

Tartu Ülikool  
Füüsika-keemiateaduskond  
Orgaanilise ja bioorgaanilise keemia instituut

REET REINART

DOPAMIINI D<sub>1</sub> RETSEPTOR JA SELLE VASTASMÕJU  
ADENOSIINI A<sub>1</sub> RETSEPTORIGA SF9 RAKUMEMBRAANIDES

Magistritöö

Juhendaja: Prof. AGO RINKEN

Tartu 2006

# SISUKORD

<b>SISUKORD</b> .....	<b>2</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	<b>3</b>
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	<b>4</b>
<b>KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	<b>5</b>
DOPAMIINERGIINE SÜSTEEM .....	5
VIRGATSAININE DOPAMIIN .....	5
DOPAMIINI RETSEPTORID .....	5
DOPAMIINI RETSEPTORITE PAIKNEMINE .....	7
G VALKUDE ROLL SIGNAALIÜLEKANDEL .....	9
G VALKUDE KLASSIFIKATSIOON JA OMADUSED .....	9
G VALGU AKTIVATSIOON .....	10
DOPAMIINI D <sub>1</sub> RETSEPTORIGA SEOTUD G VALGUD .....	12
7-TM RETSEPTORITEVAHELISED INTERAKTSIOONID .....	13
RETSEPTOR-RETSEPTOR INTERAKTSIOONIDE ILMINGUD .....	13
RETSEPTORITE HOMO- JA HETEROMEERID .....	15
ADENOSIINI A <sub>1</sub> JA DOPAMIINI D <sub>1</sub> RETSEPTORITE HETEROMEERID .....	16
RETSEPTORITE UURIMINE MUDELSÜSTEEMIS .....	17
<b>EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....	<b>19</b>
MATERJALID .....	19
MEETODID .....	20
A <sub>1</sub> JA D <sub>1</sub> RETSEPTOREID NING G VALKE EKSPRESSEERIVATE SF9 RAKKUDE	
KASVATAMINE .....	20
MEMBRAANPREPARAATIDE VALMISTAMINE .....	20
[ <sup>3</sup> H]SCH23390 JA [ <sup>3</sup> H]DPCPX TASAKAALULINE SEOSTUMINE .....	21
[ <sup>3</sup> H]SCH23390 SEOSTUMISE KINEETIKA .....	22
ANDMETE TÖÖTLEMINE .....	23
TULEMUSED JA ARUTELU .....	23
DOPAMIINI D <sub>1</sub> JA ADENOSIINI A <sub>1</sub> RETSEPTORITE EKSPRESSIOON SF9 RAKKODES	
[ <sup>3</sup> H]SCH23390 SEOSTUMISE KINEETIKA SF9 RAKKODES .....	24
D <sub>1</sub> R LIGANDIDE SIDUMISOMADUSED KONKUREERIMISEL [ <sup>3</sup> H]SCH23390-GA .....	25
<b>KOKKUVÕTE</b> .....	<b>29</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>30</b>
TÄNUAVALDUSED .....	31
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b> .....	<b>32</b>
<b>LISAD</b> .....	<b>38</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

A <sub>1</sub> R	adenosiini A <sub>1</sub> retseptor
A776363	(1'-adamantüül)-1-aminometüül-3,4-dihüdro-5,6-dihüdrosü-1H-2-bensopüraan
ADA	adenosiin deaminaas
D <sub>1</sub> R	dopamiini D <sub>1</sub> retseptor
DA	3-hüdrosütüramiin; dopamiin
DHX	dihüdrektsidiin
DTT	ditiotreitool
EDTA	etüleendiamiintetraetaanhape
EGTA	etüleenglükool-bis-(β-aminoetüüleeter)-N,N,N',N'-tetraetaanhape
GABA	γ-aminovõihape
GDP	guanosiin-5'-difosfaat
GPCR	G-valk-seotud retseptor
GTP	guanosiin-5'-trifosfaat
GTPγS	guanosiin-5'-[γ-tio]-trifosfaat
5-HT	5-hüdrosütürüptamiin; serotoniin
IC <sub>50</sub>	inhibiitori (ligandi) kontsentratsioon, mille korral on blokeeritud 50% radioligandi seostumisest
K <sub>d</sub>	radioligandi dissotsiatsiooni tasakaalukonstant
K <sub>i</sub>	inhibiitori (ligandi) seostumise dissotsiatsiooni tasakaalukonstant
DOPA	dihüdrosüfenüülalaniin
N-CPA	N(6)-tsüklopentüüladenosiin
NMDA	N-metüül-D-aspartaat
PMSF	fenüülmetüülsulfonüül fluoriid
SCH23390	(R)-(+)-7-kloro-8-hüdrosü-3-metüül-1-fenüül-2,3,4,5-tetrahüdro-1H-3-bensasepiin
SKF 38393	(±)-1-fenüül-2,3,4,5-tetrahüdro-(1H)-3-bensasepiin-7,8-diool
SKF 83566	8-bromo-2,3,4,5-tetrahüdro-3-metüül-5-fenüül-1H-3-bensasepiin-7-ool
Tris-HCl	tris(hüdrosümetüül)aminometaani lahus HCl-ga

## SISSEJUHATUS

Aju talitlusel pole piire! Aga sellele vaatamata üritatakse teadusmaailmas neid piire avastada või kunstlikult tekitada, et luua süsteeme, milles inimõistus suudaks orienteeruda.

G valkudega seotud retseptorid (GPCR) on suurim raku pinnaretseptorite perekond, millega on seotud paljud haigused ja nende ravi. Koguni 50-60 % tänapäeva farmakoloogiatööstuse toodangust on suunatud GPCR-te selektiivsele mõjutamisele.

Dopamiinergilised retseptorid on G-valk-seotud retseptorid, mis on seotud erinevate aju funktsioonidega, nagu näiteks motoorika ja tunnetuslike protsesside reguleerimine ning hormoonide talitus.

Adenosiini  $A_1$  ja dopamiini  $D_1$  retseptorid aju juttkehas on kolokaliseerunud ühistes neuronites, nagu ka adenosiini  $A_{2A}$  ja dopamiini  $D_2$  retseptorid. Nii ajukoes kui kunstlikes süsteemides on näidatud nende retseptoritevahelist koostoimet. Adenosiini  $A_1$  retseptori aktiveerimine põhjustab dopamiini  $D_1$  retseptori signaali nõrgenemist. Näidatud on ka vastupidist toimet - adenosiini  $A_1$  retseptori blokeerimine suurendab dopamiini  $D_1$  retseptori signaali intensiivsust, mis avaldub näiteks kõrgeunud motoorika näol [1,2,3].

Käesolevas töös uuritigi adenosiini  $A_1$  retseptori aktivatsiooni toimet dopamiini  $D_1$  retseptori sidumisomadustele, kasutades mudelsüsteemina Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) rakumembraane. Töö oli jätkuks minu bakalaureusetööle, kus iseloomustati dopamiini  $D_1$  retseptori spetsiifilise antagonistiga, [ $^3$ H]SCH23390, seostumise kineetilisi aspekte ning agonistide ja antagonistide sidumisomadusi Sf9 rakumembraanides. Käesolevas töös lisandus sellele võrdlus roti aju juttkeha dopamiini  $D_1$  retseptoritega.

# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## DOPAMIINERGILINE SÜSTEEM

### VIRGATSAINE DOPAMIIN

Monoamiin, dopamiin, on perifeerse ja kesknärvisüsteemi (KNSi) üks tähtsamatest virgatsainetest, mis tekib juba organismi varajases embrüonaalses arengus, mängides ühtlasi suurt rolli KNSi väljakujunemises [4].

Dopamiinil on organismis väga erisuguseid funktsioone, mõjutades mootorikat (liigutuste ja kõne sujuvust), kognitiivseid omadusi (mälu, õppimist, motivatsiooni), samuti hormoonide sünteesi ja südameveresoonkonna ning neerude tegevust. Dopamiinergilise süsteemi häiretega on seotud mitmed psühhoneuroloogilised haigused, nagu skisofreenia, tähelepanudefitsiidi ja hüperaktiivsuse häire (*ADHD-attention deficit hyperactivity disorder*), bipolaarne häire, ravim- ja narkosõltuvus, samuti Parkinsoni tõbi, Gilles de la Tourette'i sündroom ning perifeersed ja hormonaalsed häired, nagu hüpertensioon ja hüperprolaktineemia, ning paljud teised [5,6].

Katehoolamiinide - dopamiin, noradrenaliin, adrenaliin - süntees organismis lähtub aminohappest, türosiinist (Joonis 1), mida inimene saab toiduga (liha, juust, piim, jogurt jt.) või sünteesitakse see maksas L-fenüülalaniinist, millest ensüümi fenüülalaniin hüdrosülaas toimel saab türosiin. Türosiin on lähteaineks ka melaniinile (pigment) ja kilpnäärme hormoonidele türoksiinile ja trijodotüroniinile [7].

### DOPAMIINI RETSEPTORID

Dopamiinergilise süsteemi ja sellega seotud häirete uurimisel lähtutakse nii käitumuslikust, füsioloogilisest kui biokeemilisest aspektist. Muuhulgas uuritakse ka dopamiini retseptoreid – nende regionaalset paiknemist, omadusi, mis neid

teineteisest eristab või ühendab ning võimalikke koostoimed teiste retseptorite ning mõju avaldavate valkudega.

Dopamiini efekt avaldub seitsme-transmembraansete (7-TM - *transmembrane*) G-valk-seotud retseptorite (GPCR- *G-protein coupled receptor*) kaudu. Hilisemas kirjanduses kasutatakse nimetuste 7-TM ja GPCR asemel ka termineid *heptahelical*, *heptaspanning* ja *seven-membrane-spanning*, viidates kõik seitsmele membraani läbivale omavahel rakusiseste ja -väliste aasadega ühendatud valguheeliksile retseptori struktuuris [6,8,9]. Käesolevas töös piirdume antud tüüpi retseptorite nimetamisel selguse huvides nende kõige enamlevinud lühendiga - (7-TM) GPCR.

