

**LATVIJAS UNIVERSITĀTE**

**Medicīnas fakultāte**

**Līga Krīgere**

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

**Promocijas darba kopsavilkums  
farmācijas doktora grāda iegūšanai farmaceitiskās farmakoloģijas  
apakšnozarē**

**Rīga 2007**

**Promocijas darbs „Melanokortīnu un to ligandu pētījumi *in vitro*”** satur eksperimentālos datus, kas iegūti LZP granta Nr. 05.1419 un Eiropas Sociālā Fonda (ESF) finansētas doktorantūras ietvaros (farmācija, apakšnozare farmaceutiskā farmakoloģija).

Promocijas darbs izstrādāts ar ESF atbalstu Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē, Farmācijas programmā un v/a Latvijas Organiskās sintēzes institūtā.

**PhD work „In vitro studies on melanocortin receptors and their ligands”** comprises experimental data which are obtained within PhD fellowship programme (pharmacy, pharmaceutical pharmacology) financed by the Latvian Council of science grant 05.1419 and ESF grant.

Experimental studies were carried out at the Faculty of Medicine of University of Latvia and Latvian Institute of Organic Synthesis.

**Promocijas darba vadītāja/ Research supervisor:**

Prof., Dr.hab.biol. **Ruta Muceniece**

**Promocijas padomes priekšsēdētāja/ Head of the Promotion Council:**

Prof., Dr.hab.med. **Renāte Ligere**

**Recenzenti/ reviewers:**

Prof., Dr.hab.med. **Vija Kluša**

Dr. farm. **Pēteris Prūsis**

Asoc.prof., Dr.med. **Antons Skutelis**

Aizstāvēšana notiks 2007.gada 14.decembrī

Latvijas Universitātes Medicīnas, bioloģijas un farmācijas nozaru promocijas padomes sēdē Rīgā, Latvijas Universitātes Mazajā aulā, Raiņa bulv. 19.

Commencement will take place on December 14, 2007 at the Promotion Council of Medicine, Biology and Pharmacy of University of Latvia, Riga, Raina bulv. 19, Maza aula.



**LATVIJAS UNIVERSITĀTE**

**Medicīnas fakultāte**

**UNIVERSITY OF LATVIA**

**Faculty of Medicine**

**Līga Krīgere**

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

**STUDIES ON MELANOCORTIN RECEPTORS AND  
THEIR LIGANDS *IN VITRO***

**Promocijas darba kopsavilkums  
Synopsis of the doctor's thesis**

**Rīga 2007**

## SAĪSINĀJUMI

AKTH	adrenokortikotropais hormons
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -melanocīt-stimulējošais hormons
$\beta$ -LPH	$\beta$ -lipotropīns
cAMF	cikliskais adenozinmonofosfāts
GASS	$\gamma$ -aminosviestskābe
GDF	guanozinmonofosfāts
IFN $\gamma$	interferons $\gamma$
IBMX	3-izobutil-1-metilksantīns
I $\kappa$ ppaB	inhibitorais kappaB proteīns
iNOS	inducējamā slāpekļa oksīda sintāze
IC <sub>50</sub>	inhibējošā koncentrācija 50
IL-10	interleikīns 10
K <sub>i</sub>	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

# SATURA RĀDĪTĀJS

<b>ANOTĀCIJA.....</b>	<b>6</b>
<b>PUBLIKĀCIJU SARAKSTS.....</b>	<b>11</b>
<b>1. IEVADS.....</b>	<b>13</b>
<b>2. MATERIĀLI un METODEDES.....</b>	<b>16</b>
2.1. Reāģenti.....	16
2.2. Pētāmie peptīdi.....	16
2.3. Šūnu līnijas.....	17
2.4. Šūnu kultūras.....	17
2.4.1. Šūnu transfektēšana.....	17
2.5. MKR DNS ekspresijas vektori.....	18
2.6. Līgandu–receptoru saistīšanās noteikšana.....	18
2.7. Slāpekļa oksīda līmeņa mērījumi.....	19
2.8. cAMF līmeņa mērījumi.....	20
2.9. Datu apstrāde.....	20
<b>3. REZULTĀTI.....</b>	<b>21</b>
3.1. $\alpha$ -MSH un tā analoga [Nle <sup>4</sup> , DPhe] $\alpha$ -MSH MKR saistīšanās kinētikas raksturojums peļu melanomas šūnu B16–F1 līnijā.....	21
3.2. P vielas antagonistu spantīda I saistīšanās pie MKR.....	24
3.3. Spantīda I ietekme uz NO veidošanos RAW264.7 šūnu līnijā.....	26
3.4. Dinorfīnu saistīšanās pie MKR.....	27
3.5. Cilvēka ādas primāro fibroblastu MKR1 ekspresijas un cAMF veidošanās pētījumi.....	28
3.6. $\alpha$ -MSH11–13 analogu saistīšanās pie MKR.....	30
3.7. MSH11–13 un tā analogu ietekme uz cAMF veidošanos B16–F1 un RAW264.7 šūnās.....	31
3.8. Slāpekļa oksīda veidošanās RAW264.7 šūnās.....	32
3.9. $\alpha$ -MSH un MSH11–13 ietekme uz MKR1 ekspresiju makrofāgu šūnu līnijā RAW264.7.....	34
<b>4. DISKUSIJA.....</b>	<b>37</b>
4.1. NDP–MSH un $\alpha$ -MSH saistīšanās pie MKR kinētika.....	37
4.2. Cilvēka ādas primāro fibroblastu MKR1 raksturojums.....	39
4.3. Spantīda I saistīšanās pie MKR1 un tā ietekme uz NO līmeni.....	40
4.4. Dinorfīnu saistīšanās raksturojums pie MKR.....	41
4.5. MSH11–13 un tā analogu ietekme uz MKR1 mediētajiem procesiem.....	41
4.5.1. MSH11–13 ietekme uz MKR1 lokalizāciju makrofāgu šūnu membrānās.....	41
4.5.2. MSH11–13 un tā analogu stereouzbūves loma.....	43

<b>5. SECINĀJUMI.....</b>	<b>45</b>
<b>6. PATEICĪBAS.....</b>	<b>46</b>
<b>7. LITERATŪRA.....</b>	<b>47</b>

## ANOTĀCIJA

Cilvēka genoma atšifrēšana un jaunu receptoru atklāšana ir veicinājusi pētījumus par receptoru fizioloģisko lomu organismā, kā arī jaunu ārstniecības līdzekļu, kas selektīvi darbotos 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  $\alpha$ -melanocīt-stimulējošā hormona ( $\alpha$ -MSH) analogs ar aizvietotām aminoskābēm  $\alpha$ -MSH molekulā – Nle<sup>4</sup>-Dphe<sup>7</sup>-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  $\alpha$ -MSH un tā sintētiskā analoga NDP-MSH saistīšanās kinētiku pie receptoriem.
2. Izmantojot peļu makrofāģu šūnu līniju RAW264.7, kura dabīgi ekspresē MKR1 un MKR3, izpētīt  $\alpha$ -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  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ).
3. Noteikt MKR1 lokalizācijas ilgumu no cilvēku ādas izolētu primāro fibroblastu šūnās *in vitro* un  $\alpha$ -melanocītstimulējošā hormona ( $\alpha$ -MSH) ietekmi uz cikliskā adenozinmonofosfāta (cAMP) līmeni ilgstoši šūnu barotnēs kultivētām šūnām.
4. Pētīt citu ar G proteīnu saistīto receptoru ligandu - P vielas (SP) antagonista spantīda I un  $\kappa$  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 cAMP 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  $\kappa$  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 nemaz 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  $\alpha$ -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 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 $\gamma$  paaugstina MKR skaitu šūnas membrānās un stimulē NO sintēzi, kas liecina par iekaisuma procesu aktivēšanu.  $\alpha$ -MSH un tā C gala fragments MSH11-13 darbojas pretēji LPS un IFN $\gamma$ , samazinot MKR blīvumu makrofāgu šūnās un inhibējot NO sintēzi, tādējādi uzrādot pretiekaisuma darbību *in vitro*. Šūnu barotnēs kultivētas no cilvēku ādas izolētās primārās fibroblastu šūnas 6 pasāžu laikā zaudē MKR uz šūnu virsmas, kā arī cAMP producēšanas spēju kā atbildes reakciju uz  $\alpha$ -MSH stimulāciju.

MSH11-13 un tā analogi nesaistās pie MKR un nestimulē cAMP 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-NH<sub>2</sub> (II) abas amino grupas ir brīvas, cikliskajiem analogiem Ac-Lys-Pro-Val (III) un Ac-Lys-Pro-DVal (IV) ir brīvas  $\alpha$ -amino grupas, bet atšķirīga Val konfigurāciju (IV ar DVal), ciklopeptīdiem c(Lys-Val) (V) un c(Lys-DVal) (VI)  $\epsilon$ -amino grupas ir brīvas, bet L un DVal iekļauti ciklā. Peptīdu NO inhibīcijas spēja sarindojas:  $\alpha$ -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 MKR agonistu ietekmē B16-F1 šūnās novēro šo receptoru 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 analoģu sērijā visbrīvākā konfigurācija ir lineāriem peptīdiem, kuri attiecīgi uzrāda lielāku NO inhibīcijas efektu. Cikliskiem peptīdiem ar 13-locekļu cikliem (III un IV) ir ierobežota kustības brīvība, bet peptīdi V un VI ir nekustīgi 6-locekļu diketopiperazīna gredzeni. MSH11-13 analoģs ar *DVal* (III) uzrāda četras reizes spēcīgāku NO pārprodukcijas inhibīciju nekā analoģs ar *LVal* (IV), kas norāda uz streoizomērijas lomu un ļauj ieteikt ķīmiķiem sintezēt jaunus analoģus ar D-aminoskābēm peptīdu struktūrā, lai uzlabotu to pretiekaisuma darbību. Atklātās struktūras determinantes varētu izmantot arī nepeptīdu organisko vielu sintēzei, lai iegūtu jaunus pretiekaisuma līdzekļus.

Eksperimentāli pārbaudot iepriekš teorētiski izteikto hipotēzi par iespējamu *DTrp-Nle-NH<sub>2</sub>* un *DTrp-Arg-NH<sub>2</sub>* 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.

## Publikāciju saraksts

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 [Nle<sup>4</sup>, D-Phe<sup>7</sup>]- $\alpha$ -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.apakštipa 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; pieņemts.

### 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. Krigere 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.

# 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  $\alpha$ -melanocīt-stimulējošā hormona ( $\alpha$ -MSH) analogs ar aizvietotām aminoskābēm  $\alpha$ -MSH molekulā – Nle<sup>4</sup>-Dphe<sup>7</sup>-MSH jeb NDP-MSH, jeb melanotāns I (MTI) tiek klīniski pārbaudīts kā pigmentāciju veicinošs medikaments (Hadley and Dorr, 2006). 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 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 – nemelanokortīnerģiskās 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 stereouzbūves 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ).
3. Noteikt MKR1 lokalizācijas ilgumu no cilvēku ādas izolētu primāro fibroblastu šūnu membrānās *in vitro* un  $\alpha$ -melanocītstimulējošā hormona ( $\alpha$ -MSH) ietekmi uz cikliskā adenozinmonofosfāta (cAMP) līmeni ilgstoši šūnu barotnēs kultivētām šūnām.
4. Pētīt citu ar G proteīnu saistīto receptoru ligandu - P vielas (SP) antagonista spantīda I un  $\kappa$  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 cAMP stimulācijas spēju un salīdzināt MSH11-13 peptīdu pretiekaisuma darbību, izmantojot slāpekļa oksīda (NO) veidošanās testu makrofāgu šūnu līnijā RAW264.7, kura reagē uz iekaisuma aģentu kairinājumu ar pastiprinātu NO sintēzi.

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Reaģenti

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

### 2.2. 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 C<sup>0</sup>. Eksperimentos vielu atšķaidījumi tika veikti ar metodei atbilstošu buferšķīdumu.

1. 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 <sub>2</sub>
2.	NDP-MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
3.	MSH11-13	Ac- Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
4.	SP	<sub>2</sub> HN-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
5.	Spantīds-I	DArg-Pro-Lys-Pro-Gln-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Leu-NH <sub>2</sub>
6.	α-neo-endorfīns	<sub>2</sub> HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-OH
	Dinorfīni (D)	
7.	D-A1-17	<sub>2</sub> HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH
8.	D-A2-17	<sub>2</sub> HN-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH
9.	D-A2-11	<sub>2</sub> HN-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-OH
10.	D-A1-13	<sub>2</sub> HNTyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-OH
11.	D-A1-6	<sub>2</sub> HN- Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-OH
12.	Dinorfīns B (D-B)	<sub>2</sub> HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-OH
13.	Met-enkefalīns	<sub>2</sub> HN- Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH
14.	Leu-enkefalīns	<sub>2</sub> HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH
	<b>MSH11-13 analogu kodi</b>	



15.	I	Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
16.	II	Ac- Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
	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)

### 2.3. Šūnu līnijas

No ATCC šūnu bankas ASV nopirkta dabīgi MKR ekspresējošas līnijas: peļu makrofāgu šūnu līnija RAW264.7 (ATCC TIB-71), 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*.

### 2.4. 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 37<sup>0</sup> C temperatūrā, 5% CO<sub>2</sub> atmosfērā. Šūnas tika audzētas barotnēs, kamēr 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.

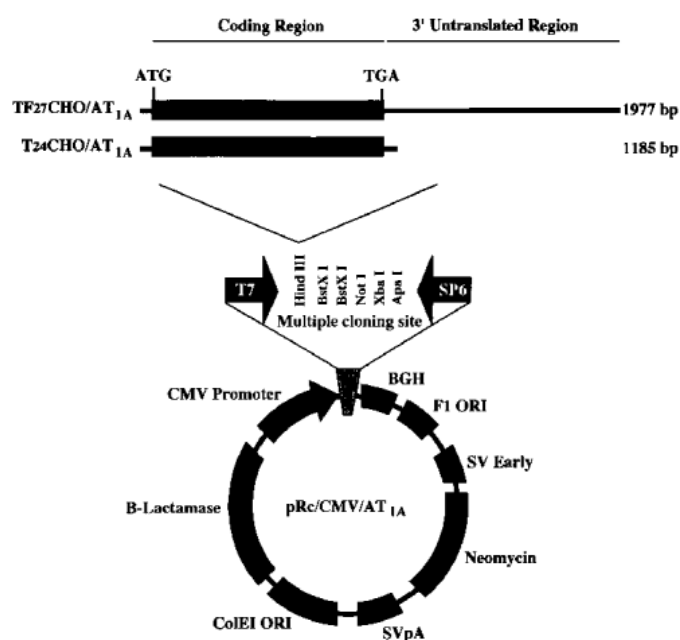
B16-F1, RAW264.7 un primārās fibroblastu šūnas dabīgi ekspresē MKR, tāpēc tās tūlīt pēc konfluences (vismaz 80% plates aizpildījums) sasniegšanas tika izmantotas attiecīgiem eksperimentiem.

#### 2.4.1. Šūnu transfektēšana

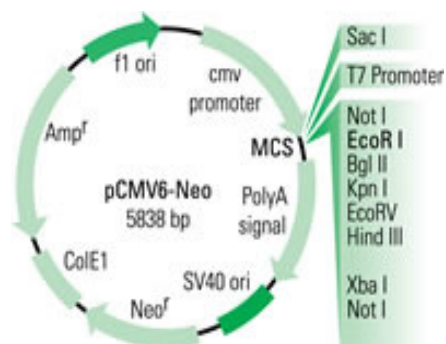
COS-7 šūnas neekspresē MKR, tāpēc tās tika transfektētas ar pētāmo receptoru DNS attiecīgos ekspresijas vektoros, izmantojot lipofektīna reaģentu. Transfektācija tika veikta pēc lipofektīna ražotāja instrukcijas.

## 2.5. MKR DNS ekspresijas vektori

MKR1 un MKR5 proteīnam atbilstošās DNS tika klonētas pRc/CMV ekspresijas vektorā (1.attēls, *Invitrogen*), MKR3 un MKR4 atbilstošās DNS tika klonētas pCMV/neo ekspresijas vektorā (2.attēls) un tika saņemtas kā dāvana no prof. Ira Gantz, Mičigānas universitātē, ASV.



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



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

## 2.6. Ligandu-receptoru saistīšanās noteikšana

Radioligandu–receptoru saistīšanās metode tika veikta, izmantojot šūnu monoslāni 96 lauciņu platēs, kā aprakstīts lietratūrā (Schiöth *et al.*, 1995). Šūnas tika sadalītas pa 100000 katrā lauciņā 50 μl–os buferšķīduma, 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 [<sup>125</sup>J]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 μM koncentrācijā. Pētāmās vielas tika pievienotas dažādās koncentrācijās. Pēc iezīmētā liganda un pētāmo peptīdu pievienošanas šūnas tika inkubētas 2 stundas CO<sub>2</sub> 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.

## 2.7. 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  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dažādās koncentrācijās, kā arī ar endotoksīniem (LPS 100 ng/ml + IFN-  $\gamma$  5 darbības vienības/ml) kopā ar  $\alpha$ -MSH un citiem pētījumā lietotiem peptīdiem dažādās koncentrācijās. Pēc 16 stundu inkubācijas šūnu inkubatorā 50 μl no šūnu barotnes katra lauciņa tika pārnesti uz citu 96-lauciņu plati, un 50 μl 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 NaNO<sub>2</sub> standartlīknes. Eksperimenti tika veikti ar 2–3 paralēliem mērījumiem un atkārtoti 3–4 reizes.

## 2.8. cAMF līmeņa mērījumi

Šūnas pēc tripsinizēšanas un centrifugēšanas inkubē 30 min  $37^{\circ}$  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 HClO<sub>4</sub>. Pēc 5 min skābi neitralizē 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.

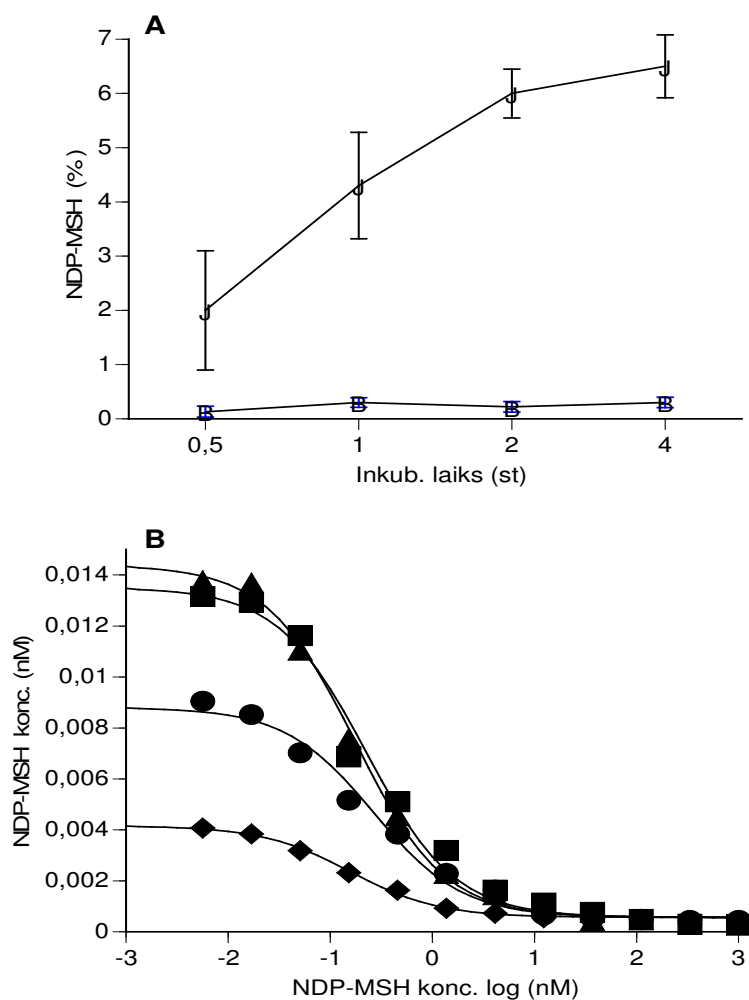
## 2.9. Datu apstrāde

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  $\pm$  vidējā kvadrātiskā kļūda (S.E.M) un uzskatīti par ticamiem, ja *p* vērtība līdzinās vai ir mazāka par 0.05.

