika *et al.*, 2001; Wikberg *et al.*, 2000).

Kā bija sagaidāms, LPS un IFN γ ir MKR1 svešas struktūras molekulas un pie MKR nesaistās – to pierādīja konkurences eksperimenti ar iezīmēto NDP-MSH. LPS un IFN γ darbojas uz šūnu, saistoties attiecīgi pie saviem šūnas membrānas receptoriem. Endotoksīni LPS un IFN γ nekonkurē un arī alostēriski nesaistās pie MKR1. Par to liecina iegūtie dati, kas parāda, ka NDP-MSH afinitāte netika ietekmēta. Tomēr ar LPS un IFN γ stimulētiem makrofāgiem piesātinājuma līknes parādīja aptuveni trīs reizes augstāku NDP-MSH specifisko saistīšanos, tas pierāda, ka uz stimulētām šūnām ir lielāks receptoru skaits nekā uz kontroles šūnām.

Pēc šī pētījuma var secināt, ka MKR ekspresija uz RAW264.7 šūnām ir dinamiska un mainās atkarībā no tā, vai šūnas ir miera vai stimulētā stāvoklī. Iekaisuma modelī MKR1 skaits šūnu membrānās pieaug. IFN γ spēcīgāk nekā LPS izraisa MKR1 ekspresijas pieaugumu. Savukārt α -MSH un MSH11-13 spēj regulēt MKR ekspresiju makrofāgu līnijā RAW264.7, lielākās koncentrācijās pat normalizējot receptoru skaitu uz šūnu.

Iespējams, ka MKR skaita pieaugums iekaisuma apstākļos veicina šūnas aizsargmehānismu ieslēgšanos, sekundāro signālmolekulu atbrīvošanos un makrofāgu atbildētspēju uz MKR ligandu stimulāciju.

5.5.2. MSH11–13 un tā analogu stereouzbūves loma

Šūnu intracelulāro signālceļu krustošanās un daudzpusīgā melanokortīnu bioloģiskā aktivitāte liek uzdot jautājumu – vai vienmēr melanokortīnu novērotie efekti ir MKR stimulācijas sekas? Vēsturiski pirmā viela, kas raisīja šaubas, bija MSH11–13. Pirmkārt, šis tripeptīds nesaistās ar MKR un neietekmē cAMF līmeni. Otrkārt, Mugridge *et al.* (1991) ziņoja, ka α -MSH un MSH11-13 inhibē iezīmētā interleikīna IL-1 β saistīšanos pie pirmā tipa citokīnu receptoriem un pat pieļāva domu, ka abi peptīdi varētu būt endogēnie IL-1 antagonisti. Samērā neskaidra ir aina par MSH11–13 ietekmi uz cAMF sintēzi šūnās, jo peļu mikroglijas šūnu līnijā N9 un sēnēs *Candida albicans* ir aprakstīta MSH11–13 spēja paaugstināt cAMF līmeni (Delgado *et al.*, 1998; Cutuli *et al.*, 2000), taču pētījumos ar transfektētām šūnām un dabīgi ekspresējošām MKR1 melanomas šūnām tas nav parādīts.

Pētījumos ar B16–F1 un RAW264.7 šūnām mēs atklājām, ka vienīgi MSH11–13 analogs cikliskais peptīds ciklo(Ac-Lys-Pro-DVal) – kaut gan nesaistījās pie MKR – tomēr uzrādīja tendenci stimulēt cAMF veidošanos. Arī agrāk ir konstatēts, ka zemas afinitātes vielas spēj stimulēt cAMF sintēzi. Piemērs ir RO27-3325 un P21, kuri uzrādīja ļoti zemu afinitāti pret MKR, bet stimulēja cAMF veidošanos ar EC₅₀ apmēram 1 nM koncentrācijā (Wikberg *et al.*, 2000). Tomēr šajā gadījumā arī cAMF stimulācija notika μ M koncentrācijā. Līdzīgi N9 un *Candida albicans* novērotā MSH11–13 spēja stimulēt cAMF produkciju tika aprakstīta tikai augstā koncentrācijā 1–10 μ M (Delgado *et al.*, 1998; Cutuli *et al.*, 2000).

Lineārie MSH11–13 analogi ar DVal¹³ ir aprakstīti kā aktīvāki pretiekaisuma peptīdi par L formas peptīdiem (Watanabe *et al.*, 1993). Arī Watanabe *et al.* pētījumos ciklo(Ac-Lys-Pro-DVal) bija izteikti iedarbīgāks par lineāro peptīdu ar LVal. Mūsu eksperimentos tika pārbaudīta MSH11–13 un tā analogu ietekme uz NO veidošanos peļu makrofāgu līnijā RAW264.7. NO sintēze iekaisuma modelī ir atkarīga no iNOS aktivitātes. Nestimulētie makrofāgi sintezē maz NO, savukārt LPS/IFN γ izraisīja 50-kārtīgu NO sintēzes pieaugumu. Tik augsts NO līmenis ir novērots patofizioloģiskos stāvokļos kā iekaisums vai sepse un var būt bīstams saimnieka organismam (Szabo *et*

al., 1995; Nathan et al., 1994). Daļēja NO līmeņa samazināšana saglabātu NO patogēnu nonāvēšanas spēju, bet nekaitētu saimnieka organismam. Mēs atklājām, ka MSH11-13 un tā analogi samazina NO pārprodukciju apmēram par 60% un to darbībā izpaužas stereostruktūras nozīme, jo peptīdi ar D aminoskābēm (DVal) bija aktīvāki par LVal saturošiem peptīdiem. Cikliskie peptīdi uzrādīja zemāku NO līmeņa inhibīcijas spēju kā lineārais MSH11-13. N gala acetilgrupai nebija ietekmes uz MSH11-13 darbību. Secinājums ir, ka NO pārprodukcijas inhibīcija ar MSH11-13 un tā analogiem nav saistīta ar MKR receptoriem un cAMF signālceļiem.

Arī agrāk literatūrā (Wikberg *et al.*, 2000; Mandrika *et al.*, 2001) tika izteikta hipotēze par MKR neatkarīgiem signālpārneses ceļiem MSH11–13 darbībā.

MSH peptīdu pretiekaisuma darbība tiek pētīta kopš pagājušā gadsimta astoņdesmitajiem gadiem. Tomēr īsti noskaidrots to pretiekaisuma darbības mehānisms nav. Ir pierādījumi par NF- κ B kā atslēgas posma lomu, kurš ir noteicošais citokīnu un iNOS ekspresijas regulators (Manna and Aggarwal, 1998).