Dopamiini retseptorid on kodeeritud viie erineva geeniga. Retseptorite alatüüpe eristab eelkõige erinev afiinsus dopamiini suhtes ja spetsiifiline seondumine erinevate heterotrimeersete G valkudega [5]. Viimasest lähtuvalt on juba varasemalt, enne kui sai võimalikuks geeni kloneerimine, DA retseptorid jagatud kaheks, millest D<sub>1</sub>-tüüpi retseptorid, seondudes G<sub>s</sub>-tüüpi G valkudega, stimuleerivad ensüümi adenülaadi tsüklaasi (AC) aktiivsust, avaldades rakusisese efektori, tsüklilise adenosiin monofosfaadi (cAMP), tootlikkuse kasvu. D<sub>2</sub>-tüüpi retseptorid, seostudes G<sub>i/o</sub> valguga, vastupidi, vähendavad või ei mõjuta AC aktiivsust ning cAMP tootlikkust [10].

Dopamiini retseptorid mõjutavad ka kaltsiumi ja kaaliumi kanaleid. D<sub>2</sub>-tüüpi retseptorite aktiveerimisel rakuväline K<sup>+</sup> kontsentratsioon suureneb, toimub raku hüperpolarisatsioon, olenevalt tingimustest kas G<sub>α1-3</sub>, G<sub>α0</sub> v. G<sub>αi</sub> valkude vahendusel. DA toimemehhanism kaltsiumi kanalitele on mõlemat tüüpi retseptorite korral aga keerulisem. Lisaks K<sup>+</sup> ja Ca<sup>2+</sup> kanalitele mõjutavad DA retseptorid ka arahhidoonhappe vabanemist, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> vahetust (mõjutades rakusisest pH-d ja ruumala) ja Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaasi ehk ioonpumpa, mis vastutab raku elektroosmoosilise gradiendi säilitamise eest [11].

D<sub>1</sub>-tüüpi retseptorid (D<sub>1</sub> ja D<sub>5</sub>, närilistel vastavalt D<sub>1A</sub> ja D<sub>1B</sub>) on väga sarnase aminohappelise järjestusega. Nende TM-piirkonna sarnasus on 80%, mistõttu on senini puudus headest alatüüpspetsiifilistest D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> selektiivsetest ligandidest. D<sub>1</sub> ja D<sub>5</sub> retseptorid eristuvad siiski teineteisest tänu erinevale piirkondlikule, rakulisele ja rakusisesele paiknemisele ning erinevusele ligandide ja G valkudega seostumises ning edastavas signaalis [6]. On näidatud, et erinevus

D<sub>1</sub> ja D<sub>5</sub> retseptorite neljanda rakusisese aasa primaarstruktuuris määrab retseptorite seondumise erinevate G valgu  $\gamma$ -alatüüpidega ehk seega erineva kompositsiooniga heterotrimeersete G valkudega, mistõttu ilmnevad ka erinevused adenülaadi tsüklaasi aktiveerimisel D<sub>1</sub> ja D<sub>5</sub> retseptorite poolt [12].

D<sub>2</sub>-tüüpi retseptoritel (D<sub>2L</sub>/D<sub>2S</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>) on võrreldes D<sub>1</sub>-tüüpi retseptoritega pikem 7-TM ahela kolmas rakusisene aas, mille pikkus määrab ka D<sub>2L</sub> (*long*-pikk) ja D<sub>2S</sub> (*short*-lühike) alatüüpideks jaotumise, eristades neid teineteisest 29 aminohappejäägi võrra. Organismis leidub enam D<sub>2L</sub> retseptorit, kuid farmakoloogiliselt D<sub>2L</sub> ja D<sub>2S</sub> alatüübid oluliselt ei erine. TM-piirkonna sarnasus D<sub>2</sub> ja D<sub>3</sub> ning D<sub>2</sub> ja D<sub>4</sub> retseptorite vahel on vastavalt 75% ja 53% [11,13].

D<sub>1</sub>-tüüpi retseptoritel on seitse korda pikem rakusisene karboksüüterminaal kui D<sub>2</sub>-tüüpi retseptoritel, sisaldades hulgaliselt seriini ja treoniini jääke ning tsüsteiini jääki üsna karboksüülterminaali alguses. Tsüsteiin, mis sisaldub kõigis GPCR-tes, on võimeline moodustama tioestersidet rasvhappe, palmitaadiga, mistõttu arvatakse, et tsüsteiin ankurdab retseptori karboksüülterminaali rakumembraani külge. D<sub>2</sub>-retseptoritel asub tsüsteiini jääk karboksüülterminaali lõpus. Pikk kolmas rakusisene aas on iseloomulik paljudele G<sub>i</sub> valkudega seostuvatele ning lühike aas G<sub>s</sub> valkudega seostuvatele 7-TM retseptoritele [11].

## DOPAMIINI RETSEPTORITE PAIKNEMINE

Kesknärvisüsteemis leidub dopamiini retseptoreid juttkehas (*striatum*), s.h. sabatuumas (*nucleus caudatus*) ja putamenis ehk koorikus (*putamen*), naalduvas tuumas (*nucleus accumbens*), haisteköbukestes (*tuberculum olfactorium*) ja ajukoos (*cortex*). Perifeersetest kudedest leidub neid neerudes, silmavõrkkestas, aju- ja südameveresoontes, neeru-, peensoolekinniti- (*mesenterium*) ja bronhiaalarterite membraanides [14], ajuripatsis, neerupealses ning südames [7,15].

Dopamiini retseptorite paiknemine on tihedalt seotud dopamiinergiliste juhteteedega ehk neuronitest koosnevate närvikiududega, milles toimub dopamiini liikumine sünteesipaiga ja sihtpunkti vahel. Dopamiinergilisi juhteteid on kokku neli: 1) nigrostriataalne - projektsioonidega mustollusest (*substantia nigra*- SN)

juttkehasse, täpsemalt sabatuuma ja koorikusse, 2) mesokortikaalne – kõhtmisesest katendialast (*tegmentum ventralis* – VTA-ventral tegmental area, ingl.k.) ajukoore, 3) mesolimbiline - VTA-st limbilisse süsteemi: naalduvasse tuuma, septaalsesse piirkonda, mandelkehasse, ning 4) tuberoinfundibulaarne - hüpotalamuse ehk nägemiskühmualumikust (*hypothalamus*) ajuripatsisse e. hüpofüüsi [11,16,17]. D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> retseptorid esinevad kõigis dopamiinergilist aktiivsust omavates piirkondades.

Kõige levinum ning suurima ekspressiooniga on dopamiin D<sub>1</sub> retseptori alatüüp, mille mRNA-d on leitud juttkehast, naalduvast tuumast, haisteköbrokestest, limbilisest süsteemist, hüpotalamusest ja talamusest. D<sub>1</sub> retseptori valk, kuid mitte mRNA, leidub ka entopedunkulaartuumas (*nucleus entopeduncularis*) ja SN võrkmuikusas (*SN pars reticulata*), paiknedes peamiselt nigrostriataalsetes GABAergilistes neuronites koos substantia P-ga.

Retseptori D<sub>5</sub> alatüüp on oluliselt vähem ekspresseeritud. D<sub>5</sub> mRNA-d on leitud hipokampuses, lateraalses e. külgmises nibutuumas (*nucleus mamillare lateralis*), talamuse parafastsikulaartuumas (*nucleus parafascicularis*), eesaju rostraalses e. ninamises piirkonnas, k.a. ajukoores, külgmises talamuses, juttkehas, vähesemal määral ka mustolluses ja keskmises talamuses (*thalamus medialis*). D<sub>5</sub> mRNA-d on väga vähe või praktiliselt puudub dorsaalses e. selgmises juttkehas, naalduvas tuumas ja haisteköbrokestes. Märkimisväärset hulgal on aga D<sub>5</sub> retseptorid ekspresseeritud neerudes [7].

D<sub>2</sub> retseptoreid on leitud peamiselt juttkehas, haisteköbrokestes ja naalduva tuuma südamikus, enkefaliine sisaldavates striatopallidaalsetes GABAergilistes neuronites, ning naalduva tuuma kesta septaalsel küljel neurotensiini sisaldavates neuronites. D<sub>2</sub> mRNA leidub ka erinevates ajukoore osades, septaalpiirkonnas, mandelkehas, hipokampuse formatsiooni graanulrakkudes, SN kompaktses osas (*SN pars compacta*), VTA-s dopamiinergilistes neuronites. Kuigi D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> retseptorite tihedus juttkehas on ühtmoodi suur, eristub siiski selgelt nende regionaalne paiknemine – juttkeha selgmises osas esineb enam D<sub>2</sub> tüüpi ning kõhtmises osas D<sub>1</sub> tüüpi retseptoreid [18]. Harva on D<sub>2</sub> ja D<sub>1</sub> retseptorid ekspresseeritud ühes rakus. D<sub>2</sub> retseptoreid esineb hulgaliselt ka presünaptiliselt autoreseptoritena, moduleerides sellega dopamiini tagasihaaret ja sünteesi. Presünaptilisi D<sub>2</sub>R-eid leidub mustolluses ja VTA-s. Perifeersetest kudedest esinevad D<sub>2</sub>R-id ajuripatsis, neerupealses ja silma võrkkestas [7].



