

## Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Michaela Navrátilová

Školitel: Dr. Kristina Hoffmann

PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Název diplomové práce: Farmakologická charakterizace MRGPRD

MRGPRD (Mas-příbuzný receptor spřažený s G proteinem) patří do velké skupiny GPCR (Receptory spřažené s G proteinem). Signální dráhy zprostředkované GPCRs regulují velký počet životních funkcí lidského těla a zhruba 30 % všech moderních klinicky používaných léčiv cílí právě na tyto receptory (Overington *et al.*, 2006). MRGPR podskupina byla objevena před deseti lety, je stále do velké míry neprobádána a označena za „sirotčí“. (Solinski *et al.*, 2014).

Několik ligandů jako  $\beta$ -alanin, GABA,  $\beta$ -aminobutyrová kyselina (Shinohara *et al.*, 2004; Ajit *et al.*, 2010; Uno *et al.*, 2012), angiotensin a almandin (Gembardt *et al.*, 2008; Lautner *et al.*, 2013) mají schopnost se vázat na lidský MRGPRD.

MRGPRD je specificky exprimován pouze v neuronech primárních sensorických trojklaných ganglií. Aktivace tohoto receptoru  $\beta$ -alaninem způsobila snížení pruritogenní citlivosti a přispěla k normalizaci prahu pro vnímání mechanických a tepelných stimulů. Fakt že se MRGPRD nacházejí v rámci centrálního systému pouze v periferních gangliích spolu s faktem, že jejich vazebné místo je velmi strukturně specifické, nám dávají naději, že by MRGPRD mohl sloužit jako dobrá cílová struktura pro vývoj nového specifického antinociceptivního léku s minimálním množstvím nežádoucích účinků.

V mé práci jsem testovala 16 sloučenin (včetně  $\beta$ -alaninu), abych zjistila, jestli mohou aktivovat MRGPRD receptor. Moje strategie zahrnovala hledání ligandů monitorováním dvou signálních cest. V první z nich jsem měřila změny v buněčné cAMP produkci způsobené aktivací Gi-proteinem a v druhé Gq-zprostředkované změny

v  $\text{Ca}^{2+}$  závislých signálních drahách. K měření jsem používala CHO Flp-In buňky, které stabilně exprimovaly testovaný receptor. Jako pozitivní kontrolu jsem používala  $\beta$ -alanin u kterého je jeho schopnost aktivovat receptor potvrzena.

První metoda zahrnovala měření změn v buněčné cAMP produkci zprostředkované  $\text{Gi}$ .  $\beta$ -alanin jako kontrolní sloučenina způsobil 36.63 % inhibici forskolinem indukované cAMP produkce. Deset z celkového počtu testovaných látek neukázaly žádný efekt, ale (*R*)-3-amino-2-methylpropionová kyselina a také její diastereomer DL-3-aminoisobutyrová kyselina způsobiley forskolinem indukované snížení produkce cAMP o 41.31 % a 43.11 %. 3-Aminopropan-1-ol překvapivě zvýšil nitrobuněčnou produkci cAMP o 56.1 % a tento efekt zopakoval i u buněk, které neexprimovaly testovaný receptor. Z toho můžeme usuzovat, že efekt 3-aminopropan-1-olu je nespecifický. 1-(3-Piperidinopropyl)piperazin [1 mM] způsobil také nespecifické zvýšení produkce nitrobuněčného cAMP o 34.4 %.

V druhé metodě, kdy jsme měřili  $\text{Gq}$ -zprostředkované změny v  $\text{Ca}^{2+}$  závislých signálních drahách, jsme použili metodu založenou na NFAT-promotorem řízené expresi luciferázového genu.  $\beta$ -alanin, opět použitý jako pozitivní kontrola způsobil zvýšení luciferázové aktivity o 28.00 %. Přidání 1-(3-piperidinopropyl)piperazinu způsobiley zvýšení luciferázové aktivity o 99.40 %. Fenpropidin v 100  $\mu\text{M}$  koncentraci způsobiley zvýšení RLU o 57.6 % a v 1 mM koncentraci snížení o 56.1 %. (*R*)-3-Amino-2-methylpropionová kyselina byla také testována použitím této metody a mohli jsme vidět zvýšení luciferázové aktivity o 29.40 %.