

Grelina/obestatina – nowy mechanizm regulacji łaknienia?

EWA OCŁOŃ, MARIUSZ PIETRAS

Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego,
ul. Krakowska 1, 32-083 Balice

Ocłoń E., Pietras M.

Ghrelin/Obestatin: a new mechanism for appetite control?

Summary

Ghrelin and obestatin are encoded by the same gene and originate from posttranslational processing of the proghrelin peptide. The activities of ghrelin and obestatin are different. The effects of obestatin on feeding behavior, body weight regulation are the opposite to those of ghrelin. Administration of ghrelin increases food intake, while, contrarily, the systemic and central administration of obestatin inhibits feeding. Ghrelin and obestatin interact with two distinct subtypes of G-protein-coupled receptor: GHS-R and GPR 39.

Keywords: ghrelin, obestatin, food intake

Pobieranie pokarmu pozostaje pod kontrolą około 60 związków i jest jednym z podstawowych procesów gwarantujących ciągłość metaboliczną w całym organizmie. Funkcjonowanie osi regulacji łaknienia i sytości jest przedmiotem badań od wielu lat. Pierwsze prace nad mechanizmem przyjmowania pokarmu u zwierząt przeprowadził Brobeck na początku lat 50. ubiegłego stulecia. Jest on autorem obowiązującej do niedawna koncepcji dwóch antagonistycznych ośrodków (głodu i sytości) regulujących czynności pokarmowe (2). W świetle najnowszych badań uważa się, że za kontrolę pobierania pokarmu u zwierząt odpowiedzialna jest rozległa sieć nerwowa, do której poza klasycznymi ośrodkami pokarmowymi (część boczna podwzgórza, jądro brzuszno-przyśrodkowe), zalicza się przede wszystkim: jądro łukowate, jądro przykomorowe, ale także jądro grzbietowo-przyśrodkowe, jądro okołosklepieniowe czy układ nagrody. W ostatnich latach coraz większą uwagę przypisuje się sygnałom płynącym z przewodu pokarmowego. Odkryta przez zespół japońskich badaczy w 1999 r. grelina wydaje się kluczowym obwodowym hormonem peptydowym zaangażowanym w regulację łaknienia (15).

Wyniki licznych badań potwierdziły obecność genu kodującego grelinę (gen *ghrl*) u wszystkich kręgowców. Różnice w sekwencji aminokwasowej greliny w poszczególnych gromadach kręgowców wynikają przede wszystkim z różnego tempa akumulowania się mutacji, głównie substytucji nukleotydowych w części tego peptydu. Wyizolowany z ekstraktów żołądkowych peptyd ulega unikalnej potranslacyjnej zmianie, polegającej na dodaniu krótkiego, prostego

łańcucha grupy oktanylowej (ssaki) lub dekanylowej (ptaki, płazy, ryby) do seryny (ssaki, ptaki, ryby) lub treoniny (płazy) w pozycji trzeciej (11, 12, 15). Modyfikacja poprzez acetylację gwarantuje grelinie aktywność biologiczną. Cząsteczka greliny jest ligandem receptora GHS-R (growth hormone secretagogue receptor) (20).

Udowodniono, że hormon ten zaangażowany jest głównie w regulację wydzielania hormonu wzrostu oraz kontrolę pobierania pokarmu. Grelina stymuluje wydzielanie hormonu wzrostu z przysadki, działając synergistycznie z GHRH (growth hormone releasing hormone) (16). Ponadto potwierdzono jej dodatni wpływ na ekspresję czynnika transkrypcyjnego pit 1. Czynniki ten jest transkrybowany w przednim płacie przysadki i jest odpowiedzialny za ekspresję genu kodującego GH w komórkach somatotropowych (5).