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. $\alpha$ -MSH un tā analoga [Nle<sup>4</sup>, D-Phe] $\alpha$ -MSH MKR saistīšanās kinētikas raksturojums peļu melanomas šūnu B16-F1 līnijā

Piesātinājuma līkne iezīmētajam peptīdam [<sup>125</sup>J]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 (3A. attēls), bet pārējā brīvā, nesaistītā iezīmes daļa ir pēc šūnu nocentrifugēšanas atdalīta no saistītās.



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

Attēlā 3A 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 3B.

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  $\mu\text{M}$  NDP-MSH. Kā redzams 3A attēlā, laika gaitā pieaug NDP-MSH saistīšanās pie receptoriem un pēc 2 stundām sasniedz plato. 3B. attēlā ir parādītas NDP-MSH konkurences ar [ $^{125}\text{J}$ ]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.

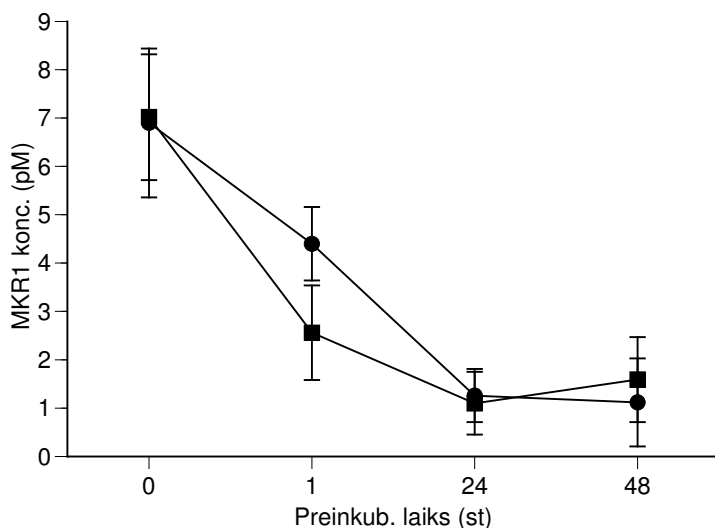
Pagarinot inkubācijas laiku (2. tabula), novēro NDP-MSH inhibīcijas konstantes ( $K_i$ ) nelielu pieaugumu. Tomēr atšķirības nav statistiski ticamas.

## 2. 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	$0.046 \pm 0.038$	$0.051 \pm 0.033$	$0.060 \pm 0.008$	$0.102 \pm 0.02$

Eksperimenti tika atkārtoti trīs reizes, katru paraugu ņemot dublikātos.

Inkubējot šūnas 1 stundu ar  $\alpha$ -MSH un NDP-MSH 1  $\mu\text{M}$  koncentrācijā, tika panākta receptoru skaita samazināšanās uz šūnu virsmas (*down-regulation*) (4. 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.



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

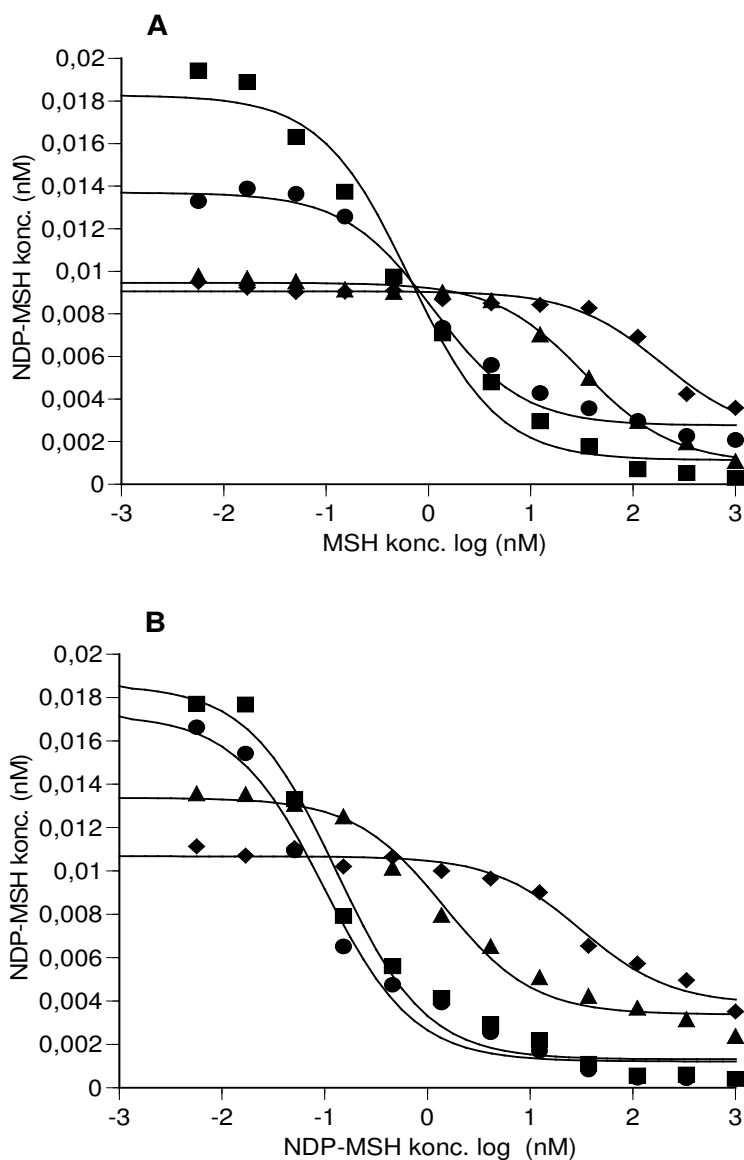
Receptoru koncentrācijas izmaiņas laika gaitā NDP-MSH ietekmē attēlotas līknē ar apļu simboliem,  $\alpha$ -MSH – ar kvadrātiem.

Eksperimenti atkārtoti 3 reizes, katrs mērījums veikts dublikātos.

Attēlā redzamas vidējās vērtības  $\pm$  S.E.M.

Netika novērotas ticamas atšķirības abu peptīdu darbībā.

Dažādos laika intervālos iegūtas konkurences līknes uz šūnām pēc to preinkubācijas ar  $\alpha$ -MSH (5A. attēls) un NDP-MSH (5B. 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.



**5. att.  $\alpha$ -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.

### 3.2. 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 (3. tabula). Spantīds I saistās ar izteiktu selektivitāti pret MKR1, taču pie citiem MKR tas saistās ar līdzīgām afinitātēm.

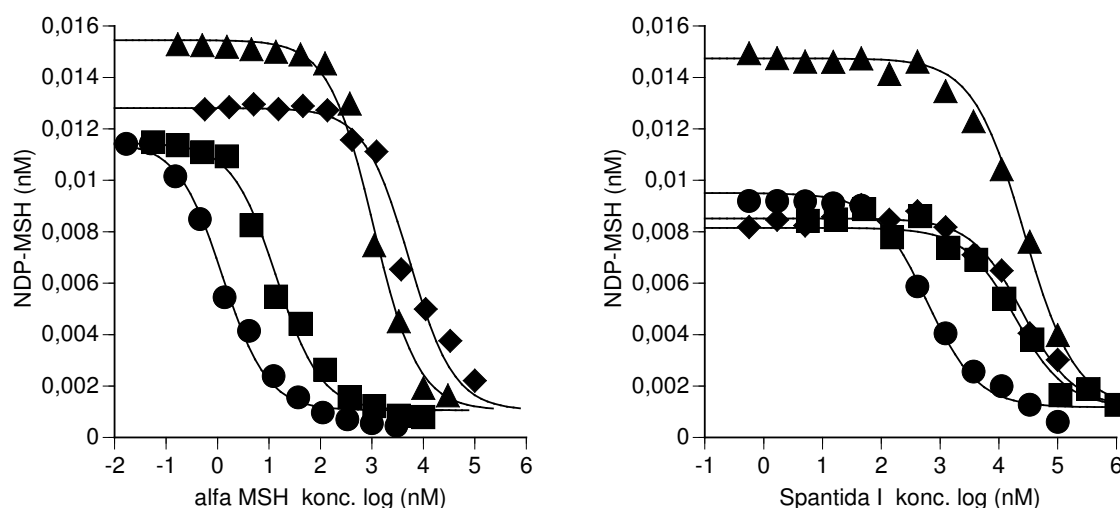


**3. tabula.  $\alpha$ -MSH, spantīda I and P vielas  $K_i$  vērtības (vidējais  $\pm$  S.E.M)**

Ligands	MKR1	MKR3	MKR4	MKR5
	$K_i$ (nM)	$K_i$ (nM)	$K_i$ (nM)	$K_i$ (nM)
$\alpha$ -MSH	$0.132 \pm 0.043$	$14.2 \pm 1.25$	$760 \pm 39$	$4054 \pm 142$
Spantīds I	$1236 \pm 470$	$19929 \pm 1435$	$22848 \pm 194$	$17825 \pm 1523$
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  $\alpha$ -MSH (6. attēls). Kā redzams, abi peptīdi izkonkurēja iezīmi no saistīšanās vietām pilnīgi. Nespecifiskā saistīšanās tika novērota aptuveni 10%.



**6. att.  $\alpha$ -MSH un spantīda I konkurence ar iezīmēto NDP-MSH par saistīšanos pie MKR.**

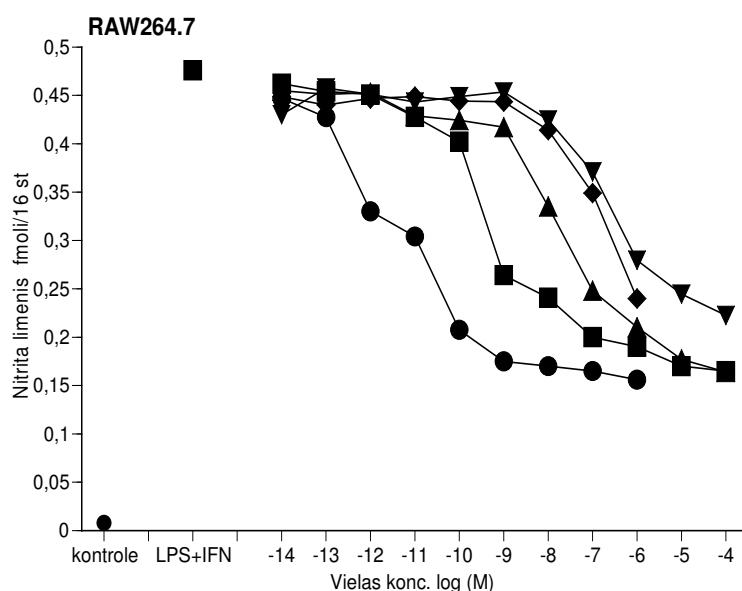
Apzīmējumi: MKR1 -apļi, MKR3 – kvadrāti, MKR4 trijstūri un MKR5 – rombi.

Eksperimentos novērotais dažāda līmeņa iezīmes saistīšanas 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  $\alpha$ -MSH un aprēķinātā  $\alpha$ -MSH afinitāte.

### 3.3. 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 $\gamma$  5 U/ml. Pēc 16 stundām tika novērota izteikta NO līmeņa stimulācija salīdzinājumā ar kontroles šūnām (7. attēls). NO līmenis tika aprēķināts pēc NaNO<sub>2</sub> standartlīknes.

Spantīds I un  $\alpha$ -MSH tika pievienots šūnu paraugu barotnei vienlaicīgi ar LPS un IFN $\gamma$ , kā arī vieni paši bez endotoksīniem 16 stundas pirms NO mērījumiem. Kontroles šūnām ne  $\alpha$ -MSH, ne spantīds I neuzrādīja nekādu ietekmi uz bazālo NO līmeni (dati att. nav parādīti). 7. attēlā redzams, ka spantīds I inhibē NO produkciju augstākās koncentrācijās kā  $\alpha$ -MSH, tomēr efektivitātes ziņā abi peptīdi darbojas līdzīgi – NO līmenis tiek samazināts apmēram par 60%. Taču netiek sasniegts kontroles NO līmenis.



**7. att. Spantīda I un  $\alpha$ -MSH izraisītā NO pārprodukcijas inhibīcija makrofāgu šūnu līnijā.** Apzīmējumi:  $\alpha$ -MSH – apli, spantīds I - kvadrāti,  $\alpha$ -MSH + HS024 100 nM – rombi, spantīds I + HS024 100 nM – trijstūri uz augšu, spantīds I + HS024 1  $\mu$ M – trijstūri uz leju. LPS 100 ng/ml un IFN $\gamma$  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  $\mu$ M koncentrācijā. Tika novērots, ka HS024 nobloķēja  $\alpha$ -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.

### 3.4. Dinorfīnu saistīšanās pie melanokortīnu receptoriem

Veiktie eksperimenti liecina, ka enkefalīni, neoendorfīns, dinorfīns-B un dinorfīns-A1-6 nekonkurē ar [<sup>125</sup>J]NDP-MSH par saistīšanos ar MKR (4. 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.

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

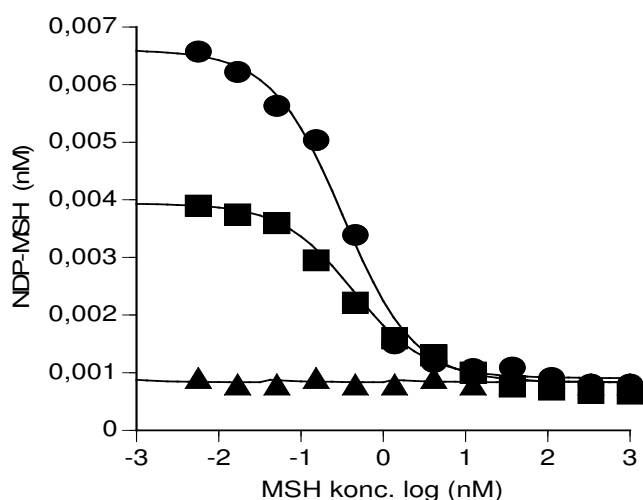
Peptīds	MKR1		MKR3		MKR4		MKR5	
	(nM)	S.E.M	(nM)	S.E.M	(nM)	S.E.M	(nM)	S.E.M
α-neo-endorfīns	>100000		>100000		>100000		>100000	
D-B	>100000		>100000		>100000		>100000	
D-A(1-17)	6860	281	6296	414	70779	3605	179290	64612
D-A(2-17)	2339	886	40065	30357	5990	143	60638	39362
D-A(2-11)	6944	567	>100000		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.	
$\alpha$ -MSH	0.210	0.08	22	3.4	432	76	5400	377

D– dinorfīns; n –nesaistās

### 3.5. 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  $\alpha$ -MSH saistīšanās līknes (8.attēls).



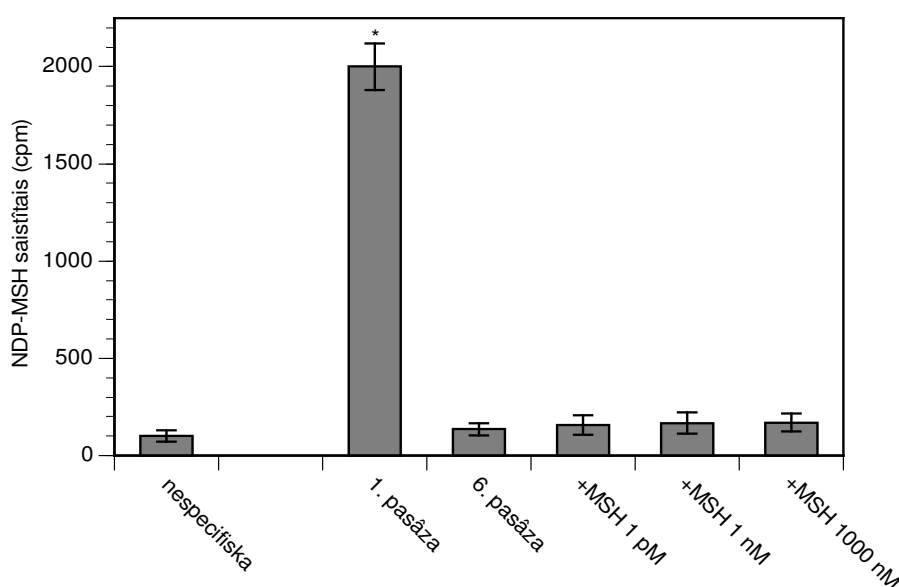
#### 8. att. $\alpha$ -MSH saistīšanās pie MKR fibroblastu šūnu membrānās.

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  $\alpha$ -MSH konkurences līknes ir raksturīgas šim peptīdam un aprēķinātā  $K_i$  vērtība  $0.12 \pm 0.034$  nM atbilst agrāk publicētajai  $\alpha$ -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 (8. attēls). Lai pārliecinātos par šūnu atbildētspēju uz hormonu stimulāciju, pēc sestās pārsēšanas reizes šūnu barotnei tika pievienots  $\alpha$ -MSH  $10^{-12}$  M,  $10^{-9}$  M un  $10^{-6}$  M koncentrācijā. Tomēr, kā redzams 9. att., 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  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH.



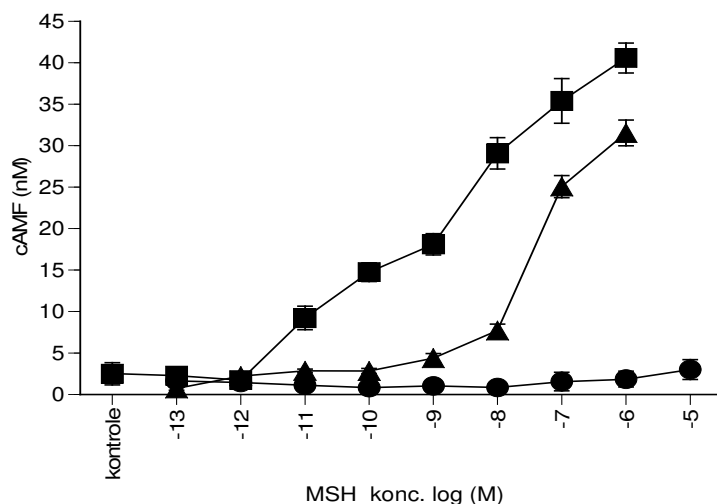
**9. att. MKR lokalizācija cilvēka fibroblastu šūnās pēc stimulācijas ar  $\alpha$ -MSH.**

Ekspierimenti atkārtoti trīs reizes ar dublikātiem.

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

cpm – radioaktivitātes mērvienība (*counts per minute*)

Lai pārliecinātos par receptoru funkcionalitāti, tika mērīts cAMP līmenis fibroblastu šūnās pēc vairākkārtējas konfluences sasniegšanas un šūnu pārsēšanas. Kā redzams 10. attēlā,  $\alpha$ -MSH stimulē cAMP veidošanos no peptīda koncentrācijas atkarīgā veidā.  $\alpha$ -MSH efekts sasniedz maksimumu 1  $\mu$ M koncentrācijā. Līdzīgi kā radioligandu-receptoru saistīšanās testā, pēc sešām pasāžām netika novērota  $\alpha$ -MSH spēja stimulēt cAMP produkciju primārajās fibroblastu šūnās.



**10. att.  $\alpha$ -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.

### 3.6. $\alpha$ -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  $\alpha$ -MSH uzrādīja atbilstošas afinitātes pret visiem MKR (5. 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 [ $^{125}$ J]NDP-MSH (5. tabula) pat 10 nM koncentrācijā.