Visu šo pētījumu rezultātā secinām, ka MKR ligandiem ir tik liela loma ādas bioloģijas fundamentālajos pētījumos, kā arī zāļu potenciālā klīniskajā dermatoloģijā, ka MSH11-13 un tā analogi tiek pētīti paralēli citiem MK mimētiķiem pat nezinot pie kādiem receptoriem MSH11-13 saistās (Bohm *et al.*, 2006). Tomēr mūsu atklājums par MSH11-13 spēju regulēt MKR1 ekspresiju ar LPS un IFN γ stimulētiem makrofāgiem pieļauj MSH11-13 vēl neatklātu mijiedarbību ar MKR.

To, ka liganda atbilstība receptora receptoru saistīšanās vietai (*binding pocket*) ir ļoti neprognozējama, apstiprina jaunākie MSH11-13 analogu pētījumi, kuros tomēr tika atklāts MKR saistīšanās motīvs MSH peptīda C galā. Izrādījās, ka ar Tyr-atlikumu pagarinātais MSH11-13 (tetrapeptīds) uzrādīja MKR1 saistīšanās spēju (Schiöth *et al.*, 2006). Šie pētījumi sasaucas ar šeit aprakstītajiem atklājumiem par MK neradniecīgas struktūras peptīdu spantīda I un dinorfīnu spēju saistīties ar MKR, kas liecina, ka MKR vidus fragments nebūt nav vienīgā MKR saistīšanās vietai atbilstošā aminoskābju struktūra.

6. SECINĀJUMI

1. No eksperimentiem ar transfektētām COS šūnām adoptētā radiolioganda NDP-MSH saistīšanās metode ir piemērojama dabīgi MKR ekspresējošām peļu šūnu līnijām B16-F1 un RAW264.7, kā arī primārajiem cilvēku ādas fibroblastiem. Pēc ilgstošas (līdz 48 h) peļu melanomas šūnu līnijas B16-F1 stimulācijas ar MKR agonistiem NDP-MSH un α -MSH, novēro MKR skaita samazināšanos uz šūnu membrānām, taču 14-20% MKR saglabājas intakti.
2. Baktēriju lipopolisaharīdi (LPS) un interferons γ (IFN γ) paaugstina MKR skaitu uz peļu makrofāgu šūnu RAW264.7 virsmas un izraisa NO pārprodukciju, kas liecina par iekaisuma procesu aktivēšanu. α -MSH un tā C gala fragments MSH11-13 uzrāda pretiekaisuma darbību *in vitro*, jo inhibē LPS un IFN γ efektu, samazinot MKR blīvumu un NO līmeni šūnās.
3. Mākslīgās šūnu barotnēs kultivētas no cilvēku ādas izolētās primārās fibroblastu šūnas 6 pasāžu laikā zaudē MKR uz šūnu virsmas, kā arī cAMF veidošanas spēju.
4. MK struktūrai neradniecīgi peptīdi - P vielas receptoru antagonists spantīds I un κ opiātreceptoru ligandi dinorfīni – saistās pie MKR *in vitro*. Spantīds I saistās pie MKR ar zemu afinitāti un selektivitāti pret 1. apakštipu. Pierādīta MKR loma spantīda I pretiekaisuma darbībā, jo MKR antagonists HS024 bloķē spantīda I NO pārprodukcijas inhibīciju. Atklāts, ka dinorfīni saistās pie MKR īpatnējā veidā ar līdzīgu afinitāti pie MKR pāriem. Šie dati apliecina MKR, SP un κ opiātreceptoru ligandu savstarpēju mijiedarbību, kas klīniski varētu izpausties kā šo vielu blaknes.
5. MSH11-13 un tā sintētiskie analogi nesaistās ar MKR un nestimulē cAMF veidošanos *in vitro*, taču inhibē NO pārprodukciju peļu makrofāgu šūnu līnijā RAW264.7. Atklātas struktūras-aktivitātes determinantes, kas nosaka MSH11-13 analogu NO pārprodukcijas inhibīcijas efektivitāti: lineārie peptīdi ir aktīvāki par cikliskajiem un peptīdi ar DVal struktūrā ir aktīvāki par LVal saturošiem peptīdiem.. Peptīdu NO produkcijas inhibīcijas spēja sarindojas: α -MSH > Ac-MSH11-13 (I) = H-MSH11-13 (II) > IV > III > V = VI. Atklātās struktūras determinantes varētu izmantot arī nepeptīdu organisko vielu sintēzei, lai iegūtu jaunus pretiekaisuma līdzekļus.

7. PATEICĪBAS

Šis darbs tika finansēts no LZP granta 05.1419 un ESF pēcdoktorantūras granta līdzekļiem.

Pateicos v/a Latvijas Organiskas Sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītājam Dr.farm. Maijai Dambrovai un visam laboratorijas kolektīvam par pētnieciskā darba iemaņu iemācīšanu, kā arī materiālu un idejisku atbalstu visā mana promocijas darba laikā, arī kopīgām ekskursijām.

Īpaši pateicos Rūdolfam Mežapuķem un Olgai Žarkovai par palīdzību radioligandu saistīšanās eksperimentos.

Pateicos Edgaram Liepiņam par priekšzīmi farmācijas doktora grāda iegūšanā.

Pateicos Līgai Zvejniecei par iesaistīšanu līdzautoros savās publikācijās un konferenču ziņojumos.

Pateicos LU MF dekanāta darbiniecēm, īpaši Dacei Osītei par grāmatvedības lietu kārtošanu.

Pateicos Guntai Strazdai un Ingrīdai Kalviņai par doktorantūras un ESF lietu kārtošanu.

Pateicos peptīdu ķīmiķiem no Eotvos universitātes Ungārijā, kuri sintezēja MSH11-13 analogus.

Pateicos savai ģimenei.

Pateicos LU Medicīnas fakultātes Farmācijas programmas docētāju nelielajam kolektīvam - prof. Rutai Muceniecei, Kristīnei Saleniecei un Unai Riekstiņai par izpratni un palīdzību visos promocijas darba posmos.

Pateicos LU Medicīnas fakultātes profesorei R.Ligerei par padomiem disertācijas rakstīšanā un noformēšanā.

8. LITERATŪRA

Citēti 177 literatūras avoti.