D<sub>3</sub> retseptorid paiknevad peamiselt limbilises piirkonnas, nagu näiteks naalduva tuuma ventromediaalkestas substants P-d ja neurotensiini sisaldavates neuronites, haisteköbrokestes, Calleja saartel, väga vähe selgmises juttkehas. D<sub>3</sub> mRNA-d leidub ka SN kompaktses osas (*pars compactas*), VTA-s dopaminergilistes neuronites, väikeajus (*cerebellum*). Vähem leidub D<sub>3</sub> retseptoreid ka hipokampuses, septaalpiirkonnas ning erinevates ajukoorekihtides ja keskmises oimusagaras (*lobus temporalis medialis*). D<sub>3</sub>R-id esinevad nii auto- kui postsünaptiliste retseptoritena.

Kõrge D<sub>4</sub> retseptori mRNA tase on otsmikukoores, mandelkehas, hipokampuses, hüpotalamuses, keskajus (*mesencephalon*), samuti silma võrkkestas, madal seevastu basaaltuumades (mustollus, mandelkeha, talamuse alune tuum, juttkeha) [19]. Ajukoores ja hipokampuses paiknevad D<sub>4</sub> retseptorid GABAergilistes interneuronites, moduleerides neis piirkondades GABAergilist ülekannet. D<sub>4</sub> retseptoreid on leitud ka *globus palliduse* ja mustolluse võrkmiikuosa (*SN pars reticulata*) ning talamuse võrkja tuuma (*nucleus reticularis*) GABAergilistes neuronites. Perifeersetest kudedest leidub D<sub>4</sub>R-eid südames, kus neid on ~20 korda enam kui ajus [7].

## G VALKUDE ROLL SIGNAALIÜLEKANDEL

### G VALKUDE KLASSIFIKATSIOON JA OMADUSED

Nagu juba eespool mainitud, on seitsme transmembraansete retseptorite signaaliülekanDEL tähtis osa heterotrimeersedel guaniini nukleotiide siduvatel valkudel ehk lühidalt G valkudel, mille alaühikud seostuvad erinevate rakusiseste efektorvalkudega nagu adenülaadi tsüklaasid (AC), fosfolipaas C beeta (PLC $\beta$ ), Ca<sup>2+</sup> ja K<sup>+</sup> kanalid, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> vahetid, fosfoinositiid 3-kinaas (PI<sub>3</sub> kinaas), fosfolipaas D (PLD), guaniini nukleotiidide vahetusfaktorid (RasGEF ja RhoGEF) jpt. [20,21].

Heterotrimeersed G valgud koosnevad kolmest erinevast alaühikust, milledest  $\alpha$ -alaühik on määratud 16,  $\beta$ -alaühik 5 ning  $\gamma$ -alaühik 12 erineva geeniga.  $G\alpha$ ,  $G\beta$  ja  $G\gamma$  molekulmassid on vastavalt 39-52 kDa, 35-36 kDa ja 7-16 kDa.

$G\alpha$  alaühikute sarnasuse põhjal jagatakse G valgud nelja perekonda:  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{12/13}$ .  $\alpha$ -alaühik koosneb kahest domeenist: GTPaasne domeen, mis on seotud guanosiintrifosfaadi (GTP) seostumise ja hüdrolüüsumisega, ning helikaalne domeen, mis haarab GTP valgu sisemusse.  $G\alpha$ -alaühikute spetsiifilisuse retseptor-G valk-efektor interaktsioonides määrab tõenäoliselt just helikaalne domeen, kuna see on piirkond, mis  $G\alpha$ -alaühikutel kõige enam erineb. GPCR-itest suurem osa (~43%) seostub  $G\alpha_{i/o}$  alatüübiga,  $G\alpha_{q/11}$  ja  $G\alpha_s$  alatüübiga seostub vastavalt ~33% ja ~25% retseptoreid. ~11% kõikidest GPCR-itest saab seostuda aga G valgu erinevate alatüüpidega, kusjuures konkreetne valik on määratud tõenäoliselt retseptori rakusiseste domeenide konformatsiooniga, mis sõltub eelkõige retseptorit aktiveerivast ligandist. G valgu perekonnad ja  $\alpha$ -alatüübid koos nende poolt mõjutatavate efektoritega on toodud tabelis 1 [21].

$G\beta$ -alaühik on  $\beta$ -propeller struktuuriga koosnedes seitsmest WD-40 kordusest (trüptofaan-aspartaat lõpuga struktuurikordus, mis sisaldab ~40 aminohappejääki, iga kordus asetub beeta-leht konformatsiooni, mis omavahel paigutudes moodustavad tsirkulaarse beeta-propeller struktuurikonformatsiooni, mis on omane kõikidele WD-kordus tüüpi valkudele [22]).  $G\beta$  ja  $G\gamma$ -alaühikute N-terminaalsed piirkonnad on omavahel tihedasti kokkupõimunud. Põimumisi leidub ka mujal struktuuris, mistõttu  $G\beta$  ja  $G\gamma$  moodustavad enamasti dimeerse terviku, mis on võimeline seostuma hüdrofoobsesse taskusse  $G\alpha$ -GDP struktuuris. GTP seostumisel hüdrofoobne tasku lõhutakse ning side  $G\beta\gamma$ -dimeeri ning  $G\alpha$  vahel nõrgeneb.

## G VALGU AKTIVATSIOON

Inaktiivses olekus on G valk heterotrimeersel kujul ning seotud guanosiindifosfaadiga (GDP), mille vabanemine on kiirust limiteeriv staadium G valgu aktivatsioonil. GDP spontaanse vabanemise kiirus varieerub sõltuvalt  $G\alpha$ -

alaühikust.  $G\beta\gamma$ -dimeer ning  $Mg^{2+}$  ionide puudumine suurendab GDP afiinsust  $G\alpha$ -alaühikule, s.t. stabiliseerib G valgu inaktiivset olekut. Seetõttu on G valgu aktiveerimiseks vajalik  $Mg^{2+}$  ionide olemasolu. GDP vabanemist soodustab G valgu retseptoraktivatsioon, mis leiab aset agonisti seostumisel GPCR-le. GDP vabanemiseks piisab vähesest konformatsiooni muutusest  $\alpha$ -alaühikus. Võrreldes retseptori kristallstruktuuri ja biokeemilisi andmeid on tuletatud, et retseptori ja  $G\alpha$  kontakti ala asub rohkem kui 20 Å kaugusel  $G\alpha$  GDP sidumistaskust, millel seega otsene kontakt retseptoriga puudub. Heterotrimeerse G valgu struktuuris,  $G\alpha$  ja  $G\beta\gamma$  vahel, on aga suhteliselt suur õõnsus, mis arvatakse olevat suunatud rakumembraani poole, võimaldades retseptori aktiveeritud rakusisestel aasadel kasutada seda  $G\alpha$  ja  $G\beta\gamma$  lahku löömiseks, lõhkudes sellega ka  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alaühikute vahel kontakti, mis on seotud GDP vabanemisega.  $G\beta\gamma$  roll G valgu retseptoraktivatsioonis oleks niisiis „kangi meetodil” vabastada GDP  $G\alpha$  sidumistaskust [21].

On üritatud ka näidata, et heterotrimeerse G valgu aktiveerimiseks ei pruugi selle alaühikute dissotsieerumine olla üldse vajalik [23]. Konkretsuse huvides jääme esialgu siiski G valgu enamlevinud ja kinnitust leidnud aktivatsiooniskeemi juurde, kus  $\alpha$ - ja  $\beta\gamma$ -alaühikud aktiveerimisel lahku lüüakse.

G valgu heterotrimeeri dissotsieerumisel seostuvad  $\alpha_{GTP}$ - ja  $\beta\gamma$ -alaühikud neile spetsiifiliste efektorvalkudega (vt. tabelid 1 ja 2), mis omakorda mõjutavad edasist signaaliteed.

G valgu inaktiveerimine ning ühtlasi signaali katkemine sõltub  $\alpha$ -alaühiku GTPaasest aktiivsusest ehk aktiveeritud alaühikuga seotud GTP hüdrolüüsi aktiivsusest, mis varieerub sõltuvalt  $\alpha$ -alaühiku tüübist. Hüdrolüüsi aktiivsus sõltub mitte niivõrd GTPaasest domeenist, kuna see on erinevatel alaühikutel praktiliselt homoloogne, sisaldades külgahelas konserveerunud GTPaasest aktiivsust määravat arginiini jääki, vaid pigem seda ümbritsevast keskkonnast. G-valkude inaktivatsiooni kiirus sõltub lisaks  $G\alpha$ -alaühiku sisemisele GTPaasemale aktiivsusele ka n.ö. välistest valkudest, mida nimetatakse üldistavalt GTPaasi aktiveerivateks valkudeks (*GAP-GTPase activating proteins*), mille alla kuuluvad nii juba tuntud efektorvalkude (nt. PLC, PDE) teatavad alaühikud kui ka RGS-valgud e. G valgu signaali reguleerivad valgud (*RGS-regulators of G protein signaling*), mida imetajatel on tänaseks avastatud 30 ringis. Seega on G valgu

inaktivatsioon suhteliselt komplitseeritud protsess, sisaldades endas nii tagasisidet efektoritelt, kui RGS-valkude mõju. GPCR-te uurimisel soovitakse tihtipeale saavutada aga just olukorda, kus signaal jääks püsima. Sellistel juhtudel kasutatakse G valgu aktiveerimiseks GTP analooge (nt. GTP $\gamma$ S e. guanosiin-5'-[ $\gamma$ -tio]-trifosfaat ja Gpp(NH)p ehk guanülülimidodifosfaat), mis GTPaasi toimel ei hüdrolüüsu. Sel moel on võimalik saavutada G valgu püsiv aktivatsioon, mis avaldub retseptori madalas afiinsuses agonistide suhtes.