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

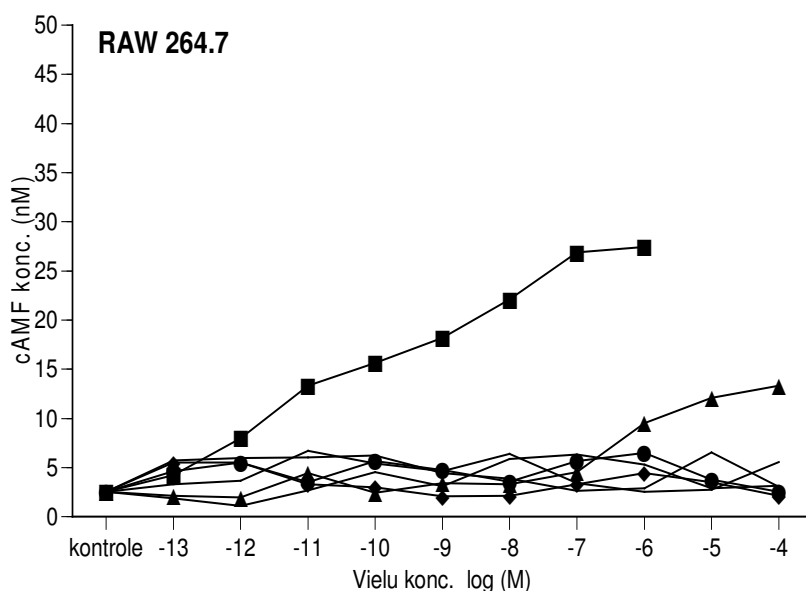
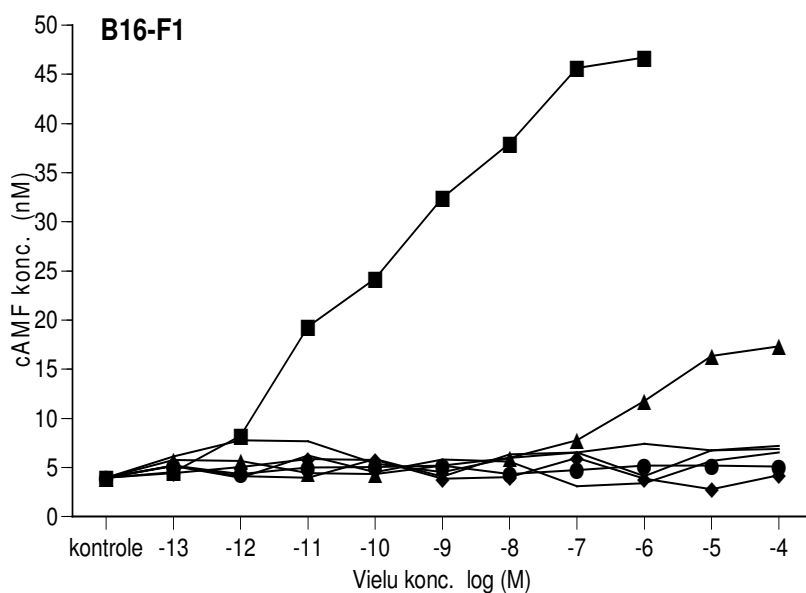
Peptīds	Sf9 MKR1	Sf9 MKR3	Sf9 MKR4	Sf9 MKR5	RAW264. 7	B16-F1
$\alpha$ -MSH	0.33 $\pm 0.04$	26 $\pm$ 3.4	702 $\pm$ 21	6034 $\pm$ 74	0.36 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.1
Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub> (I)	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Ac-Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub> (II)	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Ac-Lys-Pro-Val (III) I _____ I	n.	n.	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

**3.7. MSH11–13 un tā analoģu 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 (11.attēls). Visi analogi, izņemot ciklo(Ac-Lys-Pro-DVal), neuzrādīja ietekmi uz cAMF sintēzi pat līdz 100  $\mu$ M koncentrācijai. Ciklo(Ac-Lys-Pro-DVal) sāka stimulēt cAMF sintēzi koncentrācijā 1  $\mu$ M. Tomēr tas arī 100  $\mu$ M koncentrācijā nerasniedza  $\alpha$ -MSH efektu. Aprēķinātās EC<sub>50</sub> vērtības bija –  $\alpha$ -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 analoģa efekts nav specifisks kādai konkrētai šūnu līnijai.



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

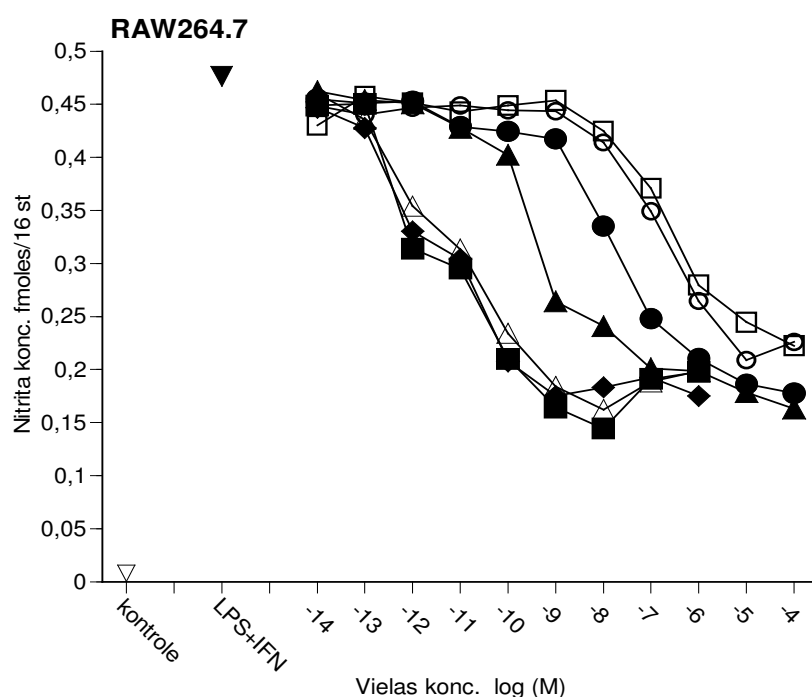
Katrs punkts atbilst vidējam lielumam no četriem neatkarīgiem mērījumiem.

### 3.8. 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 12. attēlā. Novērojumi liecina, ka 16 h makrofāgu stimulācija ar LPS/IFN $\gamma$  (attiecīgi 100 ng/ml un 5 U/ml) izraisīja ievērojamu nitrīta līmeņa pieaugumu salīdzinājumā ar nestimulētām šūnām. Kontroles nestimulētas šūnas producē ļoti maz NO.



$\alpha$ -MSH un MSH11-13 gan acetilētā, gan neacetilētā forma inhibēja LPS/ IFN $\gamma$  izraisīto nitrīta līmeņa pieaugumu, kas atbilst NO pārprodukcijai. Aprēķinātās IC<sub>50</sub> 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 $\gamma$  stimulācija neietekmēja šūnu dzīvotspēju, bet paaugstināja NO producēšanos. Pārbaudītie MSH11–13 analogi bija mazāk aktīvi. Šie peptīdi uzrādīja NO inhibīcijas spēju ar IC<sub>50</sub> 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  $\mu$ M visi MSH11–13 analogi – līdzīgi kā pilna hormona molekula – inhibēja 60% no endotoksīnu efekta. Neviens peptīds nenormalizēja NO pārprodukciju pilnīgi.



**12. att. Peptīdu ietekme uz NO līmeni RAW264.7 šūnu līnijā pēc 16 h stimulācijas ar LPS (100 ng/ml) kopā ar IFN $\gamma$  (5 U/ml).**

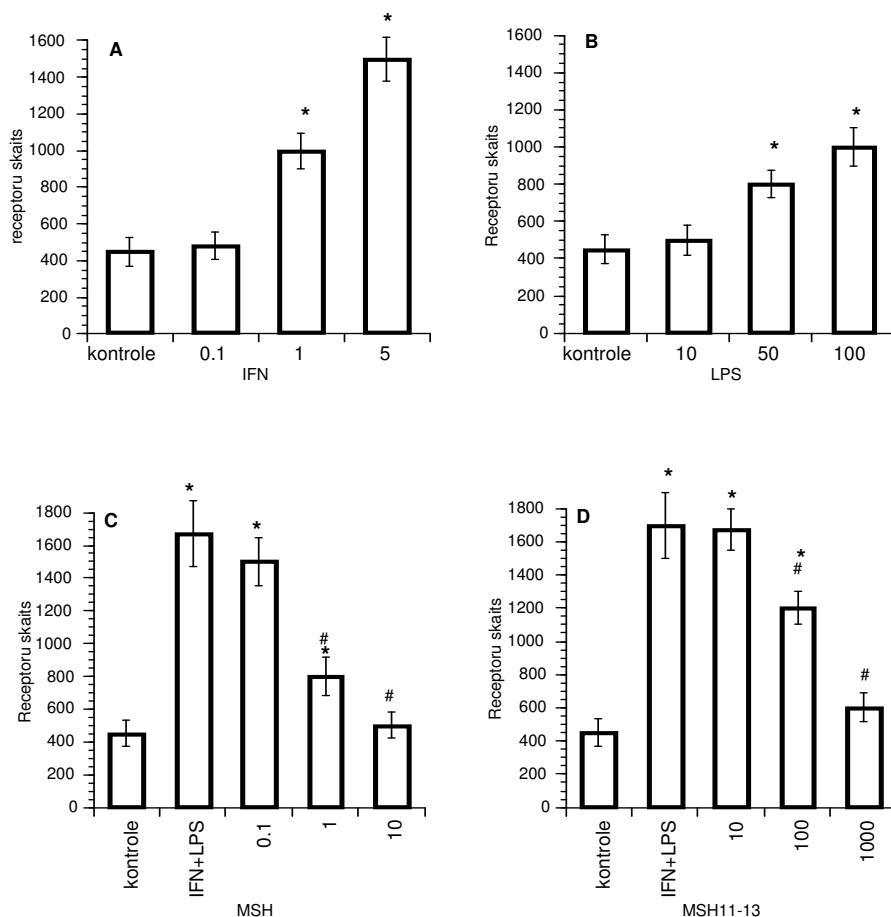
$\alpha$ -MSH (■), MSH11–13 (◆), MSH11–13 analogi: II (△), III (●), IV (▲), V (○) un VI (□).

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

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

### 3.9. $\alpha$ -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 (13. attēls).



**13. att.  $\alpha$ -MSH un MSH11-13 ietekme uz MKR skaitu ar IFN $\gamma$  un LPS stimulētās šūnās.** Kontroles šūnas stimulētas ar PBS buferi. Att. 13A. IFN $\gamma$  mērvienība uz abscisas ir darbības vienības/ml, 13B. LPS ng/ml, 13C  $\alpha$ -MSH nM un 13.D. MSH11-13 nM. Att.C un D IFN $\gamma$  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- $\gamma$  un LPS datiem

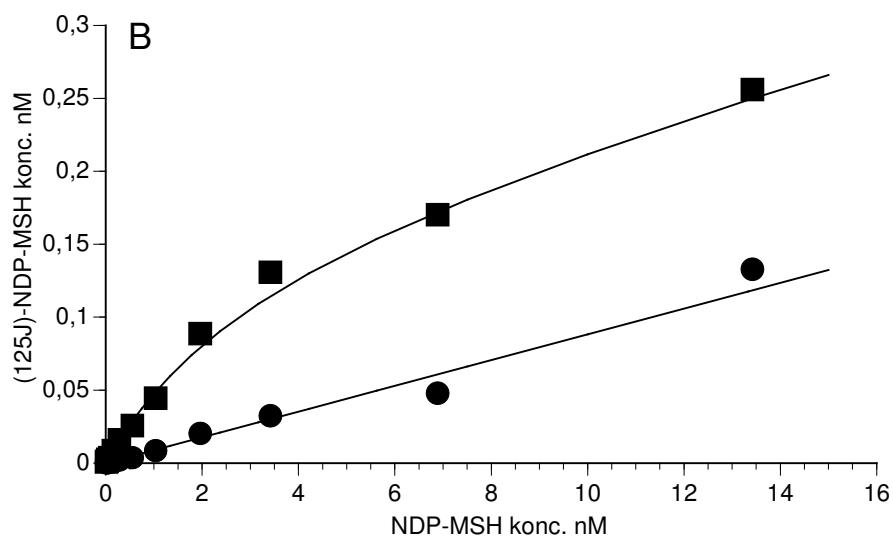
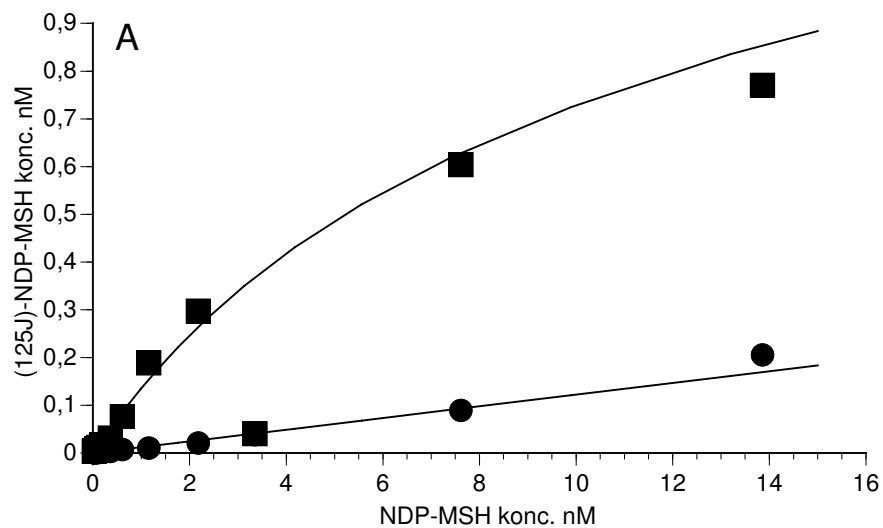
IFN $\gamma$  koncentrācijās 1 un 5 U/ml pastiprina MKR1 ekspresiju uz šūnu membrānām līdz 1000–1500 saistītšanās vietām uz šūnu. LPS 50 un 100 ng/ml koncentrācijā palielina MKR1 skaitu uz šūnu attiecīgi līdz 800 un 1000. Kā liecina aprēķini, IFN $\gamma$  ietekme izpaužas spēcīgāk nekā LPS. Pievienojot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

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

$\alpha$ -MSH un tā C gala tripeptīds no 1 nM līdz 1  $\mu$ 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 13. attēlā,

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

14. 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  $\mu$ M neiezīmētā NDP-MSH. Šūnu barotnei pievienotais LPS (100 ng/ml) kopā ar IFN $\gamma$  (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 (14.B att.). Tālāk NDP-MSH specifiskā saistīšanās nepieauga. 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.



**14. att. NDP-MSH piesātinājuma līknes RAW264.7 šūnās.**

14.A. pēc 16 h šūnu stimulācijas ar IFN $\gamma$  5 U/ml + LPS 100 ng/ml.

14.B. NDP-MSH piesātinājuma kontroles līknes. Nespecifiskā saistīšanās noteikta ar 1  $\mu$ M neiezīmēta NDP-MSH pievienošanu šūnu barotnei.

## 4. DISKUSIJA

### 4.1. NDP–MSH un $\alpha$ –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 – noradrenalīns, dopamīns, serotonīns,  $\gamma$ -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/nespēcificas NDP-MSH saistīšanās pie MKR1 attiecība ir 50:1. Līdzīgi rezultāti ir aprakstīti, pētot cilvēku melanomas šūnas (Eberle *et al.*, 1991). Aprēķinātās  $\alpha$ -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 ņēmām 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -MSH. Tomēr apmēram 14-20% receptoru ir rezistenti, un, kā liecina mūsu mērījumi, tie paliek uz šūnu membrānas pēc 24 h un 48 h. Astoņdesmitajos 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 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  $\alpha$ -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.

## 4.2. 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  $\alpha$ -MSH modulē ādas kolagēna ekspresiju (Bohm and Luger, 2004), uzrāda antifibrogēnu efektu (Bohm *et al.*, 2006) un inhibē audzēju nekrozes faktora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 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 atrodama (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,  $\alpha$ -MSH un  $\beta$ -endorfīns (Schiller *et al.*, 2001; Bohm and Luger, 2004), kuri varētu kalpot kā autokrīni/parakrīni receptoru ekspresijas modulatori. Tomēr mūsu eksperimentā fibroblastiem pievienotais  $\alpha$ -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.

### **4.3. 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 *DTrp-Nle-NH<sub>2</sub>* un *DTrp-Arg-NH<sub>2</sub>* (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  $\alpha$ -MSH stimulēto pigmentu dispersiju vārdes melanoforos ar inhibīcijas koncentrāciju ( $IC_{50}$ )  $483 \pm 189$  nM (Quillan and Sadee, 1996), bet neietekmēja cAMF līmeni. P viela neietekmēja  $\alpha$ -MSH efektus pat 100  $\mu$ 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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*).

#### **4.4. 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  $\alpha$ -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  $\text{IC}_{50}$  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.

#### **4.5. MSH11–13 un tā analogu ietekme uz MKR mediētajiem**

##### **procesiem šūnās**

##### **4.5.1. 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  $\alpha$ -MSH

(bet ne atsevišķi) stimulēt melanīna sintēzi JB/MS melanomas šūnās un vienlaikus stimulēt MK receptoru ekspresiju melanocītos. Ar šādu  $\alpha$ -MSH potencējošo darbību tika skaidrots IFN $\gamma$  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  $\alpha$ -MSH šajā iekaisuma modelī. Šajā darbā pētītajām vielām  $\alpha$ -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 $\gamma$  ir MKR1 svešas struktūras molekulas un pie MKR nesaistās – to pierādīja konkurences eksperimenti ar iezīmēto NDP-MSH. LPS un IFN $\gamma$  darbojas uz šūnu, saistoties attiecīgi pie saviem šūnas membrānas receptoriem. Endotoksīni LPS un IFN $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  spēcīgāk nekā LPS izraisa MKR1 ekspresijas pieaugumu. Savukārt  $\alpha$ -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.

#### 4.5.2. 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  $\alpha$ -MSH un MSH11-13 inhibē iezīmētā interleikīna IL-1 $\beta$  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 EC<sub>50</sub> apmēram 1 nM koncentrācijā (Wikberg *et al.*, 2000). Tomēr šajā gadījumā arī cAMF stimulācija notika  $\mu$ M koncentrācijā. Līdzīgi N9 un *Candida albicans* novērotā MSH11–13 spēja stimulēt cAMF produkciju tika aprakstīta tikai augstā koncentrācijā 1–10  $\mu$ M (Delgado *et al.*, 1998; Cutuli *et al.*, 2000).

Lineārie MSH11–13 analogi ar DVal<sup>13</sup> 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 $\gamma$  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- $\kappa$ B kā atslēgas posma lomu, kurš ir noteicošais citokīnu un iNOS ekspresijas regulators (Manna and Aggarwal, 1998).

Visu šo pētījumu rezultātā var secināt, 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 $\gamma$  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 analoģu 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.

## 5. 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  $\alpha$ -MSH, novēro MKR skaita samazināšanos uz šūnu membrānām, taču 14-20% MKR saglabājas intakti.
2. Baktēriju lipopolisaharīdi (LPS) un interferons  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) paaugstina MKR skaitu uz peļu makrofāgu šūnu RAW264.7 virsmas un izraisa NO pārprodukciju, kas liecina par iekaisuma procesu aktivēšanu.  $\alpha$ -MSH un tā C gala fragments MSH11-13 uzrāda pretiekaisuma darbību *in vitro*, jo inhibē LPS un IFN $\gamma$  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  $\kappa$  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  $\kappa$  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:  $\alpha$ -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.

## 6. PATEICĪBAS

Šis darbs tika finansēts no LZP granta 05.1419 un ESF doktorantūras un 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 kārtošānu.

Pateicos Guntai Strazdai un Ingrīdai Kalviņai par palīdzību un vadību doktorantūras un ESF lietvedībā.

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

Pateicos savai ģimenei.

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

Pateicos prof. R.Ligerei par palīdzību disertācijas rakstīšanā un noformēšanā.

