

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Kateřina Ládová
Školitel: Prof. Dr. Armin Buschauer
Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Název diplomové práce:

Cílené mutace lidského histaminového H₄ receptoru: Postavení Arg-341 za vzájemného působení H₄R agonistů cyanoguanidinového typu

Lidský histaminový H₄ receptor (hH₄R) byl objeven v roce 2000. Předpokládá se, že H₄R zaujímá postavení v imunologických pochodech a může tak být potenciálním cílem vývoje nových léků v terapii zánětlivých onemocnění. Naklonování a exprese hH₄Ru odstartovaly hledání selektivních agonistů a antagonistů. Nedávno byl v sérii agonistů cyanoguanidinového typu identifikován vysoce účinný a receptorově selektivní H₄R agonista, UR-PI376, (2-cyano-1-[4-(1-*H*-imidazol-4-yl)butyl]-3-[(2-fenylthio)ethyl] guanidin), s jasnými preferencemi k hH₄Ru před H₄Rem myšovitých (mH₄R). Dle molekulárních modelových studií, UR-PI376 tvoří dvě vodíkové vazby mezi cyanoguanidinovým zbytkem a argininem 341 hH₄Ru, což vedlo k domněnce, že Arg-341 je důvodem, proč je UR-PI376 selektivnější k hH₄Ru než k lidskému histaminovému H₃ receptoru (hH₃R) a proč upřednostňuje hH₄R před mH₄Rem.

Abychom objasnili roli této aminokyseliny ve vzájemné interakci s cyanoguanidiny, vytvořili jsme tři mutanty: Arg-341 byl nahrazen serinem, glutamátem a alaninem pomocí tzv. „overlap-extension PCR“. Ve srovnání s hH₄Rem, u H₄Ru potkana a myši je Arg-341 nahrazen serinem, zatímco glutamát odpovídá psímu H₄Ru a hH₃Ru. H₄R mutanti byly exprimovány společně s Gα_{i2} a Gβ₁γ₂ proteiny ve Sf9 hmyzích buňkách a charakterizováni prostřednictvím funkčních studií. Účinek agonistů histaminu a UR-PI376 a aktivita antagonisty thioperamidu byly měřeny metodou „steady-state GTPase activity assay“. Nicméně, žádné významné rozdíly v chování přirozeného hH₄Ru a jeho mutantů nebyly zaznamenány. Je tedy zřejmé, že receptorově a druhově specifický Arg-341 není zásadní pro vazbu UR-PI376 k hH₄Ru.