Signaali lõppemisele viib ka G valgu ja retseptori vahelise seose katkemine retseptori fosforüleerimise tulemusena. Fosforüleerimine toimub sekundaarsete virgatsainete (nt. cAMP) poolt reguleeritud retseptorkinaaside (GRKs - *G protein coupled receptor kinases*, nt PKA) toimel 7-TM ahela kolmanda rakusisese aasa ning karboksülterminaali seriini ja treoniini jääkidel. Fosforüleeritud piirkondadele seostub aga valk,  $\beta$ -arrestiin, mis takistab edasise retseptor-G valk ühinemise [24]. D<sub>1</sub> retseptori mutatsioonide baasil on arvatud, et  $\beta$ -arrestiini seondumiseks on vajalik retseptori C-terminaali ja 7-TM kolmanda tsütoplasmaatilise aasa järjestikune fosforüleerimine, et need domeenid omavahel lahku ajada ning võimaldada  $\beta$ -arrestiinil seostuda sel moel aktiveeritud kolmandale aasale. Arrestiini n.ö peidetud sidumiskohaga seletatakse ka seda, miks retseptor basaalses olekus arrestiini ei seo, säilitades seega stabiilse kompleksi G valguga [25].

G valkude funktsioneerimist mõjutavad lisaks ka kovalentsed modifikatsioonid G valgu fosforüleerimise ja lipideerimise näol. Fosforüleerimine võib toimuda nt. proteiinkinaas C (PKC) vahendusel ning mõjutab mõningatel juhtudel otseselt ka GTPaasi aktiveerivate valkude (GAP) aktiivsust. G valgu N-terminaali külge rasvhappejäägi (müristüül-, palmitüül-, prenüül-) sidumine atakeerib G valgu membraani külge, mõjutab valgu alaühikute omavahelist seost ning seost efektorvalkudega [21].

## DOPAMIINI D<sub>1</sub> RETSEPTORIGA SEOTUD G VALGUD

D<sub>1</sub> retseptor on seotud adenülaadi tsüklaasi aktiveeriva G<sub>s</sub> valguga. Juttukehas aga, kus on D<sub>1</sub> retseptorite tihedus kõige suurem, on G<sub>s</sub> valke äärmiselt

vähe. Selle asemel on seal oluliselt rohkem  $G_{olf}$  valke, mille aminohappeline järjestus kattub  $G_s$  valguga 88% ulatuses ning mis toimib samuti adenülaadi tsüklaasi aktiveerivalt. On näidatud, et juttkehas kulgeb  $D_1$  retseptori signaal just üle  $G_{olf}$  valgu.  $D_1$ - $G_s$  ja  $D_1$ - $G_{olf}$  signaaliraja erinevus ilmneb arvatavasti seostumises erinevate AC alatüüpidega. On leitud, et nigrostriataalses ja mesokortikaalses dopamiinergilises juhtetes korreleerub  $G_s$  valgu ekspressioon AC1 ning  $G_{olf}$  valgu ekspressioon AC5 alatüübiga [26,27]. Adenülaadi tsüklaasi alatüüpide spetsiifikasse siinjuures ei lasku.

## 7-TM RETSEPTORITEVAHELISED INTERAKTSIOONID

### RETSEPTOR-RETSEPTOR INTERAKTSIOONIDE ILMINGUD

Mudelid, mis kirjeldavad interaktsioone 7-TM retseptorite ja G valkude vahel põhinevad enamasti eeldusel, et retseptor eksisteerib monomeersel kujul ning ligandi seostumine retseptori ning selle seostumine G valguga toimub 1:1:1 stöhiomeetrias. Kuid juba 1970.-ndate lõpust pärinevad esimesed kaudsed ilmingud retseptor-retseptor interaktsioonidest positiivse ja negatiivse kooperatiivsuse näol retseptor-ligand seostumistes. 1990.-ndatel on seoses retseptorspetsiifiliste antikehade kasutuselevõttuga jõudsalt arenenud erinevad immuuntehnikad, mis on võimaldanud juba otseselt näidata retseptor-oligomeeride esinemist nii mudelsüsteemides kui looduslikes kudedes.

GPCR-te interaktsioonides võivad erinevate retseptorite korral osaleda erinevad domeenid erinevate sidemetega.  $\beta_2$ -adreno- $D_2$ -retseptordimeeri korral on tegu transmembraansete domeenide mittekovalentse interaktsiooniga, kaltsium-tundliku ja metabotroopse glutamaadi  $mGlu_5$  retseptoritevaheline interaktsioon hõlmab aga endas nii kovalentseid disulfiidsidemeid kui ioonilisi ja hüdrofoobseid interaktsioone. C-terminaalse osa interaktsioonid osalevad  $GABA_{B(1)}$  ja  $GABA_{B(2)}$  retseptoritevahelise dimeeri moodustumisel. Enamasti on retseptorite oligomeriseerumisel tegu siiski seguga erinevatest interaktsioonidest.

Retseptorite oligomeriseerumine v. dimeriseerumine võib leida aset nii raku sees endoplasmaatilises retiikulumis (ER) kui agonistide toimetel raku pinnal. Agonistide toime dimerisatsioonile on siiski lahtine, kuna on näidatud nii seda, et agonistid suurendavad kolokalisatsiooni kui seda, et dimeerid moodustuvad juba raku sisemuses, enne võimalikku kontakti agonistiga.  $GABA_{B(1)}$  ja  $GABA_{B(2)}$  retseptorite omavaheline dimeriseerumine toimub ER-s.  $GABA_{B(1)}$  retseptori transportimiseks sünteesipaigast rakumembraani on vajalik  $GABA_{B(2)}$  olemasolu.  $GABA_{B(2)}$ , vastupidi, on võimeline rakisemusest membraanini jõudma ka iseseisvalt, kuid korrektseks funktsioneerimiseks sellest ei piisa – mõlema retseptori jaoks on koekspressioon oluline agonisti kõrge afiinsusega seostumiseks e. funktsionaalse sidumiskoha tekkeks.

GPCR-te oligomerisatsiooni võimalikud rollid võiksid olla signaali võimendamine ja retseptori desensitisatsioon, mis avalduvad vastavalt positiivse ja negatiivse kooperatiivsuse näol. Positiivne kooperatiivsus tähistab siin nähtust, kui ligandi seostumine retseptorile põhjustab ligandi afiinsuse tõusu naabruses paiknevatele sidumiskohtadele või agonisti efektiivsuse kasvu. Negatiivse kooperatiivsuse korral, vastupidi, väheneb ligandi seostumisel afiinsus naabersidumiskohtadele või väheneb agonisti efektiivsus.

Kuna G valkude poolt vahendatav retseptori signaali võimendumine tuleneb asjaolust, et üks retseptor on võimeline aktiveerima järjestikku mitmeid G valke, siis arvatakse, et analoogne nähtus võiks aset leida ka ligand-retseptor tasandil. S.t. ühe ligandi seostumisel oligomeersele retseptor-kompleksile aktiveeruvad ka otsese sidumiskoha naabruses paiknevad retseptorid, mis kõik on võimelised G valke aktiveerima, tõstes sellega oluliselt ligandi efektiivsust e. signaali intensiivsust [28,29,30]

Funktsionaalsete oligomeeride suuruse kohta puudub seni kindel seisukoht. Immunooblot analüüsiga on näidatud tetrameeride esinemist, ligandi seostumise kooperatiivsuse matemaatilisel analüüsil on aga näidatud kuni oktameersete oligomeeride olemasolu. Rääkides retseptor oligomeeridest kasutatakse aga kõige sagedamini mõistet dimeer, mis iseloomustab väikseimat oligomeerset olekut [8,28,29,30].

Tänaseks päevaks on piisavalt tõendeid selle kohta, et retseptorid esinevad signaali edastamisel pigem oligomeersete kui monomeersetenä. Samal ajal on jõuliselt hakatud esitama mudeleid, mis analüüsivad ligandi seostumist lähtuvalt

dimeerist [9,31]. Samuti on pakutud seletusi retseptori aktivatsiooni allosteerilisele mudelile, mille korral esineb tasakaal retseptori inaktiivse (R) ja aktiivse (R\*) oleku vahel, tõlgendades olekuid R ja R\* vastavalt retseptori monomeerse ja dimeerse vormina [30].

## RETSEPTORITE HOMO- JA HETEROMEERID

Agonistid on võimelised retseptorite dimeriseerumist v. oligomeriseerumist nii suurendama (nt. adrenergiline  $\beta_2$ -r.) kui vähendama (nt. opioidne  $\delta$ -r.) aga ka üldse mitte mõjutama (nt. muskariinne ACh  $M_3$ -r.).

Agonist-indutseeritud dimerisatsiooni üks funktsioon võib olla G valguga aktiveerimine retseptori poolt -  $\beta_2$ -adrenergilise retseptori korral on näidatud, et kui dimeeri teke on takistatud, väheneb agonisti mõju adenülaadi tsüklaasi aktivatsioonile.

Muteeritud retseptorite kasutamisega on demonstreeritud, et muskariinse atsetüülkoliini  $M_3$  ja Ca-tundliku retseptori agonistide ning antagonistide afiinsuse, samuti Ca-tundliku r. agonistide toime kiiruse säilitamiseks on vajalik kovalentne side retseptorite vahel. Mittefunktsionaalse mutandi ja funktsionaalse retseptori koekspressioonil on näidatud agonisti afiinsuse ja toime vähenemist (kemokiini r.), signaali osalist taastumist aga on täheldatud erinevate mittefunktsionaalsete Ca-tundlike retseptori mutantide kombineerimisel. Huvitav on veel see, et dimerisatsioon võib tingida ka baasaktiivse retseptori tekke – nähtus, mis ilmneb vereliistakut aktiveeriva faktori retseptori *wild-type* ja G valguga seondumatu mutandi koekspressioonil; suurenenud on samuti agonisti efektiivsus. Seega, ainuüksi retseptorite internaliseerumine võib käivitada signaaliraja [30].