## 7. LITERATŪRA

### Saīsināts literatūras saraksts no 177 citētajiem rakstiem promocijas darbā

- Akil H., Watson SJ., Young E., Lewis, M.E., Khachaturian, H., Walter, J.M. (1984) Endogenous opioids: Biology and functions. *Ann. Rev. Neurosci.*, **7**:223-255.
- 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.
- Bae, S.J, 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.
- 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-Borron JC. (2006) Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1966-1975.
- Catania, A., S. Gatti, G. Colombo & J.M. Lipton (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol. Rev.*, **56**, 1-29.
- Cone RD. (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr. Rev.*, **27**(7):736-749.
- Cutuli M., Cristiani S., Lipton J.M., Catania A.(2000) Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides, *J Leukoc. Biol.*, **67**: 233-239.
- Delgado R., Carlin A., Airaghi L., Demitri M.T., Meda L., Galimberti D., Baron P., Lipton J.M., Catania A. (1998) Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J. Leucoc. Biol.*, **63**:740-745.
- Eberle AN (1998) The Melanotropins: Chemistry, Physiology and Mechanisms of Action. Karger, Basel, pp 556.
- Eberle, A.N., Verin, V.J., Solca, F., Siegrist, W., Kuenlin, C., Bagutti, C., Stutz, S., Girard J. (1991) Biologically active monoiodinated  $\alpha$ -MSH derivatives for receptor binding sites studies using human melanoma cells. *J. Receptor Res.*, **11**:311-322.
- Folkers, K., Hakanson, R., Hong, J., Xu, J.C., Leander, S.(1984) Biological evaluation of Substance P antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **83**:449-456.
- Folkers, K., Hakanson, R., Feng, D., Xu, J.C., Janecka, A., Wang, Z. (1993) Spantide III, a superior tachykinin antagonist with high potency and negligible neurotoxicity. *Amino Acids*, **5**:233-240.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [ $^{15}\text{N}$ ]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**:131-138.
- 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.

- Hill RP, MacNeil S, Haycock JW. (2006) Melanocyte stimulating hormone peptides inhibit TNF- $\alpha$  signaling in human dermal fibroblast cells. *Peptides*, 27:421-430.
- Kameyama K., Tanaka S., Ishida Y., Hearing V. J. (1989) Interferons Modulate the Expression of Hormone Receptors on the Surface of Murine Melanoma Cells. *J. Clin. Invest.*, 83:213–221.
- Klusa, V., Germane, S., Svirskis, S., Opmane, B., Wikberg, J.E. (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.
- 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.
- Manna S., Aggarwal BB. (1998)  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B activation induced by various inflammatory agents. *J. Immunol.*, 161:2873-2880.
- Mugridge KG, Perretti M, Ghiara P, Parente L. (1991)  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone reduces interleukin-1 $\beta$  effects on rat stomach preparations possibly through interference with a type 1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 197:151-155.
- 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 J. E. (2001) MC(1) Receptors are Constitutively Expressed on Leucocyte Subpopulations with Antigen Presenting and Cytotoxic Functions. *Clin. Exp. Immunol.*, 126:441–446.
- 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.
- Quillan, J.M. (1995) Development of a combinatorial diffusion assay and discovery of MSH receptor antagonists. *UML, Ann Arbor*. Michigan, 1995.
- Quillan, J.M, Sadee, W. (1996) Structure-based search for peptide ligands that cross-react with melanocortin receptors. *Pharmaceutical Res.*, 13:1624-1630.
- Przewlocki, R., Przewlocka B. (2001). Opioids and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 429: 79-91.
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehffuss 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.
- Sawyer, T.K., Sanfilippo, P.J., Hruby, V.J., Engel, M.H., Heward, C.B., Burnett, J.B., Hadley, M.E. (1980) 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine-  $\alpha$ - melanocyte stimulating hormone: A highly potent  $\alpha$ - 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 H., Muceniece, R., Wikberg, J.E.S. (1996) Characterisation of melanocortin 4 receptor by radioligand binding analysis. *Pharmacol&Toxicol.*, 79:161-165.
- Schiöth HB, Muceniece R, Mutule I, Jarl Wikberg. JES. (2006) New melanocortin 1 receptor binding motif based on the C-terminal sequence of  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 99(4):287-293.
- Siegrist, W., Oestrreicher, M., Stutz, S., Girard, J., Eberle, A.N. (1988). Radioreceptor assay for  $\alpha$ -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, A.N. (1989) Characterization of receptors for  $\alpha$ - melanocyte stimulating hormone on human melanoma cells. *Cancer Res.*, 49:6352-6358.
- Siegrist, W, Stutz, S, Eberle, AN. (1994) Homologous and heterologous regulation of  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone receptors in human and mouse melanoma cell lines. *Cancer Res.*, 15:2604-2610.
- Szabo C. (1995) Alternations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz.*, 3:2-32.
- Telgkamp, P., Cao, Y.Q., Basbaum, A.I., Ramirez, J.M. (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.
- Van Hagen, P.M., Hofland, L.J., ten Bokum, A.M., Lichtenauer-Kaligis, E.G., Kwekkeboom, D.J., Ferone, D., Lamberts, S. (1999) Neuropeptides and their receptors in the immune system. *Ann. Med.*, Oct;31 Suppl 2:15-22.
- Vriten, D.H, Kalkman, C.J, Adan, R.A., Gispen, W.H. (2001a) Neuropathic pain: a possible role for the melanocortin system? *Eur. J. Pharmacol.*, 429 (1-3):61-69.
- Watanabe T., Hiltz M., Catania A., Lipton JM. (1993) Inhibition of IL-1 $\beta$ -induced peripheral inflammation by peripheral and central administration of analogs of the neuropeptide  $\alpha$ -MSH. *Brain Research Bulletin*, 32:311-314.
- 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.
- Wong, W., Minchin, R.F. (1996) Binding and internalization of the melanocyte stimulating hormone receptor ligand [Nle<sup>4</sup>, D-Phe<sup>7</sup>]  $\alpha$ MSH in B16 melanoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 11:1223-1232.
- Xia, Y., Skoog, V., Muceniece, R., Chhajlani, V., Wikberg, J.E.S. (1995) 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, J.E.S. (1996) Immunological localization of melanocortin 1 receptor on the cell surface of WM266-4 human melanoma cells. *Cancer Lett.*, 98:157-162.

**UNIVERSITY OF LATVIA**

**Faculty of Medicine**

**STUDIES ON MELANOCORTIN RECEPTORS  
AND THEIR LIGANDS *IN VITRO***

**Līga Krīgere**

**Synopsis of the doctor's thesis**

**submitted for the Dr. pharm. degree in pharmaceutical  
pharmacology**

**Rīga**

**2007**

# CONTENT

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>53</b>
<b>LIST OF PUBLICATIONS.....</b>	<b>55</b>
<b>ABBREVIATIONS.....</b>	<b>58</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>59</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>62</b>
2.1. Reagents.....	62
2.2. Studied peptides.....	62
2.3. Cell lines.....	63
2.4. Cell culturing.....	63
2.4.1. Cell transfection.....	63
2.5. MCR DNA constructs.....	63
2.6. Ligand-receptor binding.....	64
2.7. Measurement of nitric oxide (NO) production.....	65
2.8. Measurement of cAMP generation.....	65
2.9. Statistical analysis.....	65
<b>3. RESULTS.....</b>	<b>66</b>
3.1. Characterization of binding kinetics of $\alpha$ -MSH and its analog [Nle <sup>4</sup> , DPhe] $\alpha$ -MSH in mouse melanoma cell line B16-F1.....	66
3.2. Binding of SP antagonist Spantide I to MCR.....	70
3.3. Influence of Spantide I on NO production in mouse macrophage cell line RAW264.7.....	72
3.4. Binding of dynorphins to MCR.....	73
3.5. Studies on primary human fibroblast cells: expression of MCRs and cAMP generation.....	74
3.6. Binding of $\alpha$ -MSH11-13 analogues to MCR.....	76
3.7. Influence of MSH11-13 and its analogues on generation of cAMP in B16-F1 and RAW264.7 cells.....	77
3.8. Influence of MSH11-13 analogues on the production of NO in RAW264.7 cells.....	78
3.9. Influence of $\alpha$ -MSH and MSH11-13 on expression	

of MCR1 in macrophage cell line RAW264.7.....	79
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>81</b>
4.1. Kinetics of NDP-MSH and $\alpha$ -MSH binding to MCR.....	81
4.2. Characterization of human primary fibroblast cells.....	84
4.3. Binding of Spantide I to MCR and influence on NO production.....	85
4.4. Peculiarities of dynorphin binding to MCR.....	87
4.5. Influence of MSH11-13 and its analogues on MCR-mediated cell responses.....	88
4.5.1. Influence of MSH11-13 on the localization of MCR1 on macrophage cell membranes.....	88
4.5.2. The role of stereoisomery and cyclization in the action of MSH11-13 analogues.....	89
<b>5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>92</b>
<b>6. ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>93</b>
<b>7. REFERENCES.....</b>	<b>94</b>

## 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  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -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  $\alpha$ -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- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) as well as to determine the influence of  $\alpha$ -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  $\kappa$  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  $\alpha$ -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 $\gamma$  increase number of the MCRs simultaneously with NO overproduction in RAW264.7 cell line. The NO overproduction is taken as sign of inflammation.  $\alpha$ -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-NH<sub>2</sub> (II) were free amino groups. Cyclic analogs

Ac-Lys-Pro-Val (III) and Ac-Lys-Pro-DVal (IV) have free  $\alpha$ -amino groups but  
 $\text{I} \text{---} \text{I}$                        $\text{I} \text{---} \text{I}$   
different Val configuration (L and D). The cyclopeptides c(Lys-Val) (V) and c(Lys-DVal) (VI) have free  $\epsilon$ -amino groups whereas L un DVal is inside the cycle. The potency order of these peptides to inhibit NO overproduction is following:  $\alpha$ -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, whereas 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.

## LIST OF PUBLICATIONS

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 [Nle<sup>4</sup>, D-Phe<sup>7</sup>]- $\alpha$ -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.



## **Conferences and congresses:**

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. Krigere 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.*

## ABBREVIATIONS

ACTH	adrenocortikotropin
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone
$\beta$ -LPH	$\beta$ -lipotropin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
GABA	$\gamma$ -amino butyric acid
GDP	guanozine monophosphate
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
IBMX	3-isobutyl-1-metilxantine
IkappaB	inhibitory kappaB protein
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration 50
IL-10	interleukin- 10
K <sub>i</sub>	inhibition constant
LPH	lipotropin
LPS	bacterial lipopolysaccharide
NED	naftiletildiamine
MC	melanocortins
MCR	melanocortin receptor
MTI	melanotan I
MTII	melanotan II
POMC	proopiomelanocortin
PKA	proteinkinase A
SP	substance P
TM	transmembrane domain
U/ml	units per ml

## 1. INTRODUCTION

Since five melanocortin receptor (MCR) cloning in years 1992–1993, studies on the MCRs and their ligands are included in many fundamental research projects as well as in projects of 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 novel drug development strategies may influence applied science.

Initially the physiological role of MCRs was described as regulation of pigmentation therefore the first synthetic analog of natural hormone  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) – Nle-DPhe-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, MCR4 agonists – antiobesity drugs (Hadley and Dorr, 2006).

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 their suitability to serve as corresponding receptor donors or for the characterization of cell intrasignalling pathways. Few years ago MCR subtype 1 (MCR1) was discovered in cells of immune system, and then followed search for the MCR1 selective ligands. Recently MCR subtype 3 (MCR3) was also discovered in cells of immune system and direction of target-oriented compound screening changed. Nowadays MCR3 is supposed to be the main MCR responsible for the anti-inflammatory action of MCR agonists (Catania *et al.*, 2004). Thus, strategy of the drug development is changed in parallel with the fundamental discoveries. Moreover, classical knowledge about G protein coupled receptors is changed. Until year 2005 it was generally accepted that receptors of this family bind ligands as monomers. However, the latest publications show receptor dimers or oligomers (Mandrika *et al.*, 2005). Nowadays is impossible to predict what these discoveries will add to the new drug design theory.

Cell functions, biochemical reactions and adaptive possibilities to the changing environment are influenced by different stimuli that regulate cell differentiation, apoptosis

or death. As better will be characterized cell lines, as better results obtained *in vivo* will correspond to the data obtained in tests *in vitro*. Therefore different cell lines are studied simultaneously with a new compound synthesis to find characteristic features of each cell. In this doctoral work mouse melanoma, mouse macrophage cell lines and human fibroblasts were studied in–depth to clarify peculiarities of the expressed MCRs and kinetics how ligands bind to these receptors.

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 as well as 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.

Here we examined binding of substance P (SP) and its antagonist Spantide I to the MCRs. It is known that SP in inflammation tests acts contrary to MSH peptides whereas SP antagonists show similar to MCs anti-inflammatory effects. Also, melanocortins may influence non-melanocortin-ergic systems that participate in the regulation of pain and psychoemotional status. Mechanisms of action of different compounds could be different but pharmacological effect is similar. The interaction between MCRs and opiate receptors was confirmed by found HS014 (antagonist of MCR3 and MCR4) analgesic activity *via* opiate receptors. Here we report dynorphine binding to the MCRs.

MCs are formed during bioprocessing of a large precursor proopiomelanocortin (POMK) molecule. However, further metabolism of MSH peptides is not fully understood. Although MSH11-13 endogenous existence is not proved, this tripeptide in parallel with whole molecule  $\alpha$ -MSH is studied as anti-inflammatory, anti-fungal, anti-fever pro-drug. With goal to find more active substances, the MSH11-13 analogues are synthesized and tested. Here we studied linear and cyclic MSH11-13 analogues to find structural determinants, important for the small peptide anti-inflammatory action.

#### **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  $\alpha$ -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- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) as well as to determine the influence of  $\alpha$ -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  $\kappa$  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.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Reagents

All reagents, except peptides and cell culturing reagents were bought from *Sigma/Aldrich* representative in Latvia – NotaBene. Radiolabelled ligands [<sup>125</sup>J]NDP-MSH and [<sup>3</sup>H]cAMP were bought from *Amersham Bioscience* (Sweden). All cell culturing reagents were obtained from *Life Technologies*, Sweden.

### 2.2. Studied peptides (table 1)

Peptides were bought from *Neosystem* France, *Saxon Biochemicals* GMBH Germany and *Bachem* Switzerland. MSH11-13 analogues were gift from Dr. Helga Suli-Vargha (Peptide chemistry group Eotvos University, Hungary). Peptides were dissolved in 0.9% NaCl, aliquoted and kept until use at – 20 C<sup>0</sup>.

**Table 1. Structures of the studied peptides**

No.	Peptide	Sequence of amino acids
1.	α-MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
2.	NDP-MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
3.	MSH11-13	Ac- Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
4.	SP	<sub>2</sub> HN-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>
5.	Spantide-I	DArg-Pro-Lys-Pro-Gln-DTrp-Phe-DTrp-Leu-Leu-NH <sub>2</sub>
6.	α-neo-endorphin	<sub>2</sub> HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-OH
	Dynorphins	
7.	D-A1-17	<sub>2</sub> HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH
8.	D-A2-17	<sub>2</sub> HN-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH
9.	D-A2-11	<sub>2</sub> HN-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-OH
10.	D-A1-13	<sub>2</sub> HNTyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-OH
11.	D-A1-6	<sub>2</sub> HN- Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-OH
12.	Dynorphin B (D-B)	<sub>2</sub> HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-OH
13.	Met-enkephalin	<sub>2</sub> HN- Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH
14.	Leu-enkephalin	<sub>2</sub> HN-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH
	<b>MSH11-13 analogues</b>	
15.	I	Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
16.	II	Ac- Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
	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)

### **2.3. Cell lines**

Cell lines were bought from ATCC cell bank in USA. Registration codes: RAW264.7 - ATCC TIB-71, COS-7 – ATCC CRL-1651, B16-F1 – ATCC CRL-6323. Human dermal fibroblasts (HDFs) cells were purchased from Cell Systems, St. Katharinen, Germany.

### **2.4. Cell culturing**

Each cell line was grown in cell cultures according to the cell growing certificate. COS-7, B16-F1 and human fibroblasts were cultivated in Dulbecco's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic/antifungal mix 1% penicilline/streptomycine, 0.5% amfotericine. RAW264.7 cells were cultivated in RPMI-1640 medium with 10% FBS and 1% antibiotics. Cells were cultivated in cell incubator at temperature 37<sup>0</sup> C 5% CO<sub>2</sub> atmosphere until 80% confluence was reached. Then cells were harvested, counted and used in experiments. B16-F1, RAW264.7 and primary human fibroblasts express MCRs therefore they were used in experiments after harvesting.

#### **2.4.1. Cell transfection**

COS-7 cells do not express naturally MCRs therefore they were transfected with corresponding receptor DNA constructs in expression vectors. Briefly, in Ependorph tube were mixed 70 µl of OptiMEM medium, 20 µl Lipofectin reagent, and 1 µg plasmid DNA for 1 million cells. Mixture was incubated at room temperature 1 min. To COS-7 cell monolayer OptiMEM medium was added and drop by drop prepared mixture. Then cells were grown 5–24 h, OptiMEM medium changed to the appropriate cell growth medium for next 48 h. After that cells were harvested, counted and used in experiments.

### **2.5. MCR DNA constructs**

MCR1 and MCR5 DNA were cloned into pRc/CMV expression vector (Fig.1., *Invitrogen*), MCR3 and MCR4 DNA cloned into pCMV/neo expression vector (Fig. 2) were gift from Prof. Ira Gantz, University of Michigan, USA.

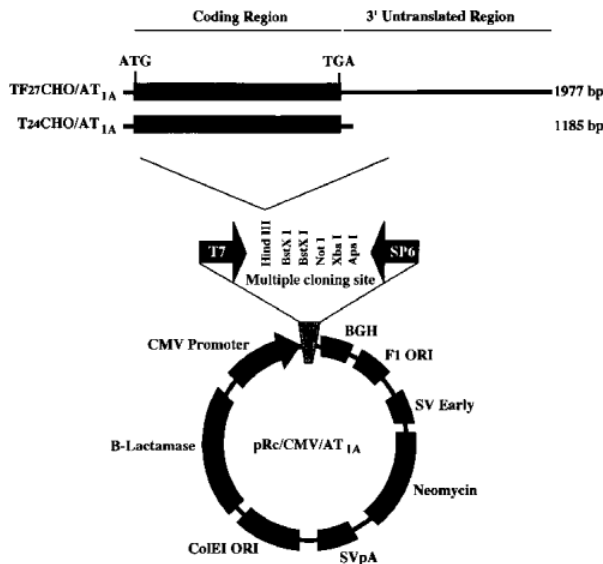


Fig. 1. pRc/CMV expression vector (*Invitrogen* catalog)

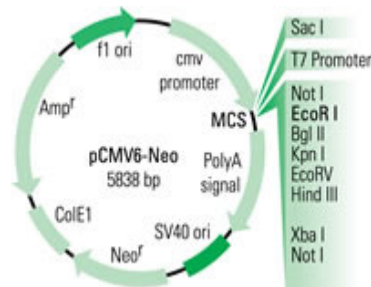


Fig.2. pCMV/neo vector (*Origene* catalog)

## 2.6. Ligand–receptor binding

Assays of peptide binding to human MCs receptors were performed using [ $^{125}$ I][Nle<sup>4</sup>,D-Phe<sup>7</sup>] $\alpha$ -MSH (in text called [ $^{125}$ I]NDP-MSH) radioligand binding as described earlier (Schiöth *et al.*, 1996). Cells were taken from growing plates, washed with binding buffer (Minimum Essential Medium with Earle's salts, pH 7.0, 0.2% bovine serum albumin, 1mM 1,10-phenanthroline, 0.5 mg per liter leupeptin and 200 mg per liter bacitracin) and then distributed into 96-well binding plates – 50 000 cells per well. The cells were then incubated for 2 h at 37<sup>0</sup> C with binding buffer containing in each well constant concentration 0.2 nM of labelled NDP-MSH and unlabelled ligand. After the incubation plates were put on ice and the cells were washed with ice-cold binding buffer and detached from the plates with 0.1 M NaOH. After that the amount of bound radioactivity was counted with 1450 Microbeta Trilux (Wallac,



Finland) liquid scintillation and luminescence counter and data analyzed with the GraphPad Prism.

