

ABSTRAKT

Identification and characterization of G protein-coupled nucleotide and nucleotide-like receptors P2Y₁₃ and GPR17

Purinergní receptory jsou rozděleny do třech podskupin, jimiž jsou P1(adenosinové) receptory, P2 (nukleotidové) receptory a P0 (adeninové) receptory. P2 receptory se skládají z ligandem řízených iontových kanálů (LGICs) označených jako receptory P2X₁₋₇ a z receptorů nazývajících se P2Y_{1,2,3,6,12-14}, náležících do skupiny receptorů spřažených s G proteinem, a to do třídy A a její větve značené δ . Receptor P2Y₁₃ je fyziologicky aktivován přes ADP a jeho aktivaci se spouští inhibice adenylatcyklasy (G_i). Svou stimulací vykazuje receptor P2Y₁₃ neuroprotektivní účinky. Dále hraje roli též v metabolismu lipoproteinů a transportu cholesterolu v těle. Receptor P2Y₁₃ by tedy mohl být i zajímavým terapeutickým cílem při léčbě atherosklerozy.

Receptor GPR17, podobný výše zmíněným nukleotidovým receptorům (nucleotide-like receptor) náleží k početné skupině tzv. orphan receptors, které stále postrádají svého endogenního agonistu. GPR17 je také spřažen s G proteinem (G_i) a jsou mu přisuzovány role v demyelinizačních onemocněních jako je například roztroušená skleróza nebo v některých zánětlivých onemocněních.

Vývoj silných selektivních ligandů, agonistů i antagonistů, pro receptor P2Y₁₃ i pro receptor GPR17 je nutný ke studiu fyziologických a patofyziologických rolí obou zmíněných receptorů a k jejich validaci jako možných terapeutických cílů.

V této práci chceme zjistit, zdali by přístup využívající komplementaci enzymu za použití metody β -arrestin assay mohl být vhodný pro bližší charakterizaci obou zmíněných receptorů, lidského P2Y₁₃ a lidského GPR17. Chceme též zkoumat, zdali tento přístup bude užitečný při screeningu chemických látek a jejich identifikaci jako možných agonistů nebo antagonistů obou těchto receptorů.

Lidský GPR17 receptor obsahující část enzymu β -galaktosidasy je exprimován v buňkách ovárií čínské křečka (CHO). Tyto buňky tvoří protein β -arrestin nesoucí komplementární část β -galaktosidasy. Tato připravená rekombinantní buněčná linie bude využita ke screeningu chemických látek. Aktivace receptoru GPR17 vede k rekrutaci β -arrestinu a jeho vazbě na receptor, přičemž dochází ke komplementaci obou částí β -galaktosidasy ve funkční enzym. Díky tomu jsou umožněna měření chemiluminiscence závislé na β -galaktosidase.

Naším cílem je testovat chemické látky jako potenciální agonisty či antagonisty na receptoru GPR17, získat analogickou buněčnou linii i pro receptor P2Y₁₃ umožňující určení aktivace receptoru díky měření luminiscence, a ustavit tak metodu pro zjišťování potencií agonistů a antagonistů.

Klíčová slova: P2Y₁₃, GPR17, β -arrestin assay, compound screening