- Airaghi L, Capra R, Pravettoni G, Maggiolo F, Suter F, Lipton JM, Catania A. (1999) Elevated concentrations of plasma alpha-melanocyte stimulating hormone are associated with reduced disease progression in HIV-infected patients. *J. Lab. Clin. Med.*, 133:309-315.
- Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walter JM. (1984) Endogenous opioids: Biology and functions. *Ann. Rev. Neurosci.*, 7:223-255.
- Alvaro JD, Tatro JB, Quillan JM, Fogliano M, Eisenhard M, Lerner MR, Nestler EJ, Duman RS. (1996) Morphine down-regulates melanocortin-4 receptor expression in brain regions that mediate opiate addiction. *Mol. Pharm.*, 50:583-591.
- Annunziata P, Cioni C, Santonini R, Paccagnini E. (2002) Substance P antagonist blocks leakage and reduces activation of cytokine-stimulated rat brain endothelium. *J. Neuroimmunol.*, 131:41-49.
- Argiolas A. (1999) Neuropeptides and sexual behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23: 1127-1142.
- Argiolas A, Melis MR, Murgia S, Schioth HB. (2000) ACTH- and alpha-MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors. *Brain Res. Bull.*, 51: 425-431.
- Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Tanaka Y, Hamazaki Y, Shimizu K, Katanyama I. (2002) Substance P induced preprotachykinin-a mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 127(4): 316-321.
- Balse-Srinivasan P, Grieco P, Cai M, Trivedi D, Hruby VL. (2003) Structure-activity relationships of novel cyclic alpha-MSH/beta-MSH hybrid analogues that lead to potent and selective ligands for the human MC3R and human MC5R. *J. Med. Chem.*, 17: 3728-3733.
- Benoit SC, Schwartz MW, Lachey JL, Hagan MM, Rushing PA, Blake KA, YagaloffKA, Kurylko G, Franco L, Danhoo W, Seeley RJ. (2000) A novel selective melanocortin-4 receptor agonist reduces food intake in rats and mice without producing aversive consequences. *J. Neurosci.*, 20: 3442-3448.
- Beyer C, Kaufmann K, Wehner F. (1990) Importance and function of the melanocyte-stimulating hormone in malignant melanoma. Importance of MSH. *Dermatol. Monatsschr.*, 176: 589-596 Review, (in German).

- Biebermann H, Krude H, Elsner A, Chubanov V, Gudermann T, Gruters A. (2003) Autosomal-dominant mode of inheritance of a melanocortin-4-receptor mutation in a patient with severe early-onset obesity is due to a dominant-negative effect caused by receptor dimerization. *Diabetes*, 52: 2984-2988.
- Blabock JE, Harbour-McMenamin D, Smith EM. (1985) Peptide hormone shared by the neuroendocrine and immunological systems. *J. Immunol.*, 135 (suppl.): 858-861.
- Bloom FE, Battenberg EL, Shibasaki T, Benoit R, Ling N, Guillemin R. (1980) Localization of gamma-melanocyte stimulating hormone (gamma MSH) immunoreactivity in rat brain and pituitary. *Regul. Pept.*, 1: 205-222.
- Bohm M, Metze D, Schulte U, Becher E, Luger TA, Brzoska T. (1999) Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and *in situ*. *Exp. Dermatol.*, 8: 453-461.
- Bohm M, Luger TA. (2004) Melanocortins in fibroblast biology – current update and future perspective for dermatology. *Exp. Dermatol.*, 13:16-21.
- Bohm M, Luger TA, Tobin DJ, Garcia-Borrón JC. (2006) Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *J. Invest. Dermatol.*, 126:1966-1975.
- Boston BA, Cone RD. (1996) Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology*, 137: 2043-2050.
- Boston BA. (1999) The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann. NY Acad. Sci.*, 885: 75-84.
- Buggy JJ. (1998) Binding of α -melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. *Biochem. J.*, 331: 211-216.
- Butler AA, Cone RD. (2002) The melanocortin receptors: lessons from knockout models. *Neuropeptides*, 36:77-84.
- Catania A, Lipton JM. (1998) Peptide modulation of fever and inflammation within the brain. *Ann. NY Acad. Sci.*, 856: 62-68.
- Catania A, Rajora A, Capsoni F, Minonzio F, Star RA, Lipton JM. (1996) The neuropeptide α -MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis *in vitro*. *Peptides*, 17: 675-679.
- Catania A, Cutuli M, Garofalo L, Airaghi L, Valenza F, Lipton JM, Gatinoni L. (2000) Plasma concentrations and anti-L-cytokine effects of α -melanocyte stimulating hormone in septic patients. *Crit. Care Med.*, 28: 1403-1407.

- Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM. (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol. Rev.*, 56: 1-29.
- Catania A, Grieco P, Randazzo A, Novellino E, Gatti S, Rossi C, Colombo G, Lipton JM. (2005) Three-dimensional structure of the α -MSH-derived candidacidal peptide [Ac-CKPV]₂. *J. Peptide Res.*, 66: 19-26.
- Cepoi D, Phillips T, Cismowski M, Goodfellow VS, Ling N, Cone RD, Fan W. (2004) Assessment of a small molecule melanocortin-4 receptor-specific agonist on energy homeostasis. *Brain. Res.*, 1000(1-2):64-71.
- Chai B, Li JY, Zhang W, Ammori JB, Mulholland MW. (2007) Melanocortin-3 receptor activates MAP kinase via PI3 kinase. *Regul. Pept.*, 139(1-3):115-121.
- Chagnon YC, Chen WJ, Perusse L, Hagnon M, Nadeau A, Wilkinson W, Bouchard C. (1997) Linkage and association studies between the melanocortin receptors 4 and 5 genes and obesity-related phenotypes in the Quebee family study. *Mol. Med.*, 3: 663-673.
- Chhajlani V, Wikberg JES. (1992) Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.*, 309: 417-420.
- Chhajlani V, Muceniece R, Wikberg JE. (1993) Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195: 866-873.
- Chhajlani V. (1996) Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem. Biol. Int.*, 38: 73-80.
- Chiao H, Kohda Y, McLeroy P, Craig L, Linas S, Star RA. (1998) Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits renal injury in the absence of neutrophils. *Kidney Int.*, 54: 765-774.
- Cho MK, Lee CJ, Lee CH, Li SZ, Lim SK, Baik JH, Lee W. (2005) Structure and function of the potent cyclic and linear melanocortin analogues. *J. Struct. Biol.*, 150(3): 300-308.
- Cone RD. (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr. Rev.*, 27(7):736-749.
- Cragolini A, Scimonelli T, Celis ME, Schiöth HB. (2000) The role of melanocortin receptors in sexual behaviour in female rats. *Neuropeptides*, 34: 211-215.
- Cremer C, de Barioglio SR, Civallero G, Celis ME. (1995) Alpha-MSH-induced behaviour: changes after diazepam and baclofen administration related with cyclic AMP levels. *Peptides*, 16: 821-825
- Cutuli M, Cristiani S, Lipton JM, Catania A. (2000) Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides. *J. Leukoc. Biol.*, 67: 233-239.