## **2.7. Measurement of nitric oxide (NO) production**

RAW 264.7 cells were grown until confluence. Before experiment cells were scraped off from Petri dishes, centrifuged and resuspended in RPMI 1640 medium without Phenol red supplemented with 2 mM L-glutamate. Cells were seeded in 96 well plates at a density 500,000 per well and incubated in the above mentioned medium with combination of LPS ( from *Escherichia coli*) 100 ng/ml and IFN $\gamma$  5 units per ml and peptides of interest for 16 h at 37 $^{\circ}$  C in the cell incubator. As control were used cells exposed to LPS + IFN $\gamma$  (without drug) and unstimulated cells. After 16 h nitrite release was determined by mixing 50  $\mu$ l of culture medium with 50  $\mu$ l of Griess reagent (Green *et al.*, 1982). After 10 min absorbance was measured at 540 nm with *Novo Biolabs* kinetic microplate reader (*Molecular Devices*).

## **2.8. Measurement of cAMP generation.**

Cells were harvested and pre-incubated for 30 min at 37 $^{\circ}$  C in DMEM without FBS containing 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxantine (IBMX). After pre-incubation the cells were distributed 50 000 cells/well into 96-well microtiter plates, centrifuged and supernatant was discarded. Then to the cell monolayer appropriate concentrations of peptide of interest in 0.05 ml of the DMEM + IBMX were added. The cells were incubated for 20 min in the cell incubator. The cAMP was extracted by adding 4.4 M perchloric acid to achieve a final concentration of 0.4 M. After 5 min extracts were neutralized with 5M KOH/1 M TRIS and centrifuged. The cAMP concentration in the supernatant was measured by using a bovine adrenal binding protein binding assay as described (Nordstedt and Fredholm 1990) and cAMP concentration in the samples was calculated according to standard curve obtained in the same way.

## **2.9. Statistical analysis**

Data analysis was performed using computer programs Microsoft Excel 2000 for Windows and GraphPad Prism 3.00. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test; Student's *t*-test (*2-tailed t test*). Results were calculated as the mean  $\pm$  S.E.M. Significance of the obtained results was reached if *p* value was less than 0.05.

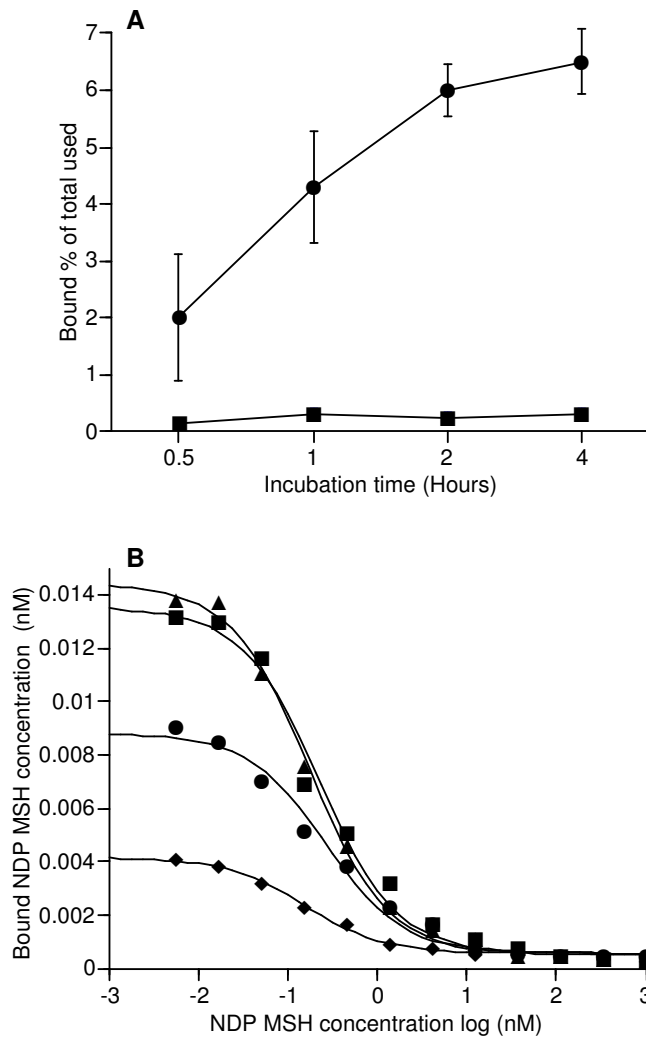
### 3. RESULTS

#### 3.1. Characterization of binding kinetics of $\alpha$ -MSH and its analog [Nle<sup>4</sup>, DPhe<sup>7</sup>] $\alpha$ -MSH in mouse melanoma cell line B16-F1

Constant concentration of [<sup>125</sup>I]-NDP-MSH 0.2 nM was incubated different time with B16-F1 cells distributed 100000 cell per well. As shown in Fig.3A the percent of [<sup>125</sup>I]NDP-MSH specifically bound to MCR1 located on B16-F1 cells in % of total binding during 4 h is about 7-10 %. It means that hot was used in superfluous amount that allows the [<sup>125</sup>I]NDP-MSH to saturate the receptors. Non specific binding was detected by blocking receptors with high (1  $\mu$ M) concentration of cold NDP-MSH, and it was negligible. Binding of the [<sup>125</sup>I]NDP-MSH to B16-F1 cells increased with time and almost reached the plateau at about 2 h. In this experiment maximal incubation time was 4 hours, and it gave approximately the same [<sup>125</sup>I]NDP-MSH binding as after 2 h. The results of the competition binding assay carried out with constant concentration of labeled and varying concentrations of the cold NDP-MSH added simultaneously to cells after the samples' incubation 0.5, 1, 2 and 4 h did not show significant K<sub>i</sub> differences but variations between independently performed studies were bigger after 0.5 and 1 h incubation time than after 2 or 4 h (Table 2).

**Table 2. Inhibition constants of NDP-MSH obtained after different incubation time in three independent experiments carried out in duplicates**

Peptide	0.5 h K <sub>i</sub> (nM)	1 h K <sub>i</sub> (nM)	2 h K <sub>i</sub> (nM)	4 h K <sub>i</sub> (nM)
NDP-MSH	0.046 $\pm$ 0.038	0.051 $\pm$ 0.033	0.060 $\pm$ 0.008	0.102 $\pm$ 0.02

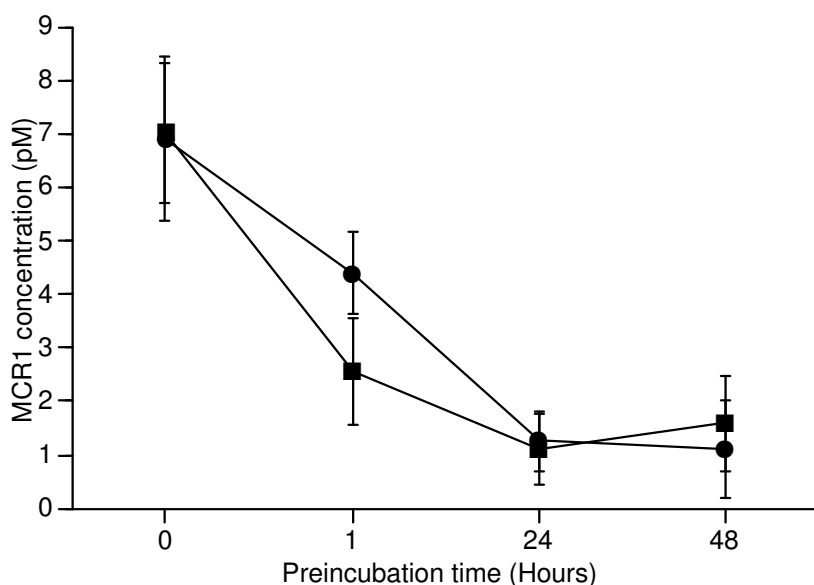


**Fig.3. Binding of [<sup>125</sup>I]NDP-MSH at constant concentration 0.2 nM at different incubation time to B16-F1 mouse melanoma cells distributed 100000 cells/per well.**  
 A. ■ non specific binding curve detected by blocking MC1 receptors with NDP-MSH at 1μM concentration, ● total binding curve of [<sup>125</sup>I]NDP-MSH to MCR1 receptors  
 B. Competition binding curves obtained after simultaneously added [<sup>125</sup>I]NDP-MSH and unlabeled NDP-MSH at different incubation time intervals (◆) 0.5 h, (●) 1 h, (■) 2 h, (▲) 4 h. Binding experiments were performed in the duplicates and repeated three times.

However, in the another set of experiments with 1 h preincubation of the B16-F1 cells with 1 μM α-MSH or NDP-MSH in the growing media supplemented with protease inhibitors before adding the constant concentration of the [<sup>125</sup>I]NDP-MSH (0.2 nM) at varying time, decrease of receptor number per cell was observed (Fig.4).

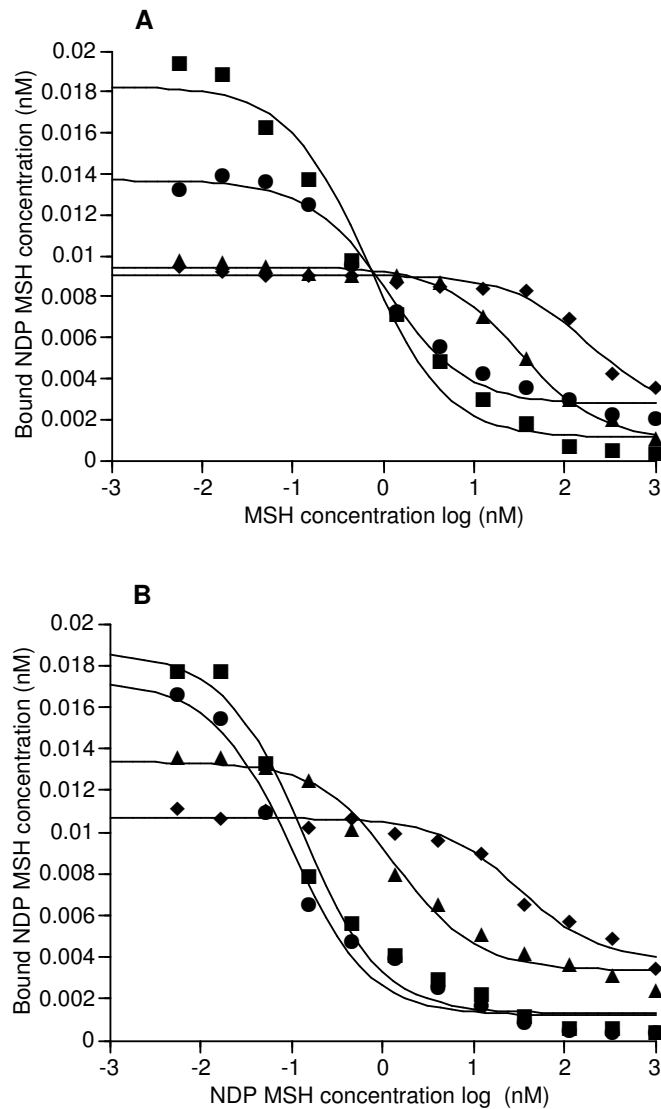
After 1 h preincubation time media with free unbound peptide was removed and cells were washed with media supplemented with protease inhibitors. Varying binding performance time was chosen to study kinetics of receptor occupancy by cold peptide, and duration of the receptor down regulation or internalization. As control served data after [<sup>125</sup>I]NDP-MSH binding without preincubation with unlabeled peptide.

Calculation of the receptor protein concentration in the assay after 1, 24 and 48 h time in the comparison with 0 h showed that the biggest decrease in the receptor level was during 1-24 h. Down-regulation or continuous occupancy by cold peptide of the MCR1 receptors was long lasting but it was not progressing, because after 48 h receptor protein concentration was at the same level as after 24 h. Thus, after 48 h we still did not see receptor recovery up to the control level but noticed that same portion of receptors is intact.



**Fig.4. Decrease of MC1R concentration obtained in the binding assay performed after preincubation of the B16-F1 cells with NDP-MSH 1µM (●) and α-MSH 1µM (■).** Each point represents mean  $\pm$  S.E.M in pM of three independent experiments performed in the duplicates.

Time-effect relations were also observed in the comparative competition assay (Fig.5A). It was shown that after 0.5 h bound [ $^{125}$ I]NDP-MSH concentration was only 1/3 from bound after 2-4 hours but maximal bound concentration in the experiments with incubation time 2 and 4 hours differ insignificantly. Starting approximately at 10 nM concentration of cold NDP-MSH complete displacement of hot was registered at all curves obtained after the corresponding incubation time.



**Fig.5. Competition curves of  $\alpha$ -MSH (Fig.5A ) and NDP-MSH (Fig.5B) obtained by using a fixed concentration of 0.2 nM of the [ $^{125}$ I]-NDP-MSH and varying concentrations of the non-labeled peptides after different pre-incubation time intervals: 0 h (■), 1 h (●), 24 h (▲), 48 h (◆). Each binding experiment was performed in duplicate and repeated three times.**

During variable preincubation time with  $\alpha$ -MSH in the variable concentrations (Fig.5A) down-regulation of receptors was noticed already after 1 h but competition curve after 1 h preincubation was similar to 0 time curve. Contrary, after 24 h and 48 h displacement of cold peptide by labeled NDP-MSH was observed only in the wells with higher concentrations of the  $\alpha$ -MSH, namely, in the wells with 10 nM up to 1  $\mu$ M concentration after 24 h preincubation and in the wells with 100 nM up to 1  $\mu$ M concentration after 48 h. It means loss of the  $\alpha$ -MSH in the incubation samples despite of the usage of the protease inhibitors or internalization of ligand-receptor complex.

It was shown in the Fig. 5B that long lasting incubation of the cells with the NDP-MSH less influenced profile of the binding curves. There were clearly seen curves also after 24 and 48 h. It can be explained with differences in  $K_d$  values of the  $\alpha$ -MSH ( $0.684 \pm 0.043$ ) and NDP-MSH ( $0,05 \pm 0.006$ ), therefore, remaining concentration of NDP-MSH in the wells of the highest concentration dilutions was sufficient to compete and displace [ $^{125}$ I]NDP-MSH from the binding sites.

### 3.2. Binding of SP antagonist Spantide I to MCR

In order to characterize the Spantide I and  $\alpha$ -MSH binding to MCRs the transiently expressed receptors on the COS-7 cells were used.  $K_i$  values of peptides are compared in Table 3.

**Table 3.  $K_i$  values (mean  $\pm$  SEM), obtained from competition curves, for  $\alpha$ -MSH, Spantide I and SP (n= 3 independent experiments in duplicates)**

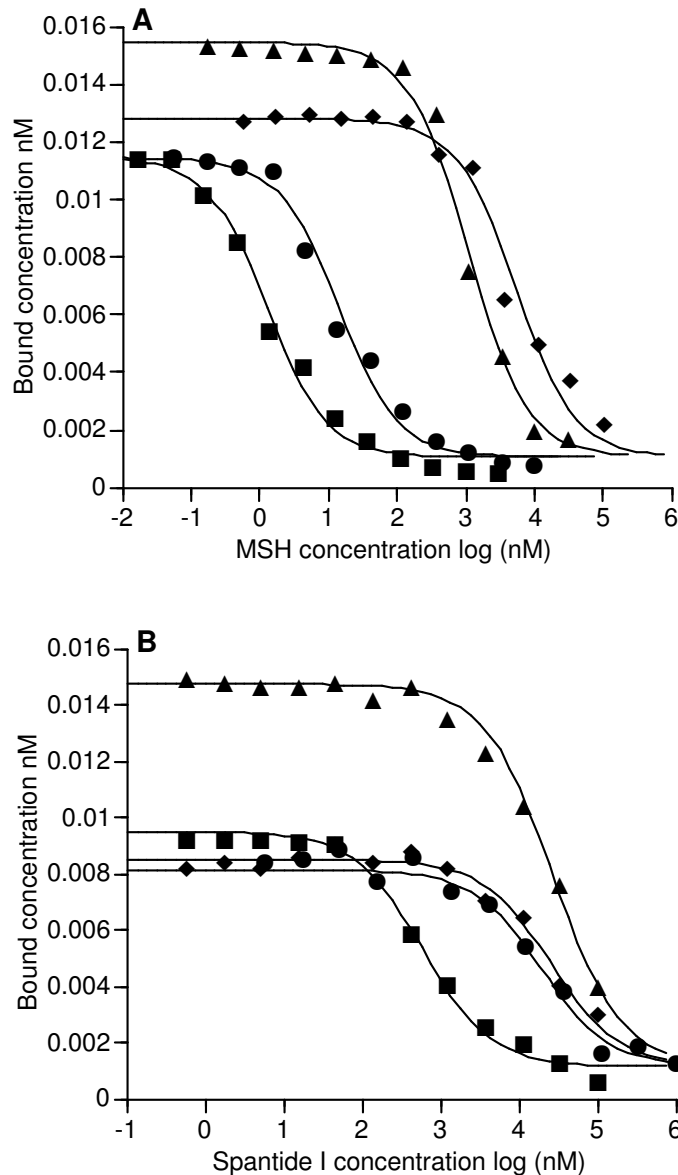
Ligand	MCR1 $K_i$ (nM)	MCR3 $K_i$ (nM)	MCR4 $K_i$ (nM)	MCR5 $K_i$ (nM)
$\alpha$ -MSH	$0.132 \pm 0.043$	$14.2 \pm 1.25$	$760 \pm 39$	$4054 \pm 142$
Spantide I	$1236 \pm 470$	$19929 \pm 1435$	$22848 \pm 194$	$17825 \pm 1523$
SP	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

n.b. – no binding. Experiments were repeated three times in duplicates.

$\alpha$ -MSH  $K_i$  values obtained from competition curves are in the agreement with our earlier published ones (Schiöth *et al.*, 1995; Schiöth *et al.*, 1996).  $\alpha$ -MSH binding potency order is as usually MCR1>MCR3>MCR4>MCR5. Spantide I shows lower affinity to all of MCRs. Obtained Spantide I  $K_i$  values to all MCRs are in the micromolar range. Spantide I almost equally binds to the all human MCRs. However, there is a little preference of Spantide I to bind to MCR1. Thus, Spantide I binding potency order is comparable with  $\alpha$ -MSH and it is following: MCR1>MCR3=MCR4=MCR5. SP did not bind at all to MCRs up to 100  $\mu$ M concentration used in this assay.

Competition curves of the  $\alpha$ -MSH are presented in the Fig.6A but of the Spantide I in the Fig. 6B. The MCRs were expressed transiently, therefore, as it can be seen from

figure, expression levels may vary from experiment to experiment, and here obtained receptor expression levels are not as a role in the same order in the all experiments. However, MCR4 expression level is noticed more often to be higher than other MCRs. As it is shown in the Fig.6 both peptides displace  $[^{125}\text{I}]\text{NDPMSH}$  completely. For all MCRs non-specific binding was found to be less than 10 %.



**Fig.6A. Binding of  $\alpha$ -MSH and Fig.6B binding of Spantide I to the human MCRs in the COS-7 cells.**

COS-7 cells were transiently transfected with corresponding MCRs cDNAs:

■ MC1R, ● MC3R, ▲ MC4R, ◆ MC5R.

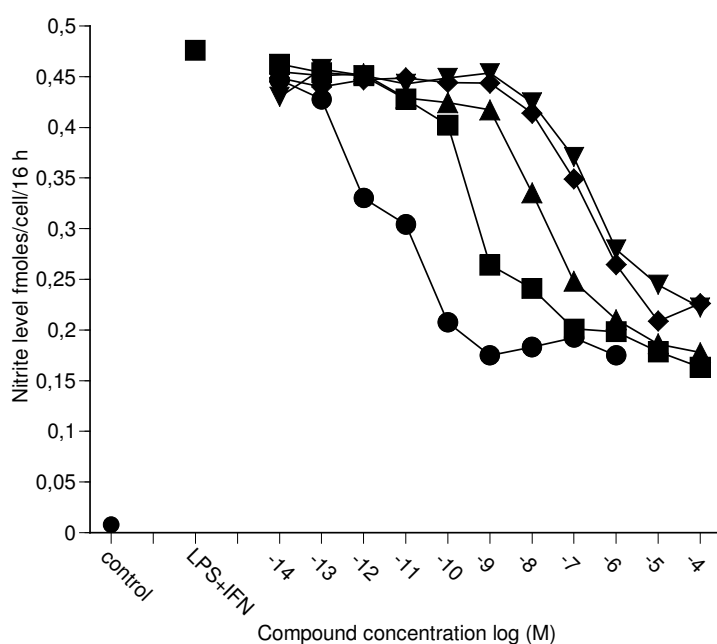
$[^{125}\text{I}]\text{-NDP-MSH}$  was used at constant concentration 0.2 nM.