Eelnev jutt nii agonistide toimest dimerisatsioonile kui dimerisatsiooni toimest ligandide afiinsusele ja efektiivsusele, samuti baasaktiivsusele kehtib üldistavalt nii homodimeersete ehk sama tüüpi kui heterodimeersete ehk erinevat tüüpi retseptorpaaride kohta. Tabelis 3 on toodud näiteid homo- ja heterodimeersetest GPCR-test.

Esimesed vihjed GPCR-te heterodimeeride olemasolule pärinevad töödest, kus täheldati, et virgatsaine seostumisel talle vastava retseptoriga muutuvad teise

virgatsaine retseptori omadused [32,33]. Analoogselt homomeeridega, on näidatud agonistide suurenenud afiinsust nt. dopamiini ja somatostatiini koekspressioonitundlike retseptoritele [34].  $\delta$ -opioidse ja  $\beta_2$ -adrenergilise retseptori koekspressioon mõjutab aga retseptorite rakusisest liiklemist [30].

Tänapäeval võib öelda, et heterodimeriseerumine GPCR-te seas on suhteliselt laialt levinud nähtus ja hõlmab ühtaegu nii sarnast tüüpi, nagu nt. eelpool mainitud  $GABA_{B1}$  ja  $GABA_{B2}$  r., kui ka erinevat tüüpi retseptorite (opiodne + adrenergiline, dopamiini + somatostatiini, dopamiini + adenosini jne.) komplekse [1,2,30,34,35]. Lisaks sellele toimub heteromeriseerumine ka erinevast klassist retseptorite vahel. Dopamiini  $D_5$  ja  $D_1$  retseptorid näiteks moodustavad heterodimeere vastavalt  $GABA_A$  ja NMDA ioonkanalretseptoritega. Antud juhtudel väheneb NMDA retseptori ioonide voog dopamiini retseptori aktiveerimisel, ioonkanalretseptori aktiveerimine aga  $D_5R$  dopamiini signaali stimuleerib ning  $D_1R$  signaali inhibeerib [36,37].

## ADENOSIINI $A_1$ JA DOPAMIINI $D_1$ RETSEPTORITE HETEROMEERID

Adenosiin on endogeenne neuromodulaator, nukleosiid, mis käitub mitmes närviringis kui pidurdusvirgatsaine, pärssides teiste virgatsainete vabanemist. Adenosiini retseptorid ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) on 7-TM-sed G valkudega seotud retseptorid, mis paiknevad üle terve organismi. Adenosiini leidub kogu rakuvälises alas, erinevalt näiteks sünaptiliselt vabastatavast dopamiinist, kuhjudes ärkveloleku ajal ning vähenedes unega. Adenosiini retseptorite blokeerimine retseptori antagonistidega (nt. kofeiin) vähendab adenosiini pidurdavat toimet.

$A_1$  ja  $A_{2A}$  retseptorid juttkehas vastutavad adenosiini agonistide ja antagonistide mootorikat pärssiva ja stimuleeriva mõju eest. Suurem osa juttkeha adenosiini retseptorist paiknevad GABAergilistes neuronites, mis moodustavad 90% kogu juttkeha neuronite populatsioonist.  $D_2$  retseptoreid sisaldavates striatopallidaalsetes GABAergilistes neuronites leidub nii  $A_{2A}$  kui  $A_1$  retseptoreid.  $D_1$  retseptoreid sisaldavates nigrostriataalsetes GABAergilistes neuronites leidub



aga vaid A<sub>1</sub> retseptoreid. Adenosiini ja dopamiini retseptorite kolokalisatsioon ongi andnud aluse uurida funktsionaalsete heteromeeride olemasolu.

Adenosiin deaminaas (ADA) paikneb nii tsütosoolis kui rakumembraanil ning katalüüsib adenosiini lammutamist inosiiniks. On näidatud, et ADA on vajalik A<sub>1</sub> retseptori agonistide kõrge afiinsusega seostumiseks ning arvatakse, et ADA roll võiks olla A<sub>1</sub> retseptori ja G valgu vahel efektiivse seose loomine [2,35,38,39].

Ligandi seostumisega on näidatud, et A<sub>1</sub>R agonistid kaotavad ADA juuresolekul agoniste kõrge afiinsusega siduva D<sub>1</sub> retseptorite fraktsiooni viies retseptori madala afiinsusefa olekusse. A<sub>1</sub>R aktivatsiooni mõju D<sub>1</sub>R-le on seega analoogne GTPγS toimele. A<sub>1</sub>R efekt avaldub ka adenülaadi tsüklaasi tasandil. A<sub>1</sub> ja D<sub>1</sub> retseptorid mõjuvad AC-le vastupidiselt, kuna üks aktiveerib G<sub>i</sub>, teine G<sub>s</sub> (G<sub>olf</sub>) valgu. On näidatud, et A<sub>1</sub>R agonisti juuresolek vähendab ning antagonistide juuresolek suurendab dopamiini poolt indutseeritud cAMP akumulatsiooni [1,8]. Käitumuslikul tasandil on sama efekti täheldatud D<sub>1</sub>R agonistide indutseeritud motoorse aktiivsuse vähenemise ja suurenemise näol vastavalt A<sub>1</sub>R agonistide ja antagonistide (nt kofeiin) poolt [3].

## RETSEPTORITE UURIMINE MUDELSÜSTEEMIS

Ülalkirjeldatu taustal võib vaid aimata, kui keeruline on biokeemiline signaaliülekanne organismis. Tänapäeval kasutatakse laialdaselt erinevaid mudelsüsteeme, mis lihtsustab oluliselt GPCR-te uurimist. Viirusinfektsiooni abil ekspresseeritakse GPCR-eid nii bakteritesse (*Escherichia coli*) ja pärmseenerakkudesse (*Saccharomyces cerevisiae*) [40] kui imetaja- (CHO-*Chinese hamster ovary*, HEK 293-*Human embryonic kidney*, BHK 21- *Baby hamster kidney*) ja putuka- (Sf9-*Spodoptera frugiperda*) rakkudesse [41,42]. Mudelsüsteemi valik sõltub mõistagi eesmärgist.

Retseptorite funktsionaalsuse uurimiseks on oluline luua võimalikult lihtne, kuid retseptoritele ja signaaliraja komponentidele loomulähedane keskkond, seetõttu sobivad selleks kõige paremini imetaja- ja putukarakud. Putukarakud on oma omadustelt imetajarakkudele suhteliselt sarnased. Nende eelis imetajarakkude ees seisneb aga selles, et neis praktiliselt puudub endogeensete GPCR-te

taustamüra, vähendades tulemuste valeinterpretatsiooni. Putukarakkudes on ka suhteliselt vähe endogeenseid G valke, mis oleksid võimelised spetsiifiliselt seostuma ekspresseeritud retseptoritega. Näidatud on  $G_s$ ,  $G_q$ ,  $G_o$  valkude esinemist, kuid seda enamasti allpool taset, mis oleks vajalik retseptor-G valk seose ilmlemiseks. Seetõttu saab eksogeensete G valkude ekspresseerimisega putukarakkudes uurida ka retseptor-G valk- ning G valgu alatüüpspetsiifilisi efekte. Putukarakkudes saavad toimuda ka kõik olulisemad translatsioonijärgsed modifikatsioonid, nagu fosforüleerimine ja rasvhappe atsetüleerimised (palmitüül-, prenüül-, müristüülrühma sidumised), mis, nagu juba ülalpool mainitud, on vajalikud nii retseptori kui G valkude ning efektorite korrektseks funktsioneerimiseks [42,43,44].

Sf9 rakud on liblika munasarja rakud, mis on levinud mudelsüsteem GPCR-te uurimisel, kuna nende kasvatamine on võrreldes imetajarakkudega suhteliselt odav ja lihtne ning neis ekspresseeritavad valgud ühtivad enamasti omadustelt vastavate natiivsete vormidega [43].

## EKSPERIMENTAALNE OSA

### MATERJALID

[<sup>3</sup>H]SCH23390 (71,0 Ci/mmol) ja [<sup>3</sup>H]DPCPX (124 Ci/mmol) osteti firmalt Amersham Biosciences. Dopamiin, (+)-butaklomool ja Tris-(hüdrosümetüül)-aminmetaan firmalt Sigma-Aldrich Co., SCH23390 ((R)-(+)-7-kloro-8-hüdrosü-3-metüül-1-fenüül-2,3,4,5-tetrahüdro-1H-3-bensasepiin), SKF83566 (8-bromo-2,3,4,5-tetrahüdro-3-metüül-5-fenüül-1H-3-bensasepiin-7-ool), SKF38393 ((±)-1-fenüül-2,3,4,5-tetrahüdro-(1H)-3-bensasepiin-7,8-diool), dihüdreksidiin (DHX), A 77636 (3-(1'-adamantüül)-1-aminometüül-3,4-dihüdro-5,6-dihüdrosü-1H-2-bensopüraan), DPCPX (8-tsüklopentüül-1,3-dipropüülksantiin), N-CPA (N(6)-tsüklopentüüladenosiin) ja ADA (adenosiin deaminaas) firmalt Tocris Cookson Inc., GTPγS firmalt Roche Diagnostics, EDTA (etüleendiamiintetraädikhape) firmalt Merck, BSA firmalt Boehringer Mannheim ja DTT (ditiotreitol) firmalt Reanal, EGTA (etüleenglükool bis(2-aminoetüül eeter)-N,N,N',N'-tetraädikhape), PMSF (fenüülmetüülsulfonüül fluoriid), bensamidiin ja aprotiniin firmalt Sigma. Mõnede käesolevas töös kasutatud ühendite ning retseptorligandide struktuurvalemid on toodud joonisel 3.