- Delgado R, Carlin A, Airaghi L, Demitri MT, Meda L, Galimberti D, Baron P, Lipton JM, Catania A. (1998) Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J. Leucoc. Biol.*, 63: 740-745.
- Dores RM, Cameron E, Lecaude S, Danielson PB. (2003) Presence of the delta-MSH sequence in a proopiomelanocortin cDNA cloned from the pituitary of the galeoid shark, *Heterodontus portusjacksoni*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1:71-79.
- Dunbar JC, LU H (1999) Leptin-induced increase in sympathetic nervous and cardiovascular tone is mediated by proopiomelanocortin (POMC) products. *Brain Res.*, 50: 215-221.
- Eberle AN (1998) The Melanotropins: Chemistry, Physiology and Mechanisms of Action. *Karger, Basel*, pp 556.
- Eberle AN, Verin VJ, Solca F, Siegrist W, Kuenlin C, Bagutti C, Stutz S, Girard J. (1991) Biologically active monoiodinated α -MSH derivatives for receptor binding sites studies using human melanoma cells. *J. Receptor Res.*, 11:311-322.
- Elliott RJ, Szabo MJ, Wagner EH, Kemp S, MacNeil & J.W. Haycock. (2004) Alpha-Melanocyte-stimulating hormone, MSH 11-13 KPV and adrenocorticotrophic hormone signaling in human keratinocyte cells. *J. Invest. Dermatol.*, 122: 1010-1019.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hryby VJ, Cone RD (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 385: 165-168
- Frändberg PA, Muceniece R, Prusis P, Wikberg J, Chhajlani V. (1994) Evidence for alternate points of attachment for alpha-MSH and its stereoisomer [Nle⁴,D-Phe⁷]-alpha-MSH at the melanocortin-1 receptor. *Biochem. Biophys. Commun.*, 202: 1266-1271
- Frändberg Per-Anders. (1998) Mutational analysis of melanocortin receptor 1 and 5. *Acta Univ. Ups. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertation from the Faculty of Pharmacy 186*, Uppsala, ISBN 91-554-4241-2, pp 36.
- Folkers K, Hakanson R, Hong J, Xu JC, Leander S. (1984) Biological evaluation of Substance P antagonists. *Br. J. Pharmacol.*, 83: 449-456.
- Folkers K, Hakanson R, Feng D, Xu JC, Janecka A, Wang Z. (1993) Spantide III, a superior tachykinin antagonist with high potency and negligible neurotoxicity. *Amino Acids*, 5: 233-240.
- Fuchs RF (1912) Die physiologische function des chromatophorsystems als organ der physikalischen wärmeregulierung der poikilothermem. *Sitzungsberichte der physikalisch-medezinischen sozietät in erlangen*, 44: 134-177.

- Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson SJ, DelValle J, Yamada T. (1993) Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J. Biol. Chem.*, 268: 8246-8250.
- Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ, DelValle J, Yamada T. (1993b) Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J. Biol. Chem.*, 268: 15174-15179.
- Getting SJ, Gibbs L, Clark AJ, Flower RJ, Perretti M (1999) POMC gene-derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages, suppress cytokine release, and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation. *J. Immunol*, 162: 7446-7453
- Grieco P, Lavecchia A, Cai M, Trivedi D, Weinberg D, MacNeil T, Van der Ploeg LH, Hruby VJ (2002) Structure-activity studies of the melanocortin peptides: discovery of potent and selective affinity antagonists for the hMC3 and hMC4 receptors. *J. Med. Chem.*, 24: 5287-5294
- Griffon N, Mignon V, Facchinetti P, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P. (1994) Molecular cloning and characterization of the rat fifth melanocortin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200(2):1007-1014.
- Guarini S, Bini A, Bazzani C, Ricigliano GM, Cainazzo MM, Tomasi A, Bertolini A. (1997) Adrenocorticotropin normalizes the blood levels of nitric oxide in hemorrhage-shocked rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 336: 15-21.
- Guarini S, Bazzani C, Cainazzo MM, Mioni C, Ferrazza G, Vergoni AV, Schioth HB, Wikberg JE, Bertolini A. (1999) Evidence that melanocortin 4 receptor mediates hemorrhagic shock reversal caused by melanocortin peptides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291:1023-1027.
- Giuliano FO. (2004) Control of Penile Erection by the Melanocortinergetic System: Experimental Evidences and Therapeutic Perspectives. *Journal of Andrology*, 25:115-120.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, 126, 131-138,.
- Haddad JJE, Lauterbach R, Saade B, Safieh-Garabedian & SC. Land. (2001) α -Melanocyte-related tripeptide, Lys- D-Pro-Val, ameliorates endotoxin-induced nuclear factor κ B translocation and activation: evidence for involvement of an interleukin-1 β ¹⁹³⁻¹⁹⁵ receptor antagonism in the alveolar epithelium. *Biochem. J.*, 355: 29-38.
- Hadley ME, Dorr RT. (2006) Melanocortin peptide therapeutics: historical milestones, clinical studies and commercialization. *Peptides*, 27(4):921-30.