Binding experiments were performed in the duplicates and repeated three times.

### 3.3. Influence of Spantide I on NO production in mouse macrophage cell line RAW264.7

RAW264.7 cells were stimulated 16 h with NO production increasing agents – LPS of 100 ng/ml and IFN- $\gamma$  of 5 U/ml (Fig. 7). Spantide I and  $\alpha$ -MSH was added simultaneously with endotoxins as well as alone 16 h before the NO measurements.

In control cells (without endotoxins) both peptides did not influence the basal NO level (data not shown). As seen in Fig.7, Spantide I inhibits NO overproduction at higher concentration as  $\alpha$ -MSH, nevertheless, both peptides inhibit NO overproduction approximately 60%. However, basal NO level was not reached. With goal to prove that Spantide I acts *via* MCR, 15 min before the peptide adding to the cell medium, HS024 as known MCR antagonist, was added at constant 100 nM and 1  $\mu$ M concentration. HS024 blocked the effect of  $\alpha$ -MSH at concentration of 100 nM, whereas to inhibit the effect of Spantide I, 10-fold higher concentration (1  $\mu$ M) of HS024 was needed. Cell viability was measurement to exclude the decrease of cell number that could mislead the interpretation of the results. Data showed that living cell number was not changed, comparing cell numbers in the control and experimental cultures.



**Fig.7. Inhibition of NO overproduction by Spantide I and  $\alpha$ -MSH.**

The cells were stimulated for 16 h with LPS (100 ng/ml) and IFN- $\gamma$  (5 U/ml) in the presence of various concentrations of the peptides. The graph shows dose response curves of  $\alpha$ -MSH (●), Spantide I (■),  $\alpha$ -MSH + HS024 100 nM (◆), Spantide I + HS024 100 nM (▲), Spantide I + HS024 1  $\mu$ M (▼).



### 3.4. Binding of dynorphins to MCR

We have found that enkephalins did not bind to MCR up to 10 mM concentration and that  $\alpha$ -neo-endorphin, dynorphin B (D-B), dynorphin A 1-6 (D-A(1-6)) did not replace [<sup>125</sup>I]NDP-MSH from binding sites up to 100  $\mu$ M concentration (Table 4).

As it is shown in the comparison with  $\alpha$ -MSH dynorphins (except D-B and D-A(1-6)) bind with low binding affinities to all MCR. However, there were some peculiarities obtained, for example, that D-A(1-17) bound similarly to MCR1 and MCR3 receptor, as well as to MCR4 and MCR5. D-A (2-17) showed similar binding affinities to MCR1 and MCR4, and lower affinity to MCR3 and MCR5 receptors. D-A(2-11) bound better to MCR1 than to other MC receptors, showing only negligible binding to MCR4. D-A(1-13) bound almost equally to MCR1, MCR3 and MCR5, showing lowest affinity to MCR4 receptor. Such binding potency order was not familiar for MC peptides which usually showed the best binding affinities to MCR1, than to MC3>MC4>MC5. Another peculiarity is that shorter D-A(1-6) peptide did not bind at all to MC receptors. Shortening of the D-A(1-17) on the first amino acid Tyr, led to decrease of affinity to MCR3 but increase to MCR4. On the other hand, shortening of the D-A(1-17) to 13 amino acid long peptide D-A(1-13), resulted in the almost identical to D-A(1-17) binding (except to MCR5).

**Table 4. Binding affinities of peptides to MC receptors (average  $K_i \pm$  S.E.M.)**

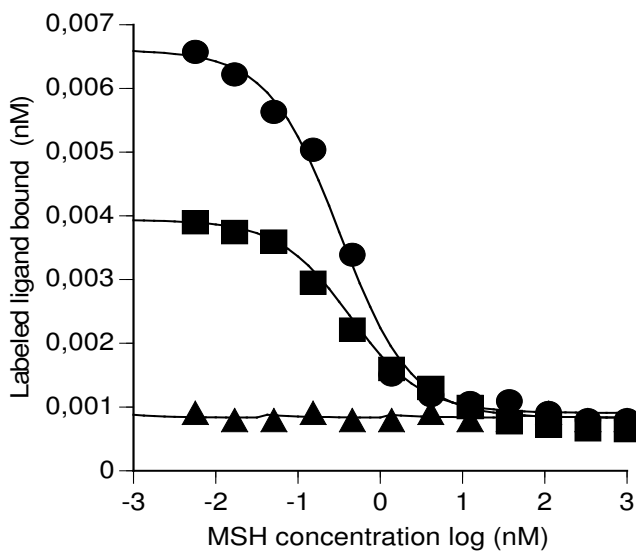
Peptide	MCR1 ( $K_i$ nM)	S.E.M	MCR3 ( $K_i$ nM)	S.E.M	MCR4 ( $K_i$ nM)	S.E.M	MCR5 ( $K_i$ nM)	S.E.M
$\alpha$ -neo-endorphin	>100000		>100000		>100000		>100000	
D-B	>100000		>100000		>100000		>100000	
D-A(1-17)	6860	281	6296	414	70779	3605	179290	64612
D-A(2-17)	2339	886	40065	30357	5990	143	60638	39362
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-enk.	n.b.		n.b.		n.b.		n.b.	
Leu-enk.	n.b.		n.b.		n.b.		n.b.	
$\alpha$ -MSH	0.210	0.08	22	3.4	432	76	5400	377

D- dynorphin; n.b. – no binding

### 3.5. Studies on human primary fibroblast cells: expression of MCRs and cAMP generation

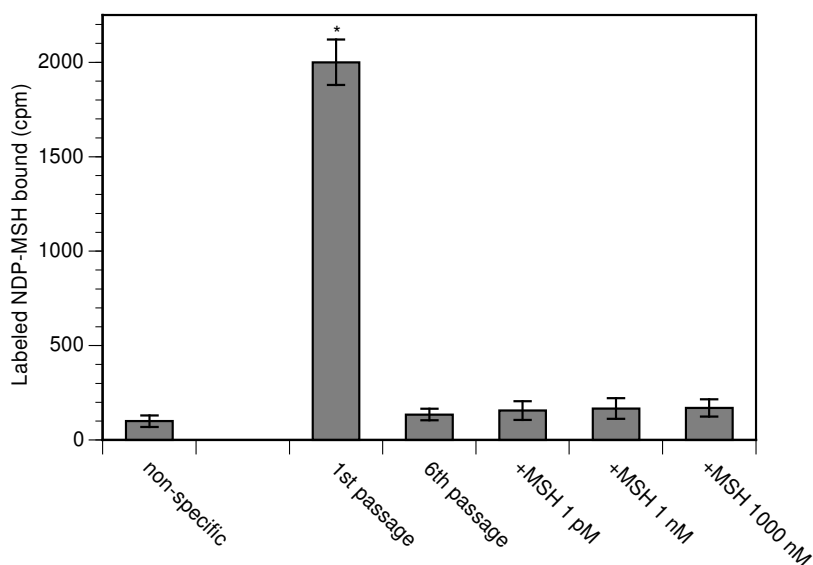
In the radioligand binding assay by using labelled [ $^{125}$ I]NDP-MSH we obtained characteristic for  $\alpha$ -MSH competition curve and calculated value of  $\alpha$ -MSH inhibition constant ( $K_i$ ) to be of  $0.12 \pm 0.034$  nM that corresponds to the  $\alpha$ -MSH binding to the MC-1R (Schiöth *et al.*, 1996). However, as seen from Fig.8, the  $\alpha$ -MSH binding was reduced during three cell passages and completely lost after six.



**Fig.8. Competition curves of  $\alpha$ -MSH obtained on human fibroblasts cells after 1<sup>st</sup> passage (circles), after 3<sup>rd</sup> passage (squares) and after 6<sup>th</sup> passage (triangles).** Experiments were performed in triplicates and repeated 3 times.

In the other experimental set-up HDFs after the six passages were grown in the cell medium supplemented with  $\alpha$ -MSH at concentrations of  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$  and  $10^{-6}$  M. Fig.8 shows that labelled NDP-MSH did not label MC receptors on the cell surfaces neither after 6<sup>th</sup> passage nor after  $\alpha$ -MSH stimulation. As positive control served HDFs after first passage and as negative control - non-specific NDP-MSH binding, obtained

on the first passage cells by using high excess of the  $\alpha$ -MSH (concentration of 10  $\mu$ M) for the displacement of the radioligand.



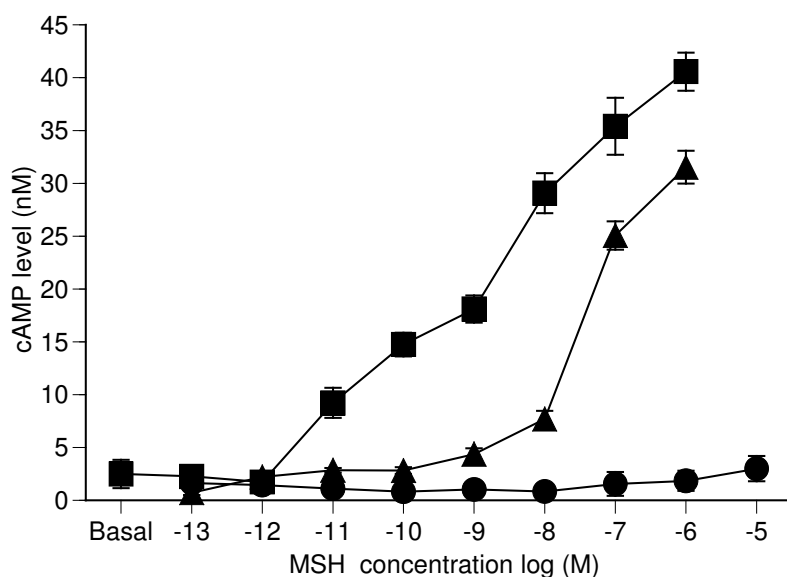
**Fig.9. Stimulation of the MC-1R expression in the human fibroblast cells by  $\alpha$ -MSH at varying concentrations.**

Experiments were repeated 3 times in triplicates. Data are means  $\pm$  S.E.M.

\*  $p \leq 0.05$  vs non-specific binding control;

cpm – counts per minute

It is known that all MC receptors are G-protein-coupled receptors whose interaction with ligand results as a cAMP generation therefore to investigate the functional coupling of the MC receptors on HDFs, we performed cAMP measurements in cells stimulated with varying concentrations of  $\alpha$ -MSH. As shown in Fig.10,  $\alpha$ -MSH concentration-dependently increased cAMP level as compared with non-stimulated control cells.  $\alpha$ -MSH reached maximum of the effect at concentration of 1  $\mu$ M. In line with the binding experiments, we did not observe  $\alpha$ -MSH stimulation on the cAMP generation after 6 passages of HDFs.



**Fig.10. Stimulation of the cAMP generation in the human fibroblast cells by  $\alpha$ -MSH at varying concentrations after 1<sup>st</sup> passage (squares), after 3<sup>rd</sup> passage (triangles) and 6<sup>th</sup> passage (circles).**

Experiments were repeated 3 times in triplicates. Data are means  $\pm$  S.E.M.

### 3.6. Binding of $\alpha$ -MSH11–13 analogues to MCR

To exclude cell specific response of MSH11–13 and its analogues, the peptides were tested for the MCR binding on different cell lines naturally expressing MCR1 as well as on transfected with MCR receptor DNA cells.  $\alpha$ -MSH was used as reference drug. RAW254.7 cells express small number of MCR1, approximately 200–300 binding sites/cell, B16–F1 cells – 3000–4000 binding sites/cell whereas transfected Sf9 cells – 100000-200000 binding sites/cell. The number of receptors per cell was calculated taking into account bound NDP–MSH molecules. According to the competition curves computer programs calculate specifically bound molar concentration of the label. Knowing a number of molecules (Avogadro constant) in one mole, the binding sites of NDP–MSH were calculated. It is known that one receptor protein binds one ligand molecule. Thus receptor number per cell corresponds to the number of binding sites per cell.

Obtained results revealed that neither MSH11–13 nor its analogues bind to the MCRs up to concentration of 10 mM (Table 5).

**Table 5.  $K_i$  values (nM) of peptide binding to the MCRs on different cell lines**

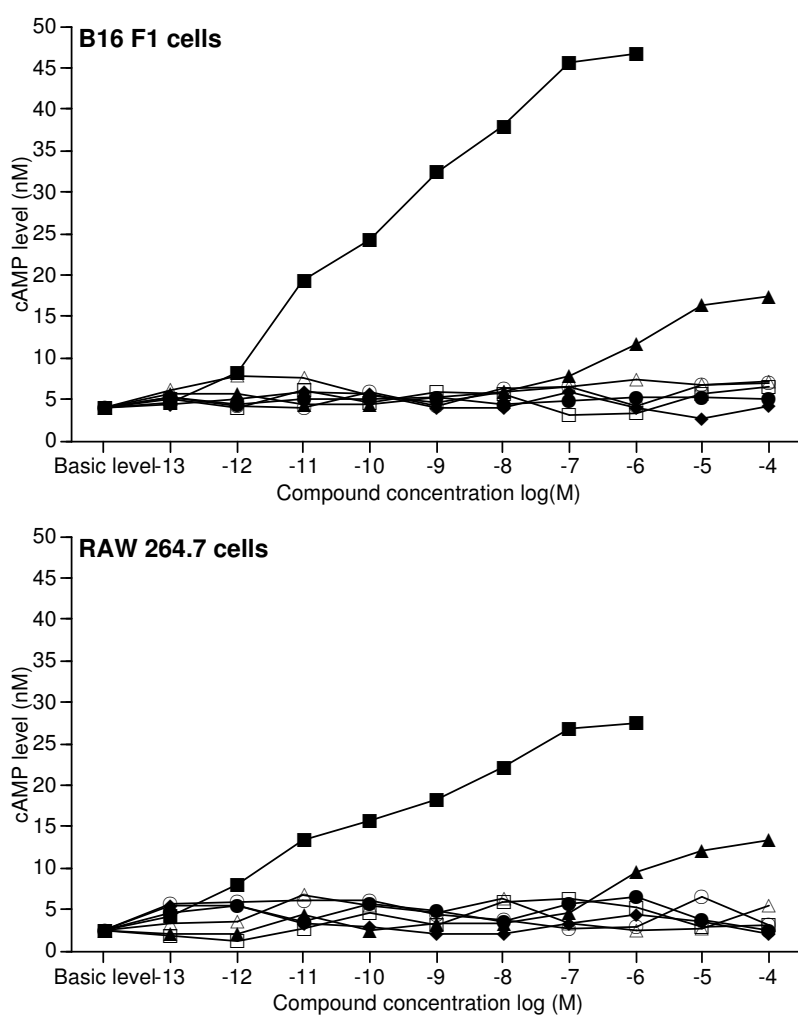
Peptide	Sf9 MCR1	Sf9 MCR3	Sf9 MCR4	Sf9 MCR5	RAW264.7	B16-F1
$\alpha$ -MSH	0.33 $\pm 0.04$	26 $\pm$ 3.4	702 $\pm$ 21	6034 $\pm$ 74	0.36 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.1
Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub> (I)	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Ac-Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub> (II)	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Ac-Lys-Pro-Val (III) I ——— I	n.	n.	n.	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, independent experiments in duplicates

n. – no binding

### 3.7. Influence of MSH11–13 and its analogues on generation of cAMP in B16-F1 and RAW264.7 cells

Many effects of  $\alpha$ -MSH are known to be mediated by the stimulation of the formation of cAMP. We therefore measured the influence of MSH11–13 analogues on the levels of cAMP in naturally MCR1 expressing macrophage and melanoma cell lines. Results are shown (Fig. 11). As seen  $\alpha$ -MSH dose dependently increased cAMP in both cell lines. In contrast, none of the MSH11–13 analogues, with the exception of peptide IV, increased the level of cAMP, even when applied in concentration as high as 100  $\mu$ M (Fig. 11). Peptide IV showed a tendency to stimulate cAMP generation starting at concentration of 1  $\mu$ M. The accumulation of cAMP seemed then to increase dose dependently when the peptide was applied up to a concentration of 100  $\mu$ M, where the effect seemed to start reaching a plateau. As seen, the maximal response obtained was only a fraction of that reached with  $\alpha$ -MSH. The  $EC_{50}$  values calculated for peptide cyclo(Ac-Lys-Pro-DVal) (IV) were of 948  $\pm$ 128 nM in the B16-F1 cells, and of 606  $\pm$ 132 nM in the RAW 264.7 cells. The examined substances behaved similarly in both B16 and RAW264.7 cells, showing that the studied effects were not cell specific.



**Fig.11. Stimulation of cAMP generation in the B16–F1 and RAW264.7 cells by  $\alpha$ -MSH (■), MSH11–13 (Δ), MSH11–13 analogues II (◆), III (●), IV (▲), V (○), VI (□) .**

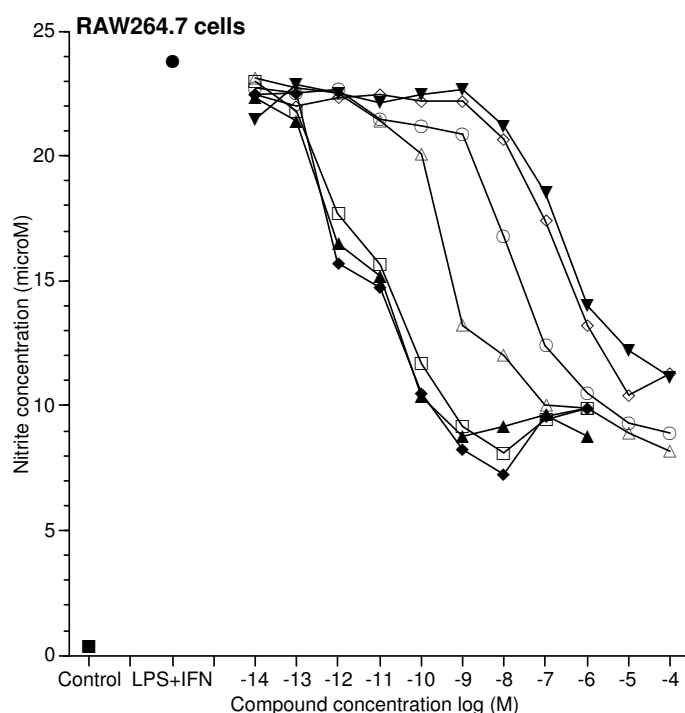
Each point represents the mean of four independent experiments.

### **3.8. Influence of MSH11–13 analogues on the production of NO in RAW264.7 cells**

The production of NO was measured as its metabolite  $\text{NaNO}_2$  concentration in the cell culture supernatant. Accumulation of the nitrite in RAW264.7 cell culture supernatant is shown in Fig. 12. As seen, 16 h stimulation by LPS/ $\text{IFN}\gamma$  (accordingly 100 ng/ml and 5 U/ml) initiated significant increase of nitrite level in comparison with un-stimulated cells.  $\alpha$ -MSH and acetylMSH11-13 as well as MSH11–13 inhibited LPS/ $\text{IFN}\gamma$ -caused increase of nitrite level that corresponds to the NO level. Calculated  $\text{IC}_{50}$  values were:  $\alpha$ -MSH at concentration of  $25 \pm 10$  pM, acetylMSH11-13 of  $80 \pm 16$  pM, and MSH11–13 of  $64 \pm 21$  pM. NO production was blocked approximately 60%

of maximal increased level. Test on the cell viability with Trypan blue confirmed that number of living cells were not changed. Therefore, we concluded that cell stimulation with endotoxins LPS/ IFN $\gamma$  did not affect cell viability.