Sf9 rakud osteti firmalt Quattromed ning inimese A<sub>1</sub> ja D<sub>1</sub> retseptorite ning veise G valgu alaühikute (Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i1</sub>, Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub>) ekpressiooniks vajalik bakuloviirus valmistati Dr. Johnny Näsmani poolt Uppsala Ülikoolis varemkirjeldatud meetodil [45]. Selleks vajalikud retseptorite cDNA-d saadi prof. K. Fuxe'lt (Karolinska Institutet, Rootsi) ja G valgu alaühikute ülekandektorid prof T. Haga'lt (Gakushin University, Tokio, Jaapan).

## MEETODID

### A<sub>1</sub> JA D<sub>1</sub> RETSEPTOREID NING G VALKE EKSPRESSEERIVATE SF9 RAKKUDE KASVATAMINE

Sf9 rakke kasvatati 500 ml kolvis rotatsioonsegistil 27 °C juures SF900 L-glutamiiniga söötmes (Gibco), millele oli lisatud penitsilliini (50 U/ml, Gibco) ja streptomütsiini (50 µg/ml Gibco), tihedusel  $(0,5-3) \cdot 10^6$  rakku/ml. Rakud nakatati A<sub>1</sub> ja D<sub>1</sub> retseptoreid ning G valgu alaühikuid - Gα<sub>s</sub>, Gα<sub>i</sub> ja Gβγ - kodeerivate DNA lõike sisaldavate viirustega kombinatsioonides A<sub>1</sub>D<sub>1</sub> + Gα<sub>s</sub>Gα<sub>i</sub>Gβγ (A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>GsGi) ja D<sub>1</sub> + Gα<sub>s</sub>Gβγ (D<sub>1</sub>Gs). 48 tundi pärast nakatamist koguti rakud tsentrifuugimisega (1500 rpm, 10 min) ning sidumiskatsete tarbeks valmistati neist membraanpreparaadid, nagu kirjeldatud alljärgnevalt.

### MEMBRAANPREPARAATIDE VALMISTAMINE

Sf9 rakud homogeniseeriti ultraheliga (3x 10s, võimsusel 70 W, 70%; Bandelin Sonopuls sonikaator) homogeniseerimispuhvril 1 (HP1: 20 mM Tris-HCl (pH=7,4), 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 mM PMSF (fenüülmetüülsulfonüülfluoriid), 1 µg/ml aprotiniin, 0,25 mM bensamidiin) ning saadud suspensioon tsentrifuugiti (10 000 g, 10 min, 4 °C), mille käigus eraldati segust suuremad rakuosakesed ja rakutuomad. Rakumembraanide eraldamiseks saadud supernatant tsentrifuugiti (30 000 g, 40 min, 4 °C) ning settinud membraanid pesti kahel korral HP1 puhvril homogeniseerimise (3x 10s) ja tsentrifuugimise (30 000 g, 40 min, 4 °C) teel. Pestud membraanid homogeniseeriti (3x 10s) sidumispuhvril 1 (SP1: 50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 5 mM, MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA) valgu kontsentratsioonil 1 mg/ml ning säilitati 1 ml portsjonitena -80 °C juures. A<sub>1</sub> retseptorite ekspressiooniga membraane inkubeeriti enne eksperimenti endogeense adenosini lammutamiseks adenosin deaminaasi (ADA, 5 U/ml) juuresolekul 30 min 25 °C

juures. ADA lisati ka kõigisse A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>GsGi membraanpreparaadi sidumisi puudutavatesse katsepuhvritesse (SP1+1 U/ml ADA).

Roti aju juttkeha membraanpreparaadi valmistamiseks kaaluti ~1 g ajukudet (8 erinevat juttkeha), millele lisati 50 ml homogeniseerimispuhvrit 2 (HP2: 2,5 mM Tris-HCl (pH=7,4), 2 mM EGTA) ning homogeniseeriti ultraheliga kuni segu oli ühtlane. Seejärel lisati suspensioonile 50 ml homogeniseerimispuhvrit 3 (HP3: 50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 2 mM EGTA), lahus segati korralikult ning tseentrifuugiti (16 000 rpm, 40 min, 4 °C). Supernatant valati pealt ning jäägile lisati pesemiseks sidumispuhvrit 2 (SP2: 30 mM Tris-HCl (pH=7,4), 100 mM NaCl, 7,5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM EGTA), homogeniseeriti (3x 10s) ja tseentrifuugiti (16 000 rpm, 40 min 4 °C), jäägiga korrati homogeniseerimist ja tseentrifuugimist. Rakulüsaat säilitati SP2 puhvrts 2 juures -80 °C juures 1,5 ml portsjonitena valgu kontsentratsioonil ~2,6 mg/ml.

Valgu sisaldus membraanisuspensioonis määrati modifitseeritud Lowry meetodiga, kasutades standardainena veise seerumi albumiini [46].

## [<sup>3</sup>H]SCH23390 JA [<sup>3</sup>H]DPCPX TASAKAALULINE SEOSTUMINE

Külmutatud Sf9 rakkudest valmistatud membraanpreparaat sulatati toatemperatuuril ning homogeniseeriti sidumispuhvris 1 (SP1). Tasakaaluline küllastussidumine membraanisuspensioonis viidi läbi radioligandi erinevatel kontsentratsioonidel ([<sup>3</sup>H]SCH23390: 0,1 nM - 9 nM; [<sup>3</sup>H]DPCPX: 0,1-10 nM). [<sup>3</sup>H]SCH23390 mittespetsiifiline seostumine määrati 1 µM SCH23390 või 1 µM butaklomooli juuresolekul, [<sup>3</sup>H]DPCPX mittespetsiifiline seostumine aga 1 µM DPCPX juuresolekul. A<sub>1</sub>R ligandide mõju [<sup>3</sup>H]SCH23390 seostumisele kontrolliti 10 nM N-CPA või DPCPX lisamisega katsesegusse. Lahuseid inkubeeriti 60 min 25 °C juures. Reaktsiooni peatamiseks filtreeriti reaktsioonisegu läbi eelnevalt niisutatud klaasfiiberfiltri (Whatman GF/B) ning pesti jääkülma pesupuhvriga (3x 5 ml). Filtrid viidi vialidesse, lisati 4 ml stsintillatsioonikohteili (OptiPhase "HiSafe" 3, Wallac Scintillation Products) ning jäeti toatemperatuuril ~12 tunniks seisma. Seejärel loendati filtritele jäänud radioaktiivsus vedelik-stsintillatsioonspektromeetriga.

Spetsiifilise seostumise saamiseks lahutati üldisest sidumisest mittespetsiifiline sidumine, mis määrati märgistamata antagonist juuresolekul.

Tasakaaluline konkureeriv sidumine viidi läbi kasutades erineva kontsentratsiooniga, enamasti 0,1 nM - 1 mM, konkureeriva ligandi ja fikseeritud kontsentratsiooniga radioligandi (erinevates katsetes 1,9-3,9 nM) juuresolekul. Katsetes dopamiiniga lisati sidumispuhvrise ligandi oksüdeerumise vältimiseks 1 mM DTT-d. G valkude aktivatsiooni mõju hindamiseks lisati katsesegusse 100 µM GTPγS ning adnosiini retseptori toimet D<sub>1</sub>R sidumisomadustele hinnati 10 nM N-CPA ja/või DPCPX juuresolekul konkureeriva seostumise katsetes.

Reaktsioon peatati filtreerimise teel ja loendati seostunud radioaktiivsus nagu kirjeldatud ülal.

Kõik ajukoe katsed viidi läbi sidumispuhvrise 2 (SP2) ning katsesegu inkubeeriti 30 °C juures 45 min.

## [<sup>3</sup>H]SCH23390 SEOSTUMISE KINEETIKA

[<sup>3</sup>H]SCH23390 assotsiatsioonikineetikat Sf9 membraanidele mõõdeti radioligandi erinevatel kontsentratsioonidel (0,4-3,6 nM) sidumispuhvrise 1 temperatuuril 25 °C.

[<sup>3</sup>H]SCH23390 dissotsiatsiooni kineetika määramiseks inkubeeriti membraane 60 minutit 25 °C juures radioligandi kontsentratsioonil, mis jäi erinevates katsetes vahemikku 1,2-2,1 nM. [<sup>3</sup>H]SCH23390 dissotsiatsioonireseptoritelt algatati 1 µM butaklomooli või 1 mM dopamiini lisamisega inkubatsioonisegusse. A<sub>1</sub> retseptori selektiivse agonisti, N-tsüklopentüüladenosiini (N-CPA), mõju [<sup>3</sup>H]SCH23390 dissotsiatsioonikineetikale A<sub>1</sub> ja D<sub>1</sub> retseptorit koekspressseerivates membraanides hinnati 10 µM N-CPA lisamisega katsekeskkonda.

Kineetika mõõtmisel võeti ajahetkel t reaktsioonisegust proov (500 µl), milles reaktsioon peatati kiire filtreerimisega GF/B -l ja pesemisel jääkülma pesupuhvriga (3x3 ml). Seostunud radioaktiivsus loendati nagu kirjeldatud ülal.

## ANDMETE TÖÖTLEMINE

Andmed töödeldi kasutades programmi GraphPad Prism<sup>®</sup> 4.00 (GraphPad Software, Inc.) ning analüüsiti mittelineaarsete vähimruutude meetodil. Katsed tehti duplikaatides ning andmed esitati kujul keskmine  $\pm$ SEM. Ligandi dissotsiatsioonikonstant  $K_i$  leiti Cheng-Prusoffi teisendusega [47]:  $K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$ , kus  $[L]$  on radioligandi kontsentratsioon ning  $K_d$  radioligandi dissotsiatsioonikonstant.