- Hadley ME, Marwan MM, F al-Obeidi, Hruby VJ, Castrucci AM. (1989) Linear and cyclic alpha-melanotropin[4-10]-fragment analogues that exhibit superpotency and residual activity. *Pigment Cell Res.*, 2: 478-484.
- Halaban R. (2000) The regulation of normal melanocyte proliferation. *Pigment Cell Res.*, 13: 4-14
- Hakanson R, Wang Z, Folkers K. (1991) Comparison of Spantide II and CP-96,345 for blockade of tachykinin evoked contraction of smooth muscle. *Biomed. Biophys. Res. Commun.*, 178: 297-301.
- Hartmeyer M, Scholzen T, Becher E, Bhardwaj RS, Schwarz T, Luger TA (1997) Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1 and produce increased levels of IL-8 upon stimulation with alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J. Immunol.*, 159: 1930-1937.
- Hill RP, MacNeil S, Haycock JW. (2006) Melanocyte stimulating hormone peptides inhibit TNF- α signaling in human dermal fibroblast cells. *Peptides*, 27:421-430.
- Hiltz ME, Catania A, Lipton JM. (1991) Anti-inflammatory activity of α -MSH(11-13) analogs: Influences of alteration in stereochemistry. *Peptides*, 12: 767-771,.
- Hruby VJ, Lu D, Sharma SD, Castrucci AL, Kesterson RA, Al-Obeidi FA, Hadley ME & Cone RD. (1995) Cyclic lactam α -melanotropin analogues of Ac-Nle⁴, cyclo(Asp⁵, D-Phe⁷, Lys¹⁰) α -melanocyte-stimulating hormone-(4-10)-NH₂ with bulky aromatic amino acids at position 7 show high antagonist potency and selectivity at specific melanocortin receptors. *J. Med. Chem.*, 38: 3454-3461.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88: 131-141.
- Ichiyama T, Zhao H, Catania A., Furukawa S, Lipton JM. (1999) α -Melanocyte-stimulating hormone inhibits NF- κ B activation and I κ B α degradation in human glioma cells and its experimental brain inflammation. *Exp Neurol.*, 157: 359-365,.
- Jansone B, Bergstrom L, Svirskis S, Lindblom J, Klusa V, Wikberg JES. (2004a) Opposite effects of gamma(1)- and gamma(2)-melanocyte stimulating hormone on regulation of the dopaminergic mesolimbic system in rats. *Neurosci. Lett.*, 361(1-3): 68-71.
- Jansone B, Muceniece R, Kluša V, Svirskis Š, Petrovska R, Duburs G, Wikberg JES. (2004b) The non-peptide compound cerebrocrast is a highly selective melanocortin MC4 receptor agonist and inhibits feeding. *Proc. Latv. Acad. Sci.*, 58: 98-103.
- Jordan BA, Devi LA. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, 399: 697-700.

- Kameyama K, Tanaka S, Ishida Y, Hearing VJ. (1989) Enterferons Modulate the Expression of Hormone Receptors on the Surface of Murine Melanoma Cells. *J. Clin. Invest.*, 83: 213–221.
- Kapas S, Cammas FM, Hinson JP, Clark AJ. (1996) Agonist and receptor binding properties of adrenocorticotropin peptides using the cloned mouse adrenocorticotropin receptor expressed in a stably transfected HeLa cell line. *Endocrinology*, 137: 3291-3294.
- Kask A, Rago L, Mutulis F, Pahkla R, Wikberg JE, Schiöth HB (1998) Selective antagonist for the melanocortin 4 receptor (HS014) increases food intake in free-feeding rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245: 90-93.
- Kask A, Pahkla R, Irs A, Rago L, Wikberg JE, Schiöth HB. (1999) Long-term administration of MC4 receptor antagonist HS014 causes hyperphagia and obesity in rats. *Neuroreport*, 10: 707-711.
- Kask A, Rago L, Wikberg JE, Schiöth HB. (2000) Differential effects of melanotropin peptides on feeding in rats: Evidence against the involvement of MC(3) receptor in the regulation of food intake. *Neurosci. Lett.*, 283: 1-4
- Kavarana MJ, Trivedi D, Cai M, Ying J, Hammer M, Cabello C, Grieco P, Han G, Hruby VJ. (2002) Novel cyclic templates of alpha-MSH give highly selective and potent antagonists/agonists for human melanocortin-3/4 receptors. *J. Med. Chem.*, 12: 2644-2650.
- Kelly JM, Moir AJ, Carlson K, Yang Y, Macneil S & Haycock JW. (2006) Immobilized alpha-melanocyte-stimulating hormone 10-13 (GKPV) inhibits tumor necrosis factor-alpha stimulated NF-kappaB activity. *Peptides*, 27: 431-437.
- Kistler-Heer V, Lauber ME, Lichtensteiger W. (1998) Different developmental patterns of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNA: predominance of Mc4 in fetal rat nervous system. *J. Neuroendocrinol*, 10: 133-146.
- Klusa V, Germane S, Svirskis S, Opmane B, Wikberg JE. (2001) The gamma(2)-MSH peptide mediates a central analgesic effect via a GABA-ergic mechanism that is independent from activation of melanocortin receptors. *Neuropeptides*, 35: 50-57.
- Konda Y, Gantz I, DelValle J, Shimoto Y, Miwa H, Yamada T. (1994) Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *J. Biol. Chem.*, 269: 13162-13166.
- König S, Luger TA, Scholzen TE. (2006) Monitoring neuropeptide-specific proteases: processing of the proopiomelanocortin peptides adrenocorticotropin and -melanocyte-stimulating hormone in the skin. *Exp. Dermatol.*, 15 (10): 751–761.

- Labbe O, Desarnaud F, Eggerickx D, Vassart G, Parmentier M. (1994) Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry*, 33: 4543-4549.
- Lam CW, Perretti M, Getting SJ. (2006) Melanocortin receptor signaling in RAW264.7 macrophage cell line. *Peptides*, 27(2):404-12.
- Lerner AB, Lee TH. (1955) Isolation of a homogenous melanocyte-stimulating hormone from hog pituitary gland. *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 1066-1067.
- Li SJ, Varga K, Archer P, Hruby VJ, Sharma SD, Kesterson RA, Cone RD, Kunos G. (1996) Melanocortin antagonists define two distinct pathways of cardiovascular control by alpha- and gamma-melanocyte-stimulating hormones. *J. Neurosci.*, 16: 5182-5188.
- Lim SK, Chung SS, Lee SZ, Nam SY, Ahn CW, Nam JH, Kim KR, Lee HC, Huh KB. (2000) Long term effects of α -MSH analogues on body weight and food intake in non-obese growing rats. *Am. Endocrine. Soc. 82nd Ann Meeting*, 2000: 298.
- Lindblom J, Schioth HB, Larsson A, Wikberg JES, Bergstrom L (1998) Autoradiographic discrimination of melanocortin receptors indicates that the MC3 subtype dominates in the medial brain. *Brain Res.*, 810: 161-171.
- Lindblom J, Opmane B, Mutulis F, Mutule I, Petrovska R, Klusa V, Bergstrom L, Wikberg JE. (2001) The MC4 receptor mediates alpha-MSH induced release of nucleus accumbens dopamine. *Neuroreport.*, 12(10): 2155-2158.
- Lipton JM, Catania A, Delgado R (1998) Peptide modulation of inflammatory processes within the brain. *Neuroimmunomodulation*, 5:178-183.
- Lipton JM & Catania A. (1997) Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator – α -MSH. *Immunol. Today*, 18: 140-145.
- Loir B, Bouchard B, Morandini R, Del Marmol V, Deraemaeceker R, Garcia-Borrón JC and Ghanem G. (1997) Immunoreactive α -melanotropin as an autocrine effector in human melanoma cells. *Eur. J. Biochem.*, 244: 923-930.
- Loir B, Perez Sanches C, Ghanem G, Lozano JA, Garcia-Borrón JC, Jimenez-Cervantes C. (1999) Expression of the MC1 receptor gene in normal and malignant human melanocytes. A semi quantitative RT-PCR study. *Cell Mol. Biol.*, 45: 1083-1092.
- Low MJ, Simerly RB, Cone RD (1994) Receptors for the melanocortin peptides in the central nervous system. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes*, 1:79–88.
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkinson WO, Cone RD. (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptors. *Nature*, 371: 799-802.