Synthetic MSH11–13 analogues were less active. They inhibited NO overproduction with following IC<sub>50</sub> values: 18.4  $\pm$  8.77 nM (III), 4.6  $\pm$  1.23 nM (IV), 155  $\pm$  67 nM (V) and 238  $\pm$  87 nM (VI). However, at concentration of 100  $\mu$ M all MSH11–13 analogues – similarly as whole MSH molecule – blocked 60% of endotoxin effect. No one peptide normalized NO level completely.



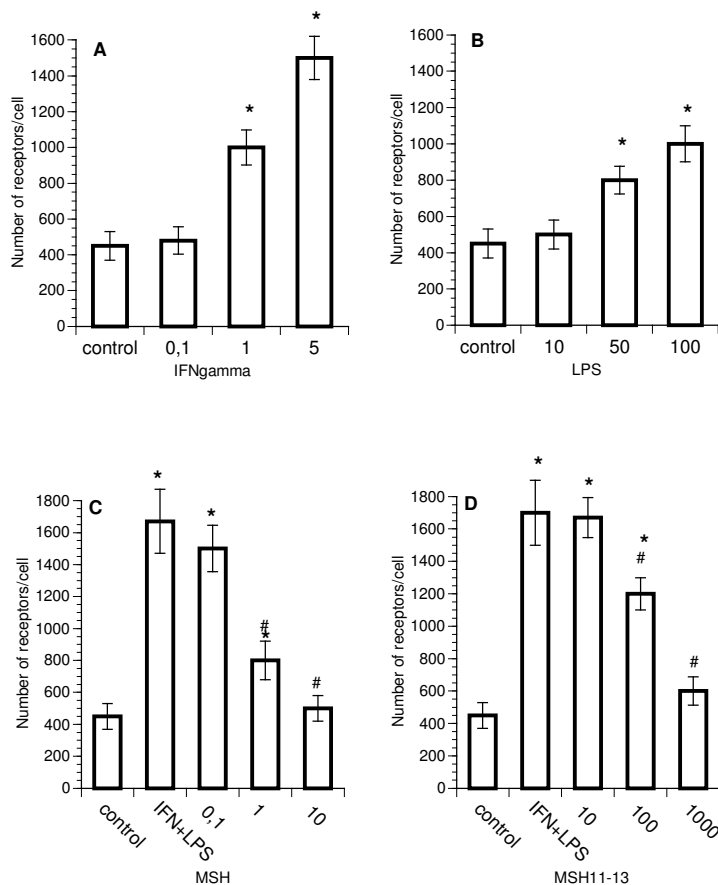
**Fig.12. Effect of melanocortin peptides on NO production.** The graph shows dose response curves of  $\alpha$ -MSH (▲), MSH11–13 (◆), MSH11–13 analogues II (□), III (○), IV (△), V (▼), VI (◇). The cells were stimulated for 16 h with LPS (100 ng/ml) and IFN- $\gamma$  (5 U/ml) in the presence of various concentrations of the peptides. Control cells were incubated with (●) and without LPS/ IFN- $\gamma$  (■). NO production was measured by determining the nitrite levels at the end of the incubation. All values represent means  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in triplicate.

### 3.9. Influence of $\alpha$ -MSH and MSH11–13 on expression of MCR1 in macrophage cell line RAW264.7

Obtained results showed that resting RAW264.7 cells express low number of MCR, approximately 300–500 NDP-MSH binding sites per cell (Fig.13). IFN $\gamma$  at concentrations of 1 and 5 U/ml increased MCR1 number up to 1000–1500 binding sites

per cell. LPS at concentrations of 50 and 100 ng/ml increased the number of MCR up to 800–1000 binding sites per cell. Thus, IFN $\gamma$  influence was stronger than that of LPS. Simultaneously added to cell cultures IFN $\gamma$  5 U/ml + LPS 100 ng/ml did not showed sum of the effects, rather prevailed effect of the IFN $\gamma$ .

$\alpha$ -MSH and its C terminal tripeptide at concentration of 1 nM up to the 1  $\mu$ M did not influence NO production in the resting cells (data not shown) whereas in the endotoxin-stimulated cells exerted dose-dependent NO production inhibiting effect. As seen in Fig.13,  $\alpha$ -MSH at concentration of 10 nM normalized the number of MCR. MSH11–13 showed the same effect at concentration of 1  $\mu$ M that is 100 times higher concentration. Besides it,  $\alpha$ -MSH effect was statistically significant starting from concentration of 100 nM.



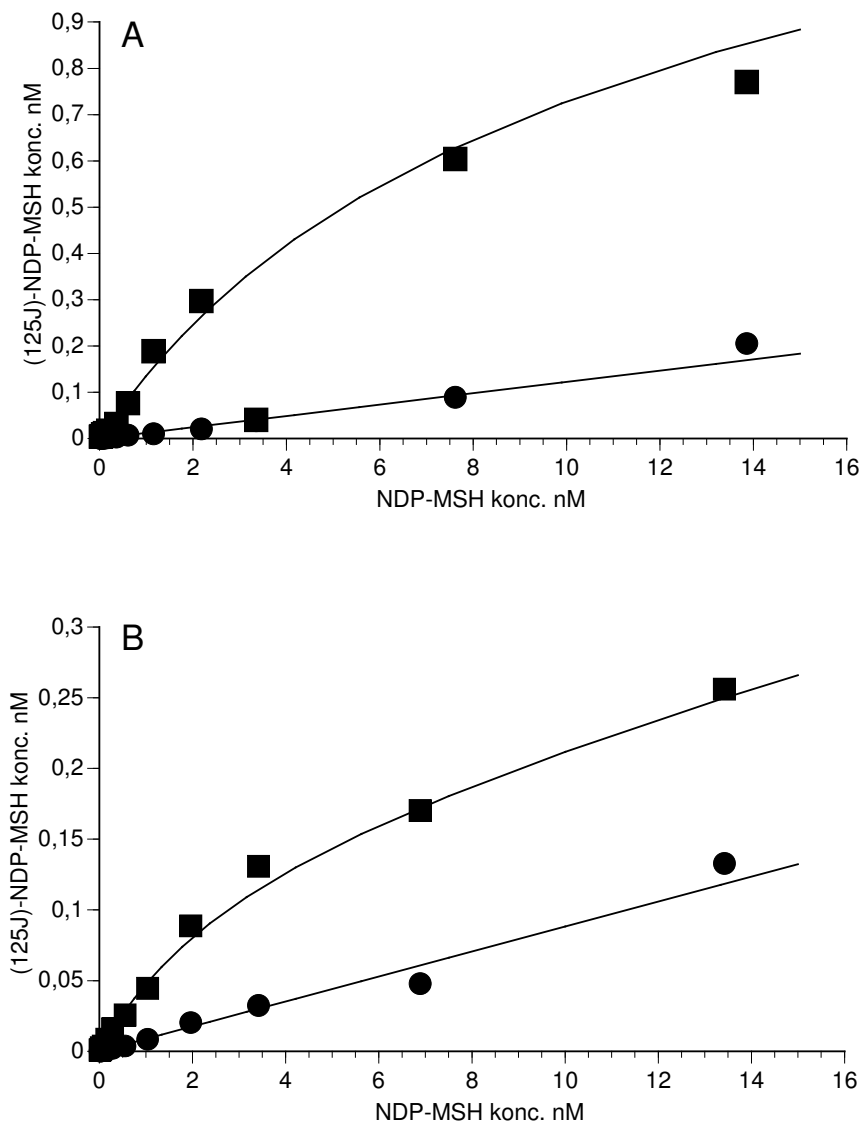
**Fig.13.  $\alpha$ -MSH un MSH11-13 influence on number of MCR on IFN $\gamma$  and LPS-stimulated cells.** 13A. IFN $\gamma$  added U/ml. 13B. LPS ng/ml, 13C  $\alpha$ -MSH nM and 13.D. MSH11-13 nM. 13C and 13D IFN $\gamma$  5 U/ml + LPS 100 ng/ml. Data shown as mean  $\pm$  S.E.M from three independent experiments in duplicates.

- P < 0.05 vs control
- # P < 0.05 vs IFN- $\gamma$  + LPS

Neither LPS nor IFN $\gamma$  competed for the binding sites to the MCRs (data not shown).



As seen from Fig.14, LPS (100 ng/ml) with IFN $\gamma$  (5 U/ml) increased specific ligand, plotted as interval between total and non-specific NDP-MSH binding. Plateau was reached at NDP-MSH concentration of 0.6–0.7 nM whereas control cells expressed lower number of receptor per cells that were saturated at concentration of 0.15 nM (Fig.14B). Affinity of NDP-MSH was not changed, it was the same as  $K_d$  value in both cases was of  $0.12\pm 0.03$  nM. Non-specific binding was not changed by endotoxins.



**Fig.14. NDP-MSH binding saturation curves on RAW264.7 cells.**

14.A. 16 h cell stimulation with IFN $\gamma$  5 U/ml + LPS 100 ng/ml.

14.B. NDP-MSH saturation curves without IFN $\gamma$  5 U/ml + LPS 100 ng/ml. Nonspecific binding determined by using 1  $\mu$ M NDP-MSH.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Kinetics of NDP-MSH and $\alpha$ -MSH binding to MCR

Membrane receptor-ligand interactions play a crucial role in the trans-membrane signaling, and, thus these receptors are important targets for the therapeutic agents. B16-F1 cells have been often used in the experiments of MC binding and cAMP stimulation assays as a source of MCR1. Receptors for  $\alpha$ -MSH have been identified and localized in multiple murine and human melanoma cell lines. However, important differences in the ligand binding preference and physiological responses have been observed between the species. Such differences constitute for the different dissociation constants ( $K_d$ ) of the ligands and number of receptors per cell. Human melanoma cells generally express approximately 10-fold lower amount of MCR molecules per cell (Eberle *et al.*, 1991; Salazar-Onfray *et al.*, 2002). However, these cells possess somehow higher affinity in comparison to murine cell lines (Wong and Minchin, 1996).

In the present study we investigated the peculiarities of the radioligand binding in murine melanoma cell line B16 because that cell line is used in MCR related high throughput screening assays. Thus, the appropriate binding experiment design is very important for more efficient novel drug discovery.

Our data show that the specific/nonspecific binding ratio in these cells was about 50:1. Similar results were obtained and reported also in the studies on human melanoma cells (Eberle *et al.*, 1991). The binding constants obtained by us for  $\alpha$ -MSH and NDP-MSH were in the line with our previous results describing simultaneous addition of the both labeled and unlabelled ligands to the cells and incubation for 2 h (Schiöth *et al.*, 1995). Such binding assay was developed for another cell line – COS-1 or COS-7 cells transfected with corresponding MCRs DNA (Schiöth *et al.*, 1995). Later the same assay set-up was adapted for natural cell lines. However, more detailed investigation of the cell peculiarities was necessary to better understanding of the binding conditions and calculated binding constants' values. Moreover, the influence of the duration of cell pre-incubation with unlabeled ligands on the receptor concentration and its influence on the competition curves was not been studied before.

It has been reported that *in vitro* binding characteristics are influenced by the specific activity of the labeled preparations (Eberle, 1988). Since the number of naturally occurring MCRs on human melanoma cells is a relatively small number, for instance,

from 147-1500 receptors per cell (Eberle, 1988), even the high specific activity ligand as iodinated NDP-MSH, does not afford to register any binding if receptors are down-regulated. Our data show that NDP-MSH binding to MCR in the B16-F1 cells is characterized by the slow association and slow dissociation constants, as well as down-regulation of the receptor concentration. These effects were observed after long lasting stimulation of the cells with natural hormone  $\alpha$ -MSH and its enzyme degradation resistant analog NDP-MSH.

In the article of Wong and Minchin (1996) internalization of the MCR on murine melanoma cells and ligand NDP-MSH degradation was described. Authors found that NDP-MSH was rapidly internalized and translocated to the lysosomal compartment where it was degraded. The receptor internalization was accompanied by a loss of cell surface receptors that may be explained with assumption that whole NDP-MSH-receptor complex undergo internalization. No recycling of the receptors was detected up to 96 h and it was accompanied by a decrease in MCR1 mRNA levels 48 h after treatment. However, before 48 h, transcript levels were unchanged in intact cells or treated with peptide. Authors suggested that it was due to the NDP-MSH inhibitory effect on receptor turnover. Our findings demonstrating the down-regulation of receptor concentration in the binding assay confirm the theory that in B16-F1 cells MCR1 undergo ligand-dependent internalization and that receptor level decrease is prolonged due to long lasting contact with both investigated peptides.

We have showed that approximately 14-20 % of the MCRs were resistant to down-regulation because after 48 h the total bound labeled concentration was close to that after 24 h pre-incubation. Earlier Siegrist et al. (1989) showed that MCRs on human melanoma cells do not undergo rapid internalization. Earlier, by using immunocytochemical techniques some internalization of the MCRs in the human WM266-4 cell line and also human solid tumor specimens were demonstrated (Xia *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1995). Furthermore, the detailed studies of Siegrist *et al.* (1994) have proven that both positive up-regulation and negative down-regulation of receptors

In summary, we have here shown that to optimize MCR binding conditions on the naturally expressing receptors cells a balance between slow association and dissociation of the [ $^{125}$ I]NDP-MSH should be found and possible down-regulation and internalization of the receptors by long lasting contact with ligands considered.

## 4.2. Characterization of human primary fibroblast cells

We investigated the functional expression of the MCR1 on the cultured HDFs during several cell reseeding procedures with the goal to evaluate MCR1 localization on the cell surface. Previously, it has been discovered that MCR1 is not confined to epidermal melanocytes, but is detectable in many resident cells of the skin (Bohm *et al.*, 1999) including HDFs derived from neonatal foreskin, connective tissue sheath fibroblasts (CTSFs) and dermal papilla cells (DPCs) of the hair follicle (Bohm and Luger, 2004). Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis using primers against all MCRs revealed that only MCR1 is expressed in HDFs, and that  $\alpha$ -MSH modulates collagen expression (Bohm and Luger, 2004), antifibrogenic effects (Bohm *et al.*, 2006) and inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) signaling *via* MCR1 receptors on HDFs (Hill *et al.*, 2006). In the neonatal foreskin MCR1 immunoreactivity and high affinity binding sites for NDP-MSH were found (Bohm and Luger, 2004). However, MCR1 fibroblast (obtained from neonatal foreskin) cell surface immunoreactivity, as shown by flow cytometric analysis, declined *in vitro* and were undetectable after 30 passages (Bohm and Luger, 2004). In the radioligand binding assay we obtained earlier loss of the membrane receptors – after 6 passages. It could be due to the lower sensitivity of the radioligand binding assay or dependence of MCR1 expression on skin donor age. In our experiments with adult skin specimens, MCRs were not expressed at the cell membranes after 6<sup>th</sup> passages or at least were not detectable. Such suggestion is supported by the immunostaining studies after 30<sup>th</sup> passage where MCR1 immunostaining was found in the distinct fibroblastic cells mainly in the cytoplasm (Bohm and Luger, 2004) where ligand cannot reach receptors. Internalization of the MCR1 was also observed earlier by the studies on melanoma specimens (Xia *et al.*, 1995).

We found that  $\alpha$ -MSH stimulates cAMP generation in HDFs at time interval that corresponds to the MCR1 expression on the cell membranes. Obviously, intracellular MC receptor proteins are not functional even if they are detectable by the immunohistochemistry assays or proved to exist at mRNA level.

. It is known that both HDFs and DPCs express MCR1 and generate proopiomelanocortin (POMC)-derived peptides (Bohm and Luger, 2004) that could serve as such autocrine/paracrine modulators. POMC cleavage-derived peptides ACTH,

$\alpha$ -MSH and  $\beta$ -endorphin are identified in skin cells (Bohm and Luger, 2004), and HDFs *in vitro* continue to generate immunoreactive ACTH and  $\alpha$ -MSH (Schiller *et al.*, 2001). However, adding of the  $\alpha$ -MSH to the HDFs growth medium in our experiments when MCR binding was lost, was insufficient to display MCR1 back to the cell surface as we did not detect  $\alpha$ -MSH binding to the HDFs after six passages as well as did not observe cAMP generation in the response to the varying  $\alpha$ -MSH concentrations.

Therefore we suggest the necessity of the cellular co-operation to maintain functional receptor proteins as it is observed in natural cell niches. Also, these findings support earlier studies on the transgenic mice which, although had signaling-deficient MCR1, did not show any dermal defects due to signals from other regulatory molecules (Robbins *et al.*, 1993).

In summary, we have shown that HDFs from adult donors skin *in vitro* cultures outside their natural environment express functional MCR1 on the cell surface. However, after six passages expression was lost and was not up-regulated by the  $\alpha$ -MSH stimulus.

### **4.3. Binding of Spantide I to MCR and influence on NO production**

Nowadays different approaches are used to find sequence motifs that reliably forecast binding of ligand to target receptors. In the end of 1990s screening of combinatorial libraries has led to identification of the smallest structures (Quillan, 1995) known to antagonize the amphibian MCR. These structures were *D*Trp-Nle-NH<sub>2</sub> and *D*Trp-Arg-NH<sub>2</sub>. Later on the basis of these entities data basis containing larger peptide sequences were screened. Theoretically predicted compounds that could interact with MCR include analogs of substance P (SP), luteinizing-hormone releasing hormone, endothelin, neurotensin, opioid-somatostatin,  $\mu$ -opioid antagonists (CTAP) and (CTOP) (Quillan and Sadee, 1996). However, binding of the all of these peptides to MCRs in the radioligand competitive assays was not tested. Moreover, in the radioligand binding assay mainly modified natural MC structures were studied but less peptides distinct from MC sequences have been investigated. Therefore in this study we paid attention to SP antagonist Spantide I as compound with predicted MCRs binding motif as well as due to its similar to MC anti-inflammatory action (Annunziata *et al.*, 2000). SP and melanocortins both have receptors on immune system cells

(Neumann-Andersen *et al.*, 2001; Wikberg *et al.*, 2000; van Hagen *et al.*, 1999; Bae *et al.*, 2002). Here SP was used as reference drug with similar to Spantide I structure but without the MCRs possible binding sequence. Obtained results were compared with  $\alpha$ -MSH binding to a single eukaryotic cell line COS-7 transiently expressing the one by one all cloned human MCRs subtypes.

Physiological responses to SP and  $\alpha$ -MSH are very similar: both peptides specifically activate NF- $\kappa$ B, a transcription factor involved in the modulation of different cytokine expression (Mandrika *et al.*, 2001), they control production of inflammatory cytokines including interleukins (IL-6, IL-1, IL-12), and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) by human peripheral blood monocytes, and have autocrine regulation in macrophages.

Spantide I was described in 1984 (Folkers *et al.*, 1984). Further structurally related Spantide II and III were synthesized and found to be less neurotoxic as Spantide I (Hakanson *et al.*, 1991; Folkers *et al.*, 1993). However, since 1984 Spantide I has been used in many test systems to analyze multiple SP effects. Spantide I usefulness as SP antagonist has been restricted by a relatively low potency and by its histamine-releasing properties. Besides it *in vivo* in mice Spantide I treatment reduced frequency and regularity of respiratory activity (Telgkamp *et al.*, 2002).

In the functional tests Spantide I inhibited  $\alpha$ -MSH stimulated pigment dispersion in the amphibian melanophores with IC<sub>50</sub> of 483  $\pm$  189 nM (Quillan and Sadee, 1996) but did not affect elevated cAMP level. SP itself did not show any antagonism or potentiation of  $\alpha$ -MSH responses in this assay up to 100  $\mu$ M concentration (Quillani and Sadee, 1996) that is in the agreement with our binding data.

The natural MC peptides share a common core of four amino acids His<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Trp<sup>9</sup>, and all peptides known to bind MCRs (except agouti, which is a large peptide that does not show any homology with  $\alpha$ -MSH) have elements from this core. Here we report that 11 amino acid long peptide with completely different from MC sequence can compete with  $\alpha$ -MSH analog [<sup>125</sup>I]NDP-MSH for binding sites to MCRs. In our experiments Spantide I showed a little binding preference to MCR1 and almost identical affinities to the other MCR subtypes. SP, contrary, did not bind to MCRs. It confirms the fact that in the alignment of peptide structure seen differences (see Materials and methods) are essential for MCRs binding.