Peptyd ten jest także czynnikiem, który poprzez receptory obecne w neuronach NPY/AgRP zawiadamia ośrodki podwzgórza o konieczności pobierania pokarmu (6). Zaobserwowano, że poziom mRNA greliny w żołądku, podwzgórzu oraz przysadce istotnie wzrasta w okresie głodzenia. Udowodniono, że działanie greliny w podwzgórzu ssaków polega na nasileniu ekspresji oreksygenicznych czynników: NPY i białka AgRP (13).

Gen *ghrl*

Grelina powstaje w wyniku proteolizy 117-aminokwasowego prekursora proghreliny. Pierwszy odcinek (23-aminokwasowy) stanowi sekwencję sygnałową, pozostały 94-aminokwasowy prohormon jest

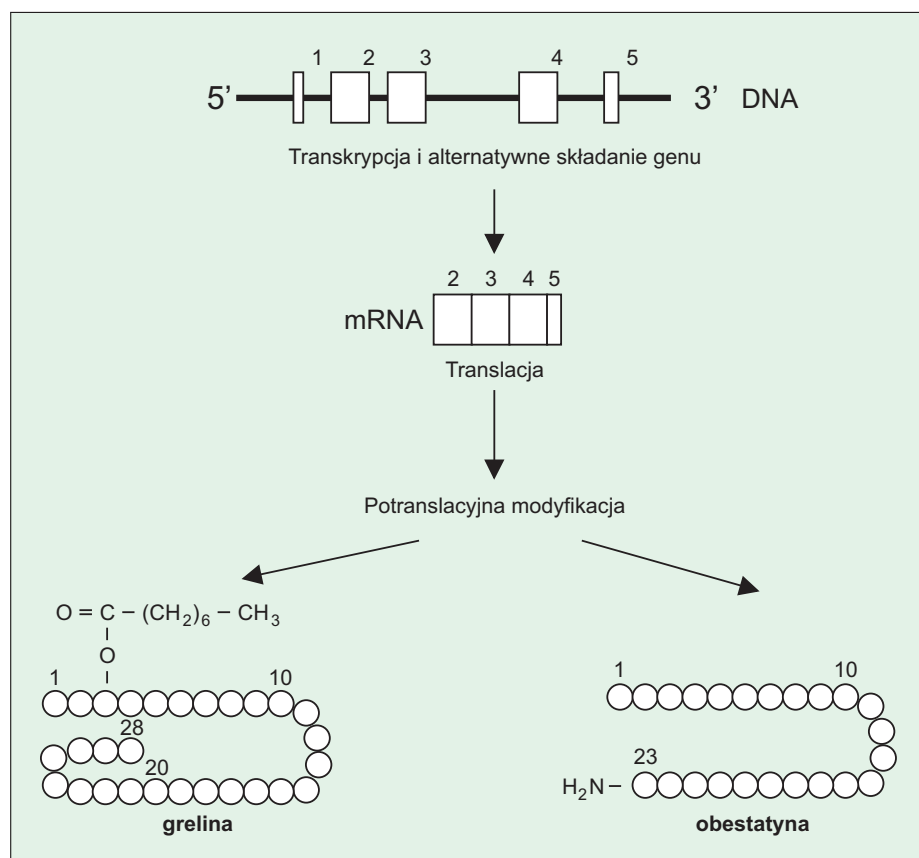
cięty enzymatycznie przez proteazę w pozycji Arg²⁸/Ala²⁹ do 28-aminokwasowej N-końcowej cząsteczki, biologicznie aktywnej ghreliny oraz 66-aminokwasowego C-końca (19).

Badania porównawcze wykazały, że organizacja genu ghrl u ssaków jest wysoce konserwatywna. U ludzi gen ghrl zlokalizowano na chromosomie trzecim w rejonie 3p25-26. Składa się on z 5 egzonów i 4 intronów. Naukowcy opisali dwa miejsca inicjacji transkrypcji genu greliny: pierwsze w pozycji – 80 oraz drugie w miejscu – 555 od kodonu ATG (inicjacji). Obecność tych miejsc prowadzi do powstania dwóch różnych transkryptów, tzw. forma A i B. Analiza cDNA greliny u ludzi dowodzi, że transkrypt A zawierający egzony od 2 do 4, koduje tę formę greliny, która w warunkach *in vivo* występuje w największej ilości (7).