## TULEMUSED JA ARUTELU

### DOPAMIINI D<sub>1</sub> JA ADENOSIINI A<sub>1</sub> RETSEPTORITE EKSPRESSIOON SF9 RAKKODES

Retseptorite ekspressiooni D<sub>1</sub>R ja G valke ( $\alpha_s$ ,  $\beta_1\gamma_2$ ) ning D<sub>1</sub>R, A<sub>1</sub>R ja G valke ( $\alpha_s$ ,  $\alpha_{i1}$ ,  $\beta_1\gamma_2$ ) kodeeriva bakuloviirusega nakatatud Sf9 rakkudes kontrolliti D<sub>1</sub>R ja A<sub>1</sub>R selektiivsete radioaktiivse märgistusega antagonistide, [<sup>3</sup>H]SCH23390 ja [<sup>3</sup>H]DPCPX, seostumisega membraani suspensioonis. D<sub>1</sub>Gi nakatatud rakkude membraanidele oli [<sup>3</sup>H]SCH23390 seostumine homogeenne ning radioligandi affiinsus ( $K_d$ ) ja retseptorite tihedus ( $B_{max}$ ) vastavalt  $1,1 \pm 0,1$  nM ja  $7,4 \pm 0,2$  pmol/mg valk, kusjuures [<sup>3</sup>H]DPCPX spetsiifilist sidumist nendele membraanidele ei õnnestunud määrata. Küll aga oli mõlema radioligandi sidumine A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>GSGi nakatatud membraanidele homogeenne ja küllastuv. Neid sidumisi iseloomustasid dissotsiatsioonikonstandid,  $K_d = 1,1 \pm 0,1$  nM ja  $K_d = 2,1 \pm 0,8$  nM ning retseptorite tihedused  $B_{max} = 2,2 \pm 0,1$  pmol/mg valk ja  $B_{max} = 2,9 \pm 0,4$  pmol/mg valk, vastavalt [<sup>3</sup>H]SCH23390 ja [<sup>3</sup>H]DPCPX jaoks (joonised 4 ja 5).

Saadud tulemused langevad kokku Sf9 rakkude kohta kirjanduses avaldatud  $K_d$  väärtustega (0,8-1,9 nM) [44,48,49] ning ekspresseeritud GPCR-te tihedusega ( $B_{max} = 1,5-24,8$  pmol/mg valk) [44,48,50]. Seega võib väita, et mõlemad retseptorid on korrektselt ekspresseeritud ja antud membraanpreparaat kasutatav A<sub>1</sub>/D<sub>1</sub> retseptorite vahelise modulatsiooni uurimiseks. A<sub>1</sub>R aktiveerimine

10 nM N-CPA ja blokeerimine 10 nM DPCPX poolt ei mõjutanud oluliselt [<sup>3</sup>H]SCH23390 sidumisomadusi D<sub>1</sub>R retseptoritele (+10 nM N-CPA:  $K_d=1,2\pm 0,2$  nM,  $B_{max}=2,3\pm 0,1$  pmol/mg valk; + 10 nM DPCPX:  $K_d=1,1\pm 0,1$  nM,  $B_{max}=2,1\pm 0,1$  pmol/mg valk).

## [<sup>3</sup>H]SCH23390 SEOSTUMISE KINEETIKA SF9 RAKKUKES

Katsetes kasutatava kasutatava D<sub>1</sub>R selektiivse radioligandi [<sup>3</sup>H]SCH23390 [51,52] kineetika uurimisel leiti, et radioligandi dissotsiatsiooni kiiruskonstant ning poolestusaeg Sf9 rakumembraanides (D<sub>1</sub>Gs) on vastavalt  $k_{off}=0,11\pm 0,01$  min<sup>-1</sup> ja  $\tau=6,5\pm 0,7$  min. A<sub>1</sub>R ja D<sub>1</sub>R koekspressioon ning A<sub>1</sub>R agonisti (N-CPA) juuresolek dissotsiatsiooni kineetikat oluliselt ei mõjutanud ( $k_{off}=0,13\pm 0,02$  min<sup>-1</sup>). Samuti ei sõltunud dissotsiatsiooni kiirus sellest, millist reagenti kasutati väljatõrjuva ligandina, kas D<sub>1</sub>R agonisti, dopamiini ( $k_{off}=0,12\pm 0,01$  min<sup>-1</sup>) või antagonisti, butaklomooli ( $k_{off}=0,13\pm 0,01$  min<sup>-1</sup>). [<sup>3</sup>H]SCH23390 dissotsiatsiooni poolestusaeg A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>GsGi ekspressiooniga membraanides on  $\tau=5,0\pm 0,7$  min (joonis 6.). Sellest lähtuvalt otsustati, et inkubatsiooniaeg 60 minutit (ajukatsetes 45 min) on antud katsetingimustes piisav radioligandi tasakaaluliseks seostumiseks kõigil kontsetratsioonidel.

[<sup>3</sup>H]SCH23390 assotsiatsioonikineetika uurimisel leiti, et see protsess oli kiire ja küllastuv ( $\tau_{1/2}=3,7\pm 0,3$  min 0,4 nM ja  $\tau_{1/2}=1,6\pm 0,2$  min 3,6 nM radioligandi juures, joonis 7). Varieerides [<sup>3</sup>H]SCH23390 kontsentratsiooni, leiti, et näiv assotsiatsioonikiirus sõltub lineaarselt radioligandi kontsentratsioonist (joonis 8), viidates sellele, et antud katsetingimustel kehtib ligandi seostumisel retseptoriga lihtne bimolekulaarne reaktsiooniskeem ( $R+L\leftrightarrow RL$ ) [53]. Assotsiatsiooni näiva kiiruskonstandi ( $k_{obs}$ ) lineaarne sõltuvus radioligandi kontsentratsioonist pseudo esimest järku reaktsiooni tingimustes (joonis 8) võimaldas arvutada ka assotsiatsiooni teist järku kiiruskonstandi  $k_{on}=0,20\pm 0,02$  nM<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> ning sirge telglõigu järgi hinnata dissotsiatsiooni kiiruskonstanti  $k_{off}=0,14\pm 0,02$  min<sup>-1</sup>. Kuna  $k_{off}$  ja  $K_d$  väärtused erinevates membraanpreparaatides (D<sub>1</sub>Gs ja A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>GsGi) langesid üksteisega hästi kokku ning  $k_{off}$ , mis määrati dissotsiatsioonikatsetest



langeb kokku joonisel 8 toodud sirge telglõiguga, ei ole põhjust kahelda, et kõigis uuritud membraanpreparaatides kehtib [<sup>3</sup>H]SCH23390 seostumisel D<sub>1</sub>R-ga lihtne üheastmeline bimolekulaarne reaktsiooniskeem, mis ei sisalda endas kineetiliselt detekteeritavat retseptor-ligand kompleksi isomerisatsioonietappi (R+L↔RL↔RL\*) nagu see esineb mõnede teiste GPCR-te korral [54,55].

## D<sub>1</sub>R LIGANDIDE SIDUMISOMADUSED KONKUREERIMISEL [<sup>3</sup>H]SCH23390-GA

Dopamiini D<sub>1</sub>R osaline agonist [56], SKF38393, inhibeeris [<sup>3</sup>H]SCH23390 sidumist Sf9 membraanidele (A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>GsGi) kontsentratsioonist sõltuvalt, mida iseloomustas pIC<sub>50</sub>=5,90±0,06 (joonis 9, tabel 4). G valgu α-alaühiku aktiveerimine, GTPaasi suhtes resistentse tio-rühma sisaldava nukleotiidi analoogi, GTPγS toimel [44] ning A<sub>1</sub>R antagonist (DPCPX) juuresolek ei avaldanud olulist mõju ei SKF38393 seostumise afiinsusele, pIC<sub>50</sub> väärtused vastavalt 5,78±0,08 ja 5,83±0,08, ega Hilli koefitsiendile (n<sub>H</sub>~1). Tulemus viitab retseptor-G valk nõrgale seosele või selle puudumisele A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>GsGi membraanpreparaadis. D<sub>1</sub>Gs nakatatud Sf9 membraanides siiski täheldati mõningast seost retseptori ja G valkude vahel (tabel 4) – neis esines kõrge afiinsusega agonisti (SKF38393) siduv retseptorite fraktsioon (%R<sub>H</sub>=17±5), mis kadus GTPγS toimel. Sama efekt ilmnis ka DA korral (%R<sub>H</sub>=21±8). Erinevalt SKF38393-st esines DA-l ka A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>GsGi membraanides kõrge afiinsusega seostumist (%R<sub>H</sub>=23±8), mis vähenes GTPγS toimel 13±4% tasemele (joonis 10). Võrreldes SKF38393-ga suudab dopamiin, kui endogeenne D<sub>1</sub>R täisagonist, oluliselt tugevamini adenülaadi tsüklaasi aktiveerida, mis viitab sellele, et DA toimel on retseptoril efektiivsem seos G valkude või teiste signaali hõlbustavate valkudega. Sellest võib tuleneda ka näiv erinevus G valkudega seostunud retseptorite tasemes, mis ilmneb kõrge afiinsusega agoniste siduva fraktsioonina DA ja SKF38393 konkureerimisel radioligandiga. Kuigi saadud tulemuste põhjal D<sub>1</sub>R seos G valkudega A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>GsGi membraanpreparaadis näib kaheldav, siis fakt, et retseptori aktiveerimisel DA ja SKF38393-ga õnnestus mõõta agonisti kontsentratsioonist sõltuvat cAMP kontsentratsiooni kasvu, näitab,

et D<sub>1</sub>R-1 funktsionaalne seos G valkudega antud membraanpreparaadis siiski esineb (Ain Uustare, andmed avaldamisel)[57].