- Luger TA, Scholzen T, Grabbe S. (1997) The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1: 87-93.
- Mandrika I, Muceniece R, Wikberg JES. (2001) Effects of melanocortins peptides on lipopolisaccharide/interferon-gamma-induced NF-kappaB DNA-binding and nitric oxide production in macrophage-like RAW 264.7 cells: evidence for dual mechanism of action. *Biochem. Pharmacol.*, 61: 613-621.
- Mandrika R, Petrovska J, Wikberg JE. (2005) Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 326: 349-354.
- Manna S, Aggarwal BB. (1998) α -melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF- κ B activation induced by various inflammatory agents. *J. Immunol*, 161: 2873-2880.
- Milligan G. (2004) G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol. Pharmacol.*, 66: 1-7.
- Morgan C, Thomas RE, Ma W, Novotny MV, Cone RD. (2004a) Melanocortin-5 receptor deficiency reduces a pheromonal signal for aggression in male mice. *Chem. Senses.*, 29(2):111-115.
- Morgan C, Thomas RE, Cone RD. (2004b) Melanocortin-5 receptor deficiency promotes defensive behaviour in male mice. *Horm. Behav.*, 45(1): 58-63.
- Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD (1992) The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*, 257: 1248-1251.
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.*, 8: 1298-1308.
- Moustafa M, Szabo M, Ghanem GE, Morandini R, Kemp EH, Mac NS & Haycock JW. (2002) Inhibition of tumor necrosis factor-alpha stimulated NFkappaB/p65 in human keratinocytes by alpha-melanocyte stimulating hormone and adrenocorticotrophic hormone peptides. *J. Invest. Dermatol.*, 119: 1244-1253.
- Muceniece R, Mutule I, Mutulis F, Prusis P, Szardenings M, Wikberg JES. (2001) Detection of regions in the MC1 receptor of importance for the selectivity of the MC1 receptor super-selective MS04/MS05 peptides. *BBA*, 1544: 278-282.
- Muceniece R, Zvejniece L, Kirjanova O, Liepinsh E, Krigere L, Baumane L, Kalvinsh I, Wikberg JE, Dambrova M. (2004) Beta- and Gamma-Melanocortins Inhibit Lipopolysaccharide Induced Nitric Oxide Production in Mice Brain. *Brain Res.*, 995(1): 7-13.
- Muceniece R, Zvejniece L, Kirjanova O, Liepinsh E, Krigere L, Vilskersts R, Baumane L, Gordjusina V, Kalvinsh I, Wikberg JES, Dambrova M. (2005) beta-MSH inhibits

- brain inflammation via MC_{3/4} receptors and impaired NF- κ B signalling. *J. Neuroimmunol.*,169: 13-19.
- Muceniece R, Zvejniece L, Liepinsh E, Kirjanova O, Baumane L, Petrovska R, Mutulis F, Mutule I, Kalvinsh I, Wikberg JE, Dambrova M. (2006) The MC(3) receptor binding affinity of melanocortins correlates with the nitric oxide production inhibition in mice brain inflammation model. *Peptides*, 27(6):1443-1450.
- Mugridge KG, Perretti M, Ghiara P, Parente L. (1991) α -melanocyte-stimulating hormone reduces interleukin-1 β effects on rat stomach preparations possibly through interference with a type 1 receptor. *Eur. J. Pharmacol*, 197: 151-155.
- Muceniece R, Zvejniece L, Vilskersts R, Liepinsh E, Baumane L, Kalvinsh I, Wikberg JE, Dambrova M. (2007) Functional evaluation of THIQ, a melanocortin 4 receptor agonist, in models of food intake and inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, in press.
- Nathan C, Xie QW. (1994) Nitric oxide synthases: roles, tools, and controls. *Cell*, 78: 915-918.
- Neumann-Andersen G, Nagajeva O, Mandrika I, Petrovska R, Muceniece R, Mincheva-Nilsson L, Wikberg JE. (2001) MC(1) Receptors are Constitutively Expressed on Leucocyte Subpopulations with Antigen Presenting and Cytotoxic Functions. *Clin. Exp. Immunol.*, 126: 441-446.
- Nocetto C, Cragolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN. (2004) Evidence that the effect of melanocortins on female sexual behavior in preoptic area is mediated by the MC3 receptor. Participation of nitric oxide. *Behav. Brain Res.*, 153(2): 537-541.
- Nordstedt C, Fredholm BB. (1990) A modification of a protein-binding method for rapid quantification of cAMP in cell-culture supernatants and body fluid. *Anal. Biochem.*, 189: 231-234.
- Palkovits M, Mezey E, Eskay RL. (1987) Pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/beta-endorphin/alpha-MSH) in brainstem baroreceptor areas of the rat. *Brain Res.*, 2: 323-338
- Prusis P, Schiöth HB, Muceniece R, Herzyk P, Afshar M, Hubbard RE, Wikberg JES (1997) Modeling of the three-dimensional structure of the human melanocortin-1 receptor using an automated method and docking of a rigid cyclic MSH core peptide. *J. Molecular Graphics Modelling*, 15: 307-317.
- Prusis P, Muceniece R, Mutule I, Mutulis F, Wikberg JE. (2001a) Design of new small cyclic melanocortin receptor-binding peptides using molecular modelling: Role of the His residue in the melanocortin peptide core. *Eur. J. Med. Chem.*, 36(2): 137-146.
- Prusis P, Muceniece R, Anderson P, Post C, Lundstedt T, Wikberg JES. (2001b) PLS modelling of chimeric MS04/MSH-peptide and MC1/MC3-receptor interactions