W przypadku genu greliny istnieje kilka możliwości składania pierwotnego transkryptu, co pozwala na otrzymanie więcej niż jednego produktu końcowego z danego obszaru kodującego. Pierwsze doświadczenia dotyczyły powstawania formy greliny pozbawionej w pozycji 14. glutaminy, ale zachowującej swą aktywność biologiczną (8). Kolejne badania pozwoliły na zidentyfikowanie w tkance jąder u myszy mRNA tzw. GGDT (ghrelin gene derived transcript), który jest wariantem mRNA greliny kodowanym przez egzony 1., 4., 5. inaczej niż główny peptyd (egzony 2. i 3.). Przypuszcza się, że GGDT wpływa na reprodukcję u myszy (22).

Gen ghrl podlega procesowi tzw. pomijania egzonu w czasie obróbki mRNA (tzw. exon skipping). Proces ten może prowadzić do powstania krótszych form białka, które jednak zachowują pewną swą funkcję. Mechanizm tego procesu nie jest jasny, ale uważa się, że jest możliwy dzięki obecności dodatkowego miejsca startu transkrypcji.

Zastosowanie techniki RT-PCR z użyciem startów: zaprojektowanego w oparciu o sekwencję komplementarną do sekwencji granicy egzonów 3. i 5. oraz drugiego komplementarnego do sekwencji egzonu 5., pozwoliło zidentyfikować produkt o wielkości 131 bp. Jest to izoforma greliny z delecją 4. egzonu, której obecność stwierdzono przede wszystkim w żołądku, ale także w mózgu, nerkach, mięśniach czy jajniku (10). Forma ta wykazuje wysoką homologię do greliny z delecją 3. egzonu występującej w guzach nowotworowych prostaty u mężczyzn (23) (ryc. 1).



Ryc. 1. Ekspresja genu ghrl

Obestatina: odkrycie i działanie

Zespół Zhanga (24), przeprowadzając badania dotyczące homologii genu ghrl u 11 gatunków ssaków oraz szukając ortologów dla tego genu, wykazał obecność konserwatywnego regionu oflankowanego miejscami cięcia dla konwerazy. Region ten koduje 23-aminokwasowy peptyd, który nazwano obestatiną (*obedere* – pobierać, jeść oraz *statin* – supresja, zahamowanie). Badania z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej i jonowymiennej oraz spektroskopii masowej pozwoliły ustalić skład aminokwasowy cząsteczki obestatyny: FNAPFDVGIKLSGAQYQQHGRAL – NH₂ oraz wykazały, że peptyd ten ulega amidacji (18, 24).

Podanie dootrzewnowe lub dokomorowe (icv. *intracerebroventricular*) w formie iniekcyjnej, syntetycznego odpowiednika obestatyny powodowało zmniejszenie pobierania pokarmu przez szczury zależne od dawki w stopniu podobnym do tego, który obserwowany jest po zastosowaniu agonistów receptora melanokortyny MTII (24). U szczurów pozbawionych paszy przez 16 godzin podanie obestatyny (320 µg/kg) zmniejszyło o 37,5% ilość pobieranego pokarmu już godzinę po iniekcji (1,87 ± 0,37 vs 3,0 ± 0,3 g/100 g masy ciała). Efekt supresyjnego działania utrzymywał się przez 5 godzin. Obserwowano dalszą redukcję ilości pobieranej paszy: po 2 godzinach o 27,7% (2,64 ± 0,82 vs 3,65 ± 0,68 g/100 g masy ciała) oraz po 5 godzinach 24,7% (2,75 ± 0,78 vs 3,65 ± 0,68 g/100 g masy ciała). Iniekcja obestatyny nie tylko hamowała

przyrost masy ciała, ale także wypełnienie żołądka oraz obniżała aktywność jelit (w badaniach izometrycznych odnotowano znaczący spadek skurczów) (1, 4).

