

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové

Katedra Biochemicky věd

Kandidát: Lukáš Zappe

Vedoucí: Ing. Petra Matoušková Ph.D., PD Dr. Anke C. Schiedel

Název diplomové práce: Role disulfidických vazeb u hA_{2A} podtypu adenosinového receptoru

Adenosinový receptor podtyp A_{2A} je součástí rodiny receptorů spřažených s G proteinem (GPCR), která je nyní cílem téměř 40% všech léčivých látek. GPCRs se skládají ze sedmi transmembránových domén spojených třemi extracelulárními a třemi intracelulárními kličkami (ECL a ICL). Byla odkryta skutečná struktura receptoru, tedy víme, že ECL1 a ECL2 jsou spojeny disulfidickými vazbami. Z toho ECL2 je pravděpodobně zodpovědná za proces rozpoznání a navázání ligandu.

Abychom lépe pochopili, jak důležitá je úloha těchto disulfidických vazeb v tomto procesu, pomocí přímé jednobodové mutace byly vytvořeny čtyři adenosinové A_{2A} mutantní receptory, kde aminokyselina cystein byla nahrazena za serin (C146S, C159S, C166S a C146S-C159S). Ovlivnění receptorové exprese bylo zkoumáno pomocí metody ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Následný efekt na proces rozpoznání ligandu receptorem byl proveden pomocí kompetice mezi radioaktivně značeným ligandem [³H]CGS-21680 (5 nM) a několika agonisty na adenosinových receptorech (NECA, CGS-21680, PSB-826, BAY60-6583). Pouze mutant C146S byl testován s [³H]MSX-2 (1 nM). Funkčnost receptoru byla zjišťována pomocí cAMP akumulací studie, za použití agonistů popsaných výše a navíc byl zahrnut i endogenní agonista adenosin.

Zjištěné výsledky v této práci potvrzují důležitou roli disulfidických vazeb při procesu rozpoznání a navázání agonistů. Většina testovaných mutantních receptorů ukázala významný rozdíl v porovnání s lidským wild-type A_{2A} adenosinovým receptorem. Disulfidické vazby v ECL2 skutečně mají své opodstatnění.