- reveals a novel method for the analysis of ligand-receptor interactions. *BBA.*, 1544: 35-357.
- Przewlocki, R., Przewlocka B. (2001). Opioids and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 429: 79-91.
- Quillan JM. (1995) Development of a combinatorial diffusion assay and discovery of MSH receptor antagonists. *UML, Ann Arbor*, Michigan.
- Quillan J.M, Sadee W. (1996) Structure-based search for peptide ligands that cross-react with melanocortin receptors. *Pharmaceutical Res.*, 13: 1624-1630.
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Reh fuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD.(1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function.*Cell*, 72(6): 827-834.
- Salazar-Onfra F, Lopez M, Lundquist A, Aguirre A, Escobar A, Serrano A, Korenblit C, Petersson M, Chhajlani V, Larsson O, Kiessling R. (2002) Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker. *British J. Cancer*, 87: 414-422.
- Sawyer TK, Sanfilippo PJ, Hruby VJ, Engel MH, Heward CB, Burnett JB, Hadley ME. (1980) 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine- α - melanocyte stimulating hormone: A highly potent α - melanotropin with ultralong biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5754-5758.
- Schiller M, Raghunath M, Kubitscheck U, Scholzen TE, Fisbeck T, Metze D, Luger TA, Bohm M. (2001) Human dermal fibroblasts express prohormone convertases 1 and 2 and produce proopiomelanocortin-derived peptides. *J. Invest. Dermatol.*, 117(2):227-35
- Schiöth HB, Muceniece R, Wikberg JE, Chhajlani V. (1995) Characterisation of melanocortin receptor subtypes by radioligand binding analysis. *Eur. J. Pharmacol* 288: 311-317
- Schiöth HB, Chhajlani V, Muceniece R, Klusa V, Wikberg JES (1996) Major pharmacological distinction of the ACTH receptor from other melanocortin receptors. *Life Sci.*, 59: 797-801.
- Schiöth HB, Muceniece R, Wikberg JES. (1996b) Characterisation of melanocortin 4 receptor by radioligand binding analysis. *Pharmacol&Toxicol.*, 79: 161-165.
- Schiöth HB, Kuusinen A, Muceniece R, Szardenings M, Keinanen K, Wikberg JE. (1996c) Expression of functional melanocortin 1 receptors in insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221(3):807-14.

- Schiöth HB, Muceniece R, Prusis P, Szardenings M, Lindeberg G, Sharma SD, Hruby VJ, Wikberg JE (1997a) Characterization of D117A and H260A mutations in the melanocortin 1 receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 126: 213-219
- Schiöth HB, Muceniece R, Larsson M, Mutulis F, Szardenings M, Prusis P, Lindeberg G, Wikberg JE (1997b) Binding of cyclic and linear MSH core peptides to melanocortin receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.*, 319: 369-373
- Schiöth HB, Mutulis F, Muceniece R, Prusis P, Wikberg JE (1998a) Selective properties of C- and N-terminals and core residues of the melanocyte-stimulating hormone on binding to the human melanocortin receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.*, 349: 359-366
- Schiöth HB, Mutulis F, Muceniece R, Prusis P, Wikberg JE. (1998b) Discovery of novel melanocortin 4 receptor selective MSH analogues. *Br. J. Pharmacol.*, 124: 75-82
- Schiöth HB, Phillips SR, Rudzish R, Birch-Machin MA, Wikberg JE, Rees JL. (1999) Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 260: 488-491.
- Schiöth HB (2000) The melanocortin receptors: From cloning to treatment of anorexia. *Recent Res. Devel. Chemical Engg.*, 4: 461-485.
- Schiöth HB (2001) The physiological role of melanocortin receptors. *Vitamin and Hormones*, 63: 195-232.
- Schiöth HB, Muceniece R, Mutule I, Jarl Wikberg. JES. (2006) New melanocortin 1 receptor binding motif based on the C-terminal sequence of α -melanocyte stimulating hormone. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 99(4):287-293.
- Sebhat IK, Martin WJ, Ye Z, Barakat K, Mosley RT, Johnston DB, Bakshi R, Palucki B, Weinberg DH, MacNeil T, Kalyani RN, Tang R, Stearns RA, Miller RR, Tamvakopoulos C, Strack AM, McGowan E, Cashen DE, Drisko JE, Hom GJ, Howard AD, MacIntyre DE, van der Ploeg LH, Patchett AA, Nargund RP. (2002) Design and pharmacology of N-[(3R)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolinium-3-ylcarbonyl]-(1R)-1-(4-chlorobenzyl)-2-[4-cyclohexyl-4-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)piperidin-1-yl]-2-oxoethylamine (1), a potent, selective, melanocortin subtype-4 receptor agonist. *J. Med. Chem.*, 45(21):4589-4593.
- Siegrist W, Oestrrreicher M, Stutz S, Girard J, Eberle AN. (1988). Radioreceptor assay for α -MSH using mouse B16 melanoma cells. *J Receptor Res.*, 8: 323-343.
- Siegrist W, Solca F, Stutz S, Giuffre L, Carrel S, Girard J, Eberle AN. (1989) Characterization of receptors for α - melanocyte stimulating hormone on human melanoma cells. *Cancer Res.*, 49: 6352-6358.
- Siegrist W, Stutz S, Eberle AN. (1994) Homologous and heterologous regulation of α - melanocyte stimulating hormone receptors in human and mouse melanoma cell lines. *Cancer Res.*, 15: 2604-2610.