W przeciwieństwie do greliny obestatina nie wpływa na sekrecję hormonu wzrostu. Podanie obestatyny szczurom ($5,24 \pm 0,73$ vs $8,45 \pm 1,23$ ng/ml) nie zmieniało stężenia hormonu GH w osoczu. Odpowiednio iniekcja heksareliny (80 µg/kg), związku uwalniającego GH z komórek przysadki, prowadziła do wydzielania GH ($5,24 \pm 0,73$ vs $170,1 \pm 13,23$ ng/ml). Wspólne podanie obestatyny i heksareliny ($151,27 \pm 11,58$ vs $170,1 \pm 13,23$ ng/ml) także nie wpływało na wydzielanie hormonu wzrostu (1).

Obestatina działa prawdopodobnie poprzez receptor GPR39 należący do rodziny receptorów, w skład której wchodzi: receptor motyli (GPR38), receptor neuromedyny (GPR66), receptor neurotensyny oraz receptor ghreliny (GHS-R) (14, 17). Są to receptory związane z białkiem G, których aktywacja prowadzi do uwolnienia tzw. wtórnych przekaźników. W hodowli komórek linii CHO (z wprowadzonym genem receptora GPR39) obserwowano wzrost stężenia cAMP po dodaniu obestatyny, nie odnotowano podobnych zmian po dodaniu greliny czy motyli. Obecność GPR39 potwierdzono w żołądku, trzustce i hipokampie oraz jądrach migdałowych (3, 4, 9).

Przypadki, w których pojedynczy gen odpowiada za syntezę substancji o całkowicie przeciwnym działaniu, są rzadkie. Gen odpowiedzialny za syntezę oreksygeny – greliny, koduje także obestatinę: supresor apetytu. Odkrycie obestatyny po części może wyjaśniać, dlaczego myszy z wyłączonym genem ghrl (nie-syntetyzujące greliny) nadal pobierały paszę (21). Zablokowanie genu ghrl eliminowało jednocześnie czynnik zmniejszający odczucie głodu – obestatinę.

Dalsze badania nad lepszym zrozumieniem wpływu greliny i obestatyny na procesy pobierania i przyswajania pokarmów wymagają odpowiedzi na liczne pytania. Jaki enzym odpowiedzialny jest za przekształcenie preprogreliny? Po odcięciu cząsteczki sygnałowej, jakie właściwości strukturalne prohormonu prowadzą do cięcia i powstania greliny i obestatyny? Czy cięcie enzymatyczne preprogreliny prowadzi do powstania równych ilości greliny i obestatyny? Czy istnieje specyficzność tkankowa tego procesu, podobna do tej, występującej podczas powstawania odpowiednich hormonów z proopiomelanokortyny? Czym jest powodowana i jak regulowana? Odpowiedzi na te i inne pytania pozwolą opracować skuteczniejsze sposoby walki z otyłością oraz innymi chorobami wywołanymi przez nadwagę u ludzi.

Piśmiennictwo

1. Bresciani E., Rapetti D., Dona F., Bulgarelli I., Tamiasso L., Locatelli V., Torsello A.: Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat. *J. Endocrinol. Invest.* 2006, 29, RC16-18.
2. Brobeck J. R.: Identity of hypothalamic feeding mechanisms. *J. Neurovisc. Relat.* 1971, Suppl. 10, 277-281.