In these experiments we have shown that the representatives of two families of peptides – neurokinins and melanocortins behaved similarly, they both bind to MCRs.

Thus, we have found new MCR ligand between ligands of the other G protein coupled receptor family.

With goal to prove MCR-ergic component in the Spantide I anti-inflammatory action we examined Spantide I NO overproduction inhibiting effect in macrophage cell line RAW264.7. We showed that Spantide I similarly to  $\alpha$ -MSH inhibited LPS-induced NO overproduction. Nonselective MCR antagonist HS024 blocked the action of Spantide I. However, to block the effect of Spantide I 10-fold higher concentration of HS024 than that for  $\alpha$ -MSH was needed.

In summary, we showed that Spantide I binds to MCR and inhibits NO overproduction *via* MCR. Thus, we have proved cross-talk between SP and MCR ligands.

#### **4.4. Peculiarities of dynorphin binding to MCR**

Endogenous opiate peptides are naturally produced in the CNS and periphery. They are classified as enkephalins, endorphins, and dynorphins. The endogenous peptides can function both as hormones and as neuromodulators (Akil *et al.*, 1984). It is known that action of opioid peptides is mediated via five major categories of opioid receptors – mu, delta, sigma, epsilon, and kappa. Dynorphins are reported to have highest affinity to kappa receptors. They are thought to regulate pain at the spinal cord and to influence feeding behavior. Already in 1996, Quillan and Sadee reported that dynorphins could antagonize MCR *in vitro* with potencies similar for pharmacological non-opioid effects of dynorphins *in vivo*. The authors showed that dynorphins antagonize human MC receptors and an amphibian MC receptor *in vitro* with  $K_d$  values calculated in the cAMP assay of 40 to 150 nM. Thus, dynorphins were found to inhibit an increase in the cAMP generation caused by  $\alpha$ -MSH in the cells transfected with human MCRs subtypes.

Non-opioid binding sites for dynorphins have been demonstrated in a number of tissues, but the identity of the these sites up to now have not been determined.

Recently Vriten *et al.* (2001) suggested that MC functionally interact with the opiate system and that MCR blockade allows the analgesic effects of  $\beta$ -endorphin to develop. Investigation of the involvement of the spinal cord MC system in neuropathic pain showed that MCR4 antagonists might be promising agents in the treatment of neuropathic pain ((Vriten *et al.*, 2001, Klusa *et al.*, 2001; Catania *et al.*, 2004).

As seen from Table 1, dynorphins have sequence similarity with enkephalins and  $\alpha$ -neo-endorphin but a very distinct sequence from  $\alpha$ -MSH.  $\alpha$ -MSH itself is a 13-amino-acid-long peptide and the same length has dynorphin A1-13 (D-A(1-13)).

We found low binding affinities of dynorphin A(1-17), dynorphin A (2-17), dynorphin A(2-11), dynorphin A(1-13), and nonbinding of the dynorphin B,  $\alpha$ -neo-endorphin, enkephalins, and dynorphin A (1-6) to all subtypes of MCRs. Our binding results show  $\mu\text{M}$   $K_i$  values that differ from earlier (Quillan and Sade, 1996) reported dynorphin potency to antagonize  $\alpha$ -MSH-induced cAMP generation in cells transfected with MCs receptor subtypes at the nM concentrations. Nevertheless, the novelty of this study was discovery that D-A(1-17), D-A(2-17), D-A(2-11) and D-A(1-13) bind to MCRs. The main conclusions are that dynorphins bind to MC receptors in an order different from the order of endogenous MC peptide potency and that shortening of the dynorphin sequences changes this binding pattern. The binding affinities are low, however, in the different pathological situations when regional concentrations of the opiates are increased, the binding to MC receptors could be realistic. Moreover, the fact that dynorphins may bind to non-opiate binding sites opens new vistas for molecule modeling with the aim to find structures that influence nociception but do not show the addiction effects characteristic to opiates.

## **4.5. Influence of MSH11–13 and its analogues on MCR–mediated cell responses**

### **4.5.1. Influence of MSH11–13 on the localization of MCR1 on macrophage cell membranes**

In year 1989 Kameyama *et al.*, described inflammation as reason for the skin increased pigmentation, and demonstrated ability of  $\text{IFN}\gamma$  together with  $\alpha$ -MSH (not alone) to stimulate melanin production in JB/MS melanoma cells as well as to stimulate MCR expression in the melanocytes.

Anti-inflammatory action of tripeptide MSH11–13 is described by several authors (Catania *et al.*, 2004; Mandrika *et al.*, 2001; Cone, 2006). However, receptors for MSH11–13 are not known. In the experiments with endotoxin–stimulated macrophage cell line RAW264.7 we first have shown indirect relationship between MSH11–13 and MCR that was revealed as ability of MSH11–13 to regulate the



number of MCR per cell. However, the effect of MSH11–13 was weak as 100 times higher concentration of MSH11–13 was needed to reach the same effect as that of  $\alpha$ -MSH in the inflammation model *in vitro*.

Earlier publications showed that MSH11–13 does not stimulate cAMP generation (Mandrika *et al.*, 2001) therefore we suggest that MSH11–13 may influence production of another cell signaling molecules, for example, NO. Such suggestion was based on the earlier published data of MSH11–13 inhibition of NO overproduction in the different inflammation models *in vitro* and *in vivo* (Mandrika *et al.*, 2001; Wikberg *et al.*, 2000).

We have shown by radioligand binding assay that LPS and IFN $\gamma$  increased NDP–MSH specific binding to the cells three times, thus confirming the increase of the MCR number per cell. The described experimental set-up allows us to conclude that expression of the MCR are changing due to the cell status – resting cells express lower number of the MCR as endotoxin-stimulated cells. We observed that  $\alpha$ -MSH and MSH11-13 regulated up–regulated MCR level and both peptides at higher concentrations were able to normalize the number of MCR per cell.

#### **4.5.2. The role of stereoisomery in the action of MSH11–13 analogues**

Evidence of overlapping of several intracellular messenger pathways has arisen question: are all multifunctional actions of the MCs mediated via MCR or *via* mechanisms distinct from MC receptors?

Historically first compound that arose this question was MSH11-13. Generally it is accepted that C-terminal tripeptide does not bind to MCRs. It was shown also in this particular case. We did not get competition curves from MSH11-13 and its analogues in three cell lines tested here. Earlier Mugridge *et al.* (1991) reported that  $\alpha$ -MSH and MSH 11-13 competitively inhibit binding of IL-1 $\beta$  to type 1 receptors and suggested possibility that both peptides act as an endogenous IL-1 antagonists but unfortunately further investigation in this field has not followed.

It is not excluded that MC besides MCRs bind to other, additional receptors on the different cells and can mediate different intracellular pathways acting via multiple receptors.

Unclear is also MSH11-13 possibility to stimulate cAMP generation in the different cells. For instance, it was described that in the cultured murine microglial cell line N9 (Delgado et al., 1998) and *Candida albicans* (Cutuli et al., 2000) MSH11-13 induced increase in the cAMP level. In our experiments with transfected by MCRs cDNA cells or naturally expressing MC1 cells we did not obtain any evidence that MSH11-13 and its analogues act via cAMP pathway. Exception was cyclo(Ac-Lys-Pro-DVal) which did not bind to MCRs but at high concentrations stimulated cAMP accumulation in RAW264.7 and B16-F1 cells. Already earlier such phenomena that binding capacity is not in line with the cAMP stimulation was described for substances RO27-3325 and P21 which with almost negligible low affinities for the MCRs stimulated cAMP with EC<sub>50</sub> about 1 nM concentration (Wikberg et al., 2000). However, this particular case is different because this time EC<sub>50</sub> of MSH11-13 cyclic analogue was at micromolar concentration range that does not give proof of high coupling efficiency. Similar micromolar concentration range of the MSH11-13 effect on the cAMP stimulation was also shown in N9 cells (Delgado et al., 1998). Significant increase in the cAMP level was reached by MSH11-13 at concentration 1 µM and maximum of the cAMP stimulation was described at 10 µM concentration. Cutuli et al. (2000) also reported cAMP stimulation in *Candida albicans* by MSH11-13 only at micromolar concentration range.

Linear MSH11-13 analogue with DVal<sup>13</sup> substitution was reported to be more potent than the L-form in suppressing inflammation induced by irritants after peripheral as well as central administration in mice (Watanabe et al., 1993). Maybe similarly to Watanabe et al. (1993) studies, cyclo(Ac-Lys-Pro-DVal) is more potent as linear LVal form of MSH11-13 in the cAMP generation assay.

Anti-inflammatory actions of MSH peptides are targets of investigators since early 1980s. However, the mechanisms underlying action of MC on the immune system is not clarified yet. There are many uncertainties concerning effect mediation *via* MCRs depending or MCRs non-dependending intracellular signaling pathways. It is generally believed that key factor is transcription factor NF-κB (Mandrika et al., 2001; Wikberg et al., 2000) that is present in all eucaryotic cells. NF-κB as transcription factor is involved in the modulation of different cytokine expression and iNOS (Manna and Aggarwal, 1998). NO production in the macrophages is iNOS dependent.

As it was shown in our experiments that un-stimulated cells produce very little NO but LPS/IFN- $\gamma$  stimulation causes approximately 50-fold increase in the nitrite concentration calculated according to standard curve of sodium nitrite. Such excess of NO production is seen in a variety of pathophysiological conditions, including circulatory shock and inflammation when NO over production may also be potentially toxic for host cells (Szabo et al., 1995; Nathan et al., 1994). Partial inhibition of NO production by MCs may protect host cells and still maintain NO pathogen killing activity.

We have here shown that N-acetylation did not influence MSH11-13 action but cyclisation and substitution of LVal with DVal did.  $\alpha$ -MSH and MSH11-13 inhibited NO production with IC<sub>50</sub> values at pM concentrations whereas cyclic peptides from 4.6 nM to 238 nM. As here examined short peptides did not bind or, more precisely, did not compete with [<sup>125</sup>I]NDP-MSH for binding sites on MCRs, we cannot interpret structure-function relationships according to binding constants or EC<sub>50</sub> values of stimulation of cAMP level.

We conclude that inhibition of NO production by MSH11-13 analogues in the mouse macrophage cell line RAW264.7 is not due to cAMP stimulation and binding to MCR1.

Nevertheless to the MSH11–13 non binding to MCR, its pharmacological effects are so interesting and strong that insufficient knowledge about MSH11–13 cell targets does not decrease the role of MSH analogues as potential drug candidates (Bohm *et al.*, 2006). Recent discovery of new MCR binding motif in C terminal of MSH peptides (Schiöth *et al.*, 2006) confirmed the possibility of new drug design based on the MSH11–13 structure. It turned out that Tyr–prolonged MSH11–13 binds to MCR and stimulates cAMP generation (Schiöth *et al.*, 2006). These data are in concordance with our finding that non-related MCR core fragment structures (like Spantide I and dynorphins) may bind MCR.

## 5. CONCLUSIONS

1. Adopted from transfected with MCRs DNA COS cells, radioligand binding assay is found to be suitable also for the naturally MCRs expressing cell lines – B16-F1 and RAW264.7, as well as primary human skin fibroblasts. MCR are down-regulated 48 h after the stimulation by NDP-MSH and  $\alpha$ -MSH in mouse melanoma cell line B16-F1, however, 14–20% of receptors remain intact.
2. Bacterial lipopolysaccharides (LPS) and interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) increase the number of MCRs on cell membranes and cause nitric oxide (NO) overproduction in macrophage cell line RAW264.7 that is taken as a sign of inflammation.  $\alpha$ -MSH and its C terminal tripeptide MSH11-13 show anti-inflammatory effects *in vitro* by inhibiting the action of the LPS and IFN $\gamma$ .
3. Human skin primary fibroblast cell cultures during 6 passages loose MCRs on the cell surface and ability to generate cAMP in response to the cell stimuli by  $\alpha$ -MSH.
4. Non-related to MC structure peptides: substance P (SP) antagonist Spantide I and  $\kappa$  opiate receptor ligands dynorphins bind to MCRs *in vitro*. Spantide I binds to MCRs with selectivity to MCR1 subtype. MCR-ergic component in anti-inflammatory action of Spantide I is proved by using MCR antagonist HS024 which partially blocks Spantide I NO-overproduction-inhibiting action in macrophage cell line RAW264.7. Dynorphins bind in a peculiar manner – with similar affinities to pairs of MCRs. In clinics such cross-binding of the ligands of different receptors might cause side effects.
5. MSH11-13 and its analogues do not bind to MCRs and do not stimulate cAMP generation, however, they inhibit NO overproduction in LPS-stimulated RAW264.7 cell line. Discovered structure-activity relationships that determine the effectivity of the inhibition of NO overproduction: linear peptides are more effective as cyclic peptides and peptides with DVal in the structure are more effective as those with LVal. Order of the MSH11-13 analogues potency is following:  $\alpha$ -MSH > Ac-MSH11–13 (I) = H-MSH11–13 (II) > IV > III > V = VI.  
Discovered structure-activity determinants might be used for synthesis of novel peptides and nonpeptide compounds aimed to design anti-inflammatory drugs.

## 6. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Latvian Council of Science grant 05.1419 and European Social Foundation (ESF) post-doctorial grant.

I thank to all co-authors, especially those from lab of Pharmaceutical pharmacology of Latvian Institute of Organic Synthesis.

I thank Edgars Liepinsh for being example to me in Ph.D studies and Liga Zvejniece for including me as co-author in her papers and conference abstracts.

Many thanks to deans office and Dace Osite, Gunta Strazda and Ingrida Kalvina for helping to take care of Ph.D. and ESF paper work.

I thank chemists from Peptide group of Eotvos University Hungary.

Many thanks to my family.

I thank my Pharmacy program colleagues Kristine Saleniece and Una Riekstina, and especially my supervisor Prof. Ruta Muceniece.

I thank Prof. R.Ligere for help in writing of the thesis.

## 7. REFERENCES

Short list of cited in thesis literature (in thesis cited 177 sources)

- Akil H., Watson SJ., Young E., Lewis, M.E., Khachaturian, H., Walter, J.M. (1984) Endogenous opioids: Biology and functions. *Ann. Rev. Neurosci.*, **7**:223-255.
- 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.
- Bae, S.J, 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.
- 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.
- Catania, A., S. Gatti, G. Colombo & J.M. Lipton (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol. Rev.*, **56**, 1-29.
- Cone RD. (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr. Rev.*, **27**(7):736-749.
- Cutuli M., Cristiani S., Lipton J.M., Catania A.(2000) Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides, *J Leukoc. Biol.*, **67**: 233-239.
- Delgado R., Carlin A., Airaghi L., Demitri M.T., Meda L., Galimberti D., Baron P., Lipton J.M., Catania A. (1998) Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by activated microglia. *J. Leucoc. Biol.*, **63**:740-745.
- Eberle AN (1998) *The Melanotropins: Chemistry, Physiology and Mechanisms of Action*. Karger, Basel, pp 556.
- Eberle, A.N., Verin, V.J., Solca, F., Siegrist, W., Kuenlin, C., Bagutti, C., Stutz, S., Girard J. (1991) Biologically active monoiodinated  $\alpha$ -MSH derivatives for receptor binding sites studies using human melanoma cells. *J. Receptor Res.*, **11**:311-322.
- Folkers, K., Hakanson, R., Hong, J., Xu, J.C., Leander, S.(1984) Biological evaluation of Substance P antagonists. *Br. J. Pharmacol.* **83**:449-456.
- Folkers, K., Hakanson, R., Feng, D., Xu, J.C., Janecka, A., Wang, Z. (1993) Spantide III, a superior tachykinin antagonist with high potency and negligible neurotoxicity. *Amino Acids*, **5**:233-240.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**:131-138.
- 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.

- Hill RP, MacNeil S, Haycock JW. (2006) Melanocyte stimulating hormone peptides inhibit TNF- $\alpha$  signaling in human dermal fibroblast cells. *Peptides*, 27:421-430.
- Kameyama K., Tanaka S., Ishida Y., Hearing V. J. (1989) Interferons Modulate the Expression of Hormone Receptors on the Surface of Murine Melanoma Cells. *J. Clin. Invest.*, 83:213–221.
- Klusa, V., Germane, S., Svirskis, S., Opmane, B., Wikberg, J.E. (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.
- 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.
- Manna S., Aggarwal BB. (1998)  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B activation induced by various inflammatory agents. *J. Immunol.*, 161:2873-2880.
- Mugridge KG, Perretti M, Ghiara P, Parente L. (1991)  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone reduces interleukin-1 $\beta$  effects on rat stomach preparations possibly through interference with a type 1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 197:151-155.
- 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 J. E. (2001) MC(1) Receptors are Constitutively Expressed on Leucocyte Subpopulations with Antigen Presenting and Cytotoxic Functions. *Clin. Exp. Immunol.*, 126:441–446.
- 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.
- Quillan, J.M. (1995) Development of a combinatorial diffusion assay and discovery of MSH receptor antagonists. *UML, Ann Arbor*. Michigan, 1995.
- Quillan, J.M, Sadee, W. (1996) Structure-based search for peptide ligands that cross-react with melanocortin receptors. *Pharmaceutical Res.*, 13:1624-1630.
- Przewlocki, R., Przewlocka B. (2001). Opioids and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 429: 79-91.
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehffuss 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.
- Sawyer, T.K., Sanfilippo, P.J., Hruby, V.J., Engel, M.H., Heward, C.B., Burnett, J.B., Hadley, M.E. (1980) 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine-  $\alpha$ - melanocyte stimulating hormone: A highly potent  $\alpha$ - 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 H., Muceniece, R., Wikberg, J.E.S. (1996) Characterisation of melanocortin 4 receptor by radioligand binding analysis. *Pharmacol&Toxicol.*, 79:161-165.
- Schiöth HB, Muceniece R, Mutule I, Jarl Wikberg. JES. (2006) New melanocortin 1 receptor binding motif based on the C-terminal sequence of  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 99(4):287-293.
- Siegrist, W., Oestrreicher, M., Stutz, S., Girard, J., Eberle, A.N. (1988). Radioreceptor assay for  $\alpha$ -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, A.N. (1989) Characterization of receptors for  $\alpha$ - melanocyte stimulating hormone on human melanoma cells. *Cancer Res.*, 49:6352-6358.
- Siegrist, W, Stutz, S, Eberle, AN. (1994) Homologous and heterologous regulation of  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone receptors in human and mouse melanoma cell lines. *Cancer Res.*, 15:2604-2610.
- Szabo C. (1995) Alternations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz.*, 3:2-32.
- Telgkamp, P., Cao, Y.Q., Basbaum, A.I., Ramirez, J.M. (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.
- Van Hagen, P.M., Hofland, L.J., ten Bokum, A.M., Lichtenauer-Kaligis, E.G., Kwekkeboom, D.J., Ferone, D., Lamberts, S. (1999) Neuropeptides and their receptors in the immune system. *Ann. Med.*, Oct;31 Suppl 2:15-22.
- Vriten, D.H, Kalkman, C.J, Adan, R.A., Gispen, W.H. (2001a) Neuropathic pain: a possible role for the melanocortin system? *Eur. J. Pharmacol.*, 429 (1-3):61-69.
- Watanabe T., Hiltz M., Catania A., Lipton JM. (1993) Inhibition of IL-1 $\beta$ -induced peripheral inflammation by peripheral and central administration of analogs of the neuropeptide  $\alpha$ -MSH. *Brain Research Bulletin*, 32:311-314.
- 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.
- Wong, W., Minchin, R.F. (1996) Binding and internalization of the melanocyte stimulating hormone receptor ligand [Nle<sup>4</sup>, D-Phe<sup>7</sup>]  $\alpha$ MSH in B16 melanoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 11:1223-1232.
- Xia, Y., Skoog, V., Muceniece, R., Chhajlani, V., Wikberg, J.E.S. (1995) 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, J.E.S. (1996) Immunological localization of melanocortin 1 receptor on the cell surface of WM266-4 human melanoma cells. *Cancer Lett.*, 98:157-162.