- Smith AI, Funder JW (1988) Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues. *Endocr. Rev.*, 9: 159-179
- Slominski A, Ermak G, Mihm M. (1996) ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81: 2746-2749
- Star RA, Rajora N, Huang J, Stock RC, Catania A, Lipton JM. Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by α -melanocyte-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 8016-8020.
- Szabo C. (1995) Alternations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz.*, 3: 2-32.
- Szardenings M, Muceniece R, Mutule I, Mutulis F, Wikberg JE (2000) New highly specific agonistic peptides for human melanocortin MC(1) receptor. *Peptides*, 21: 239-243
- Szardenings M, Tornroth S, Mutulis F, Muceniece R, Keinanen K, Kuusinen A, Wikberg JE. (1997) Phage display selection on whole cells yields a peptide specific for melanocortin receptor 1. *J. Biol. Chem.*, 272(44):27943-27948.
- Takeuchi S, Kudo T, Takahashi S. (1998) Molecular cloning of the chicken melanocortin 2 (ACTH)-receptor gene. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1403: 102-108.
- Takeuchi S, Takahashi S (1998) Melanocortin receptor genes in the chicken-tissue distributions. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 112: 220-231.
- Tanaka S. (2003) Comparative aspects of intracellular proteolytic processing of peptide hormone precursors: studies of proopiomelanocortin processing. *Zoological Science*, 20:1183-1198.
- Tatro JB (1990) Melanotropin receptors in the brain are differentially distributed and recognize both corticotropin and α -melanocyte stimulating hormone. *Brain Res.*, 536: 124-132.
- Telgkamp P, Cao Q, Basbaum AI, Ramirez JM. (2002) Long-term deprivation of Substance P in PPT-A mutant mice alters the anoxic response of the isolated respiratory network. *J. Neurophysiol.*, 88: 206-213.
- Uehara Y, Shimizu H, Sato N, Tanaka Y, Shimomura Y, Mori M. (1992) Carboxyl-terminal tripeptide of alpha-melanocyte-stimulating hormone antagonizes interleukin-1-induced anorexia. *Eur. J. Pharmacol.*, 220: 119-122.
- Uhler M, Herbert E. (1983) Complete amino acid sequence of mouse pro-opiomelanocortin derived from the nucleotide sequence of pro-opiomelanocortin cDNA. *J. Biol. Chem.*, 258: 257-261.

- Van Hagen PM, Hofland LJ, ten Bokum AM, Lichtenauer-Kaligis EG, Kwekkeboom, DJ, Ferone D, Lamberts S. (1999) Neuropeptides and their receptors in the immune system. *Ann. Med.*, 2: 15-22.
- Van der Kraan M, Tatro JB, Entwistle ML, Brakkee JH, Burbach JP, Adan RA, Gispen WH (1999) Expression of melanocortin receptors and pro-opiomelanocortin in the rat spinal cord in relation to neurotrophic effects of melanocortins. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 63: 276-286
- Verburg-van Kemenade BML, Jenks BG, Smits RJM. (1987) N-Terminal acetylation of melanophore-stimulating hormone in the pars intermedia of *Xenopus laevis* is a physiologically regulated process. *Neuroendocrinology*, 46: 289-296
- Vergoni AV, Bertolini A, Mutulis F, Wikberg JES, Schioth HB. (1998) Differential influence of a selective melanocortin MC4 receptor antagonist (HS014) on melanocortin-induced behavioural effects in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 362: 95-101
- Writen DH, Kalkman CJ, Adan RA, Gispen WH. (2001a) Neuropathic pain: a possible role for the melanocortin system? *Eur. J. Pharmacol.*, 429 (1-3): 61-69.
- Writen DH, Adan RA, Groen GJ, Gispen WH. (2001b) Chronic blockade of melanocortin receptors alleviates allodynia in rats with neuropathic pain. *Anesth. Analg.*, 93: 1572-1577.
- Watanabe T, Hiltz M, Catania A, Lipton JM. (1993) Inhibition of IL-1 β -induced peripheral inflammation by peripheral and central administration of analogs of the neuropeptide α -MSH. *Brain Research Bulletin*, 32: 311-314.
- Weber A, Kapas S, Hinson J, Grant DB, Grossman A, Clark AJL. (1993) Functional characterization of the cloned human ACTH receptor: Impaired responsiveness of a mutant receptor in familial glucocorticoid deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 197: 172-178
- Wessells H, Fuciarelli K, Hansen J, Hadley ME, Hruby VJ, Dorr R, Levine N. (1998) Synthetic melanotropic peptide initiates erections in men with psychogenic erectile dysfunction: double-blind, placebo controlled crossover study. *J.Urol.*, 160: 389-393.
- Wikberg JES. (1999) Melanocortin receptors: Perspectives for novel drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, 375: 295-310.
- Wikberg JES, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C, Skottner A. (2000) New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol. Res.*, 42: 393-420.
- Wikberg JES (2001) Melanocortin receptors: new opportunities in drug discovery. *Exp. Opin. Ther. Patents.*, 11: 61-76.

- Wilson MG, Nicholson WE, Holscher MA, Sherrell BJ, Mount CD, Orth DN. (1982) Proopiomelanocortin peptides in normal pituitary, pituitary tumor, and plasma of normal and Cushing's horses. *Endocrinology*, 110:941-954.
- Wong KY, Rajora N, Boccoli G, Catania A, Lipton JM. (1997) A potential mechanism of local anti-inflammatory action of alpha-melanocyte-stimulating hormone within the brain: modulation of tumor necrosis factor-alpha production by human astrocytic cells. *Neuroimmunomodulation*, 4: 37-41.
- Wong W, Minchin RF. (1996) Binding and internalization of the melanocyte stimulating hormone receptor ligand [Nle⁴, D-Phe⁷] alphaMSH in B16 melanoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 11: 1223-1232.
- Wu TG, Rose WA 2nd, Albrecht TB, Knutson EP, Konig R, Perdigao JR, Nguyen AP, Fleischmann WR Jr. (2007) IFN-alfa-induced murine B16 melanoma cancer vaccine cells: induction and accumulation of cell-associated IL-15. *J. Interferon Cytokine Res.*, 27: 13-22.
- Xia Y, Wikberg JES, Chhajlani V. (1995a) Expression of melanocortin 1 receptor in periaqueductal gray matter. *Mol. Neurosci.*, 6: 2193-2196.
- Xia Y, Wikberg JES. (1996a) Localization of ACTH receptor mRNA by *situ* hybridization in mouse adrenal gland. *Cell Tissue Res.*, 286: 63-68.
- Xia Y, Wikberg JES. (1997) Postnatal expression of melanocortin-3 receptor in rat diencephalons and mesencephalon. *Neuropharmacology*, 36: 217-224.
- Xia Y, Skoog V, Muceniece R, Chhajlani V, Wikberg JES. (1995b) Polyclonal antibodies against human melanocortin MC1 receptor; preliminary immunohistochemical localization of melanocortin MC1 receptor to malignant melanoma cells. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Section*, 288: 277-283.
- Xia Y, Muceniece R, Wikberg JES. (1996b) Immunological localization of melanocortin 1 receptor on the cell surface of WM266-4 human melanoma cells. *Cancer Lett.*, 98: 157-162.