3. Chanoine J. P., Wong A. C., Barrios V.: Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. *Horm. Res.* 2006, 66, 81-88.
4. Dun S. L., Brailoiu G. C., Brailoiu E., Yang J., Chang J. K., Dun N. J.: Distribution and biological activity of obestatin in the rat. *J. Endocrinol.* 2006, 191, 481-489.
5. Garcia A., Alvarez C. V., Smith R. G., Dieguez C.: Regulation of Pit-1 expression by ghrelin and GHRL-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol. Endocrinol.* 2001, 15, 1484-1495.
6. Goto M., Arima H., Watanabe M., Hayashi M., Banno R., Sato I., Nagasaki H., Oiso Y.: Ghrelin Increases Neuropeptide Y and Agouti-Related Peptide Gene Expression in the Arcuate Nucleus in Rat Hypothalamic Organotypic Cultures. *Endocrinology* 2006, 147, 5102-5109.
7. Gualillo O., Lago F., Casanueva F. F., Dieguez C.: One ancestor, several peptides post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. *Mol. Cell Endocrinol.* 2006, 256, 1-8.
8. Hosoda H., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K.: Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 21995-20000.
9. Jackson V. R., Nothacker H. P., Civelli O.: GPR39 receptor expression in the mouse brain. *Neuroreport.* 2006, 17, 813-816.
10. Jeffery P. L., Duncan R. P., Yeh A. H., Jaskolski R. A., Hammond D. S., Herington A. C., Chopin L. K.: Expression of the ghrelin axis in the mouse: an exon 4-deleted mouse proghrelin variant encodes a novel C terminal peptide. *Endocrinology* 2005, 146, 432-440.
11. Kaiya H., Kojima M., Hosoda H., Koda A., Yamamoto K., Kitajima Y., Matsumoto M., Minamitake Y., Kikuyama S., Kangawa K.: Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 40441-40448.
12. Kaiya H., Van Der Geysen S., Kojima M., Hosoda H., Kitajima Y., Matsumoto M., Geelissen S., Darras V. M., Kangawa K.: Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology* 2002, 143, 3454-3463.
13. Kamegai J., Tamura H., Shimizu T., Ishii S., Shugihara H., Wakabayashi I.: Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 2001, 50, 2438-2443.
14. Kojima M., Haruno R., Nakazato M., Date Y., Murakami N., Hanada R., Matsuo H., Kangawa K.: Purification and identification of Neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66 (FM3). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 276, 435-438.
15. Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsumoto H., Kangawa K.: Ghrelin is a growth hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999, 402, 656-660.
16. Lengyel A. M.: Novel mechanisms of growth hormone regulation: growth hormone-releasing peptides and ghrelin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2006, 39, 1003-1011 (Review).
17. McKee K. K., Tan C. P., Palyha O. C., Liu J., Feighner S. D., Hreniuk D. L., Smith R. G., Howard A. D., Van der Ploeg L. H.: Cloning and characterization of two human G protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics* 1997, 46, 426-434.
18. Nogueiras R., Tschöp M.: Biomedicine. Separation of conjoined hormones yields appetite rivals. *Science* 2005, 310, 985-986.
19. Pemberton C., Wimalasena P., Yandle T., Soule S., Richards M.: C-terminal pro-ghrelin peptides are present in the human circulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 15, 1484-1495.
20. Smith R. G., Feighner S., Predergast K., Guan X., Howard A.: A New Orphan Receptor Involved in Pulsative Growth Hormone Release. *Trends Endocrinol. Metab.* 1999, 10, 128-135.
21. Sun Y., Ahmed S., Smith R. G.: Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol. Cell. Biol.* 2003, 23, 7973-7981.
22. Tanaka M., Hayashida Y., Nakao N., Nakai N., Nakashima K.: Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001, 1522, 62-65.
23. Yeh A. H., Jeffery P. L., Duncan R. P., Herington A. C., Chopin L. K.: Ghrelin and a novel preproghrelin isoform are highly expressed in prostate cancer and ghrelin activates mitogen-activated protein kinase in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 8295-8303.
24. Zhang J. V., Ren P. G., Avsian-Kretschmer O., Luo C. W., Rauch R., Klein C., Hsueh A. J.: Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005, 310, 996-999.

Adres autora: mgr inż. Ewa Ocioł, ul. Radzikowskiego 77A/4, 31-315 Kraków; e-mail: eocon@izoo.krakow.pl