A<sub>1</sub>R aktiveerimine agonist N-CPA-ga ei mõjutanud DA afiinsust (N-CPA-ga pIC<sub>50</sub>=5,32±0,06 ja ilma pIC<sub>50</sub>=5,35±0,06; joonis 11), näidates et nende retseptorite vahelist modulatsiooni, mida on õnnestunud määrata roti aju juttkeha ja fibroblasti membraanides [2,3] pole võimalik iseloomustada Sf9 rakkude membraanides. Kas põhjuseks on D<sub>1</sub>R-te ebapiisav seos G valkudega või on tegemist Sf9 rakkudele omase efektiga, jääb antud töö kontekstis selgusetuks.

Dopamiinergiliste antagonistide konkureerimine [<sup>3</sup>H]SCH23390-ga Sf9 rakumembraanides on toodud tabelis 4. Butaklomooli afiinsus antud katsetingimustel oli nii D<sub>1</sub>Gs ja A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>GsGi ekspressiooniga Sf9 rakumembraanides kui ka roti juttkeha membraanides (tabel 5) oluliselt madalam (K<sub>i</sub> väärtused vastavalt 180 nM, 210 nM ja 120 nM) võrreldes varem ajukudedes (K<sub>i</sub>=0,9-16,6 nM) [46,51,58,59] ja Sf9 rakkudes (K<sub>i</sub>=2,3 nM) [48] saadud tulemustega. Butaklomooli eripära avaldus ka väljatõrjumisgraafiku erakordselt järsu languse näol, mida iseloomustavad Hilli koefitsiendid n<sub>H</sub>>2 katsetes Sf9 rakumembraanides. Adenülaadi aktiivsuse (AC) inhibeerimise meetodil määratud butaklomooli K<sub>i</sub> väärtus roti juttkeha membraanides (K<sub>i</sub> 95% usaldusvahemik: 0,7-9,3 nM - Argo Vonk'i avaldamata andmed) aga ei erinenud kirjanduses avaldatud tulemustest. Katsekeskkond AC aktivatsiooni katsetes oli sama, mis radioligandi väljatõrjumisel antud töös (SP2: 30 mM Tris-HCl (pH=7,4), 100 mM NaCl, 7,5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM EGTA). Butaklomool on teadaolevalt dopamiini D<sub>1</sub> ja D<sub>2</sub> retseptoritele ligikaudu võrdselt kõrge afiinsusega seostuv antagonist [51,58], millel Hilli koefitsient radioligandi väljatõrjumiskatsetes on ~1 [46,59]. Kõrge Hilli koefitsient viitab positiivsele kooperatiivsusele butaklomooli seostumisel, kuid selle põhjus ja mehhanism jäi antud töö raames avamata.

[<sup>3</sup>H]SCH23390 väljatõrjumisel märgistamata SCH23390-ga Sf9 rakumembraanidest saadi radioligandi küllastussidumisest määratud K<sub>d</sub> väärtusega ideaalselt kokkulangevad tulemused - kõigil juhtudel afiinsus 1,1 nM (tabel 4, joonis 4). Juttkeha membraanides määratud SCH23390 K<sub>d</sub> ja K<sub>i</sub> väärtused olid veidi madalamad (K<sub>d</sub>=0,8±0,1 nM (joonis 12), K<sub>i</sub>=0,5 nM (joonis 13, tabel 5)). SCH23390 on kõrge afiinsusega D<sub>1</sub>R selektiivne antagonist [51,52], mille K<sub>d</sub> (K<sub>i</sub>) väärtus ajukudedes on sageli < 0,5 nM [10,46,51,60,61,62,63]. Kineetiliste

konstantide põhjal arvutati valemist  $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  [ $^3\text{H}$ ]SCH23390 afiinsuseks 0,7 nM.

[ $^3\text{H}$ ]SCH23390 tasakaaluline seostumine roti juttkeha membraanidele oli homogeenne ja küllastuv (joonis 12), sidumisparameetritega  $K_d = 0,8 \pm 0,1$  nM ning  $B_{\text{max}} = 0,24 \pm 0,01$  pmol/mg valk. Kirjanduse andmetel on roti juttkehas näidatud  $D_1\text{R}$  tiheduseks 0,06-0,36 pmol/mg valk. [46,61,63], harvem ka 1 pmol/mg valk suurusjärgus [59]. Käesolevas töös kasutatud roti juttkeha membraanpreparaadis on seega  $D_1\text{R}$ -te ekspresioon suhteliselt kõrge.

$D_1\text{R}$  täisagonistide, dopamiin ja DHX, konkureerimist radioligandiga juttkeha membraanpreparaadis iseloomustasid Hilli koefitsiendid 0,65 (täpsed väärtused on toodud tabelis 5) ning selgelt eristuv kõrge ja madala afiinsusega agonisti siduv retseptorite fraktsioon, mis vähenes GTP $\gamma$ S toimel (joonised 14 ja 15). Osalise agonisti (SKF38393) korral seevastu kõrge ja madala afiinsusega seostumine ei eristunud ( $n_H = 0,82 \pm 0,11$ ), kuid GTP $\gamma$ S juuresolek siiski alandas SKF38393 afiinsust kaks korda (joonis 16). A77636 käitus [ $^3\text{H}$ ]SCH23390 väljatõrjumisel kõrge afiinsusega agonistina ( $K_i = 0,7$  nM), mille seostumist iseloomustas Hilli koefitsient 0,60 $\pm$ 0,06. A77636 afiinsus GTP $\gamma$ S toimel vähenes samuti kaks korda, ilma et oleks täheldatud olulist muutust kõrge afiinsusega agonisti siduvas retseptori fraktsioonis (joonis 17).

A77636 ja DHX seostuvad nii dopamiini  $D_1$  kui  $D_2$  retseptoritele, omades suuremat afiinsust  $D_1\text{R}$  suhtes (A77636 koguni 150 korda  $D_1\text{R}$  selektiivsem, DHX vähem selektiivne). Ravimpreparaatidena kasutamisel on antud ühendite korral takistuseks farmakokineetilised piirangud (DHX) ja käitumusliku tolerantsi teke (A77636) [16,64], mille põhjused on käesoleval hetkel veel ebaselged. AC aktiveerimise efektiivsusest sarnanevad DHX ja A77636 dopamiinile [56].

SKF38393 efektiivsus adenülaadi tsüklaasi aktiveerimisel *in vitro* on 45-70% dopamiini efektiivsusest [56] või isegi madalam [65]. Meie töögrupis aga SKF38393-ga AC aktivatsiooni roti juttkeha membraanides näidata ei õnnestunud, samas kui  $D_1\text{R}$  täisagonistid (DHX ja A77636) [56], aktiveerisid AC isegi kõrgemale DA aktivatsiooni tasemest (Argo Vonk'i avaldamata andmed). Antud töös saadi [ $^3\text{H}$ ]SCH23390 väljatõrjumisel  $D_1\text{R}$  agonistidega roti aju juttkeha membraanides suhteliselt hästi adenülaadi tsüklaasi aktivatsiooniga ehk agonistide efektiivsuse mõõduga korreleeruvad tulemused, mis viitab taaskord sellele, et

täisagonistidel on suurem võime luua (või avastada) retseptor-G valk seoseid, mis on määravaks signaaliülekandel.

## KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti adenosini  $A_1$  ja dopamiini  $D_1$  retseptoritevahelist interaktsiooni Sf9 rakkudes, kus retseptorid olid koekspressiooniga koos neile vastavate G valkudega ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$  ja  $G\beta\gamma$ ). Adenosini  $A_1$  retseptori aktivatsiooni mõju dopamiini  $D_1$  retseptori sidumisomadustele Sf9 rakumembraanides paraku näidata ei õnnestunud, vastupidiselt varem avaldatud andmetele ajukoe ja fibroblasti rakkudega [1,2,3]. Seevastu ilmnes  $A_1R$  agonisti toime teiseste virgatsainete tasandil  $D_1R$  aktiveeritud cAMP akumulatsiooni vähenemises, sealjuures näidati, et  $A_1R$ -i poolseks modulatsiooniks on vajalik  $G_i$  valkude ekspressioon [57].

Dopamiini  $D_1$  retseptori sidumisomadusi Sf9 rakumembraanides võrreldi roti aju juttkeha  $D_1R$  sidumisomadustega. Kokkuvõtvalt võib öelda, et suhteliselt selgelt eristusid antud süsteemides täis- ja osalised agonistid, mis avaldus erinevuses kõrge afiinsusega agoniste siduvas retseptorite fraktsioonis. Samuti võib öelda, et G valkudega seotud retseptorite osakaal roti aju juttkehas oli märgatavalt kõrgem kui Sf9 rakumembraanides. Sf9 rakumembraanides avastatud butaklomooli anomaalne seostumine, mis avaldus varem avaldatud andmetest ~2 suurusjärku madalama afiinsuse näol leidis kinnitust ka roti aju juttkeha membraanides. Butaklomooli anomaalia seisnes ka erakordselt kõrges Hilli koefitsiendi väärtuses, mis Sf9 rakumembraanides oli >2, viidates sidumise positiivsele kooperatiivsusele. Teiseste virgatsainete tasandil butaklomooli eripära aga ei ilmnenu (Argo Vonk'i avaldamata andmed).

## SUMMARY

Adenosine A<sub>1</sub> and dopamine D<sub>1</sub> receptor-receptor interaction in Sf9 cells coexpressed with their respective G proteins (G $\alpha_s$ , G $\alpha_i$  ja G $\beta\gamma$ ) was studied. Activation of A<sub>1</sub> receptor had no influence on dopamine D<sub>1</sub> receptor binding properties, on the contrary to the previous findings where brain tissues and fibroblast cells had been used [1,2,3]. Nonetheless, the effect of A<sub>1</sub>R activation appeared on the second messenger level by inhibition of dopamine D<sub>1</sub> receptor activated cAMP accumulation, whereby expression of G<sub>i</sub> proteins was necessary for the A<sub>1</sub>R modulation [57].

Additionally, dopamine D<sub>1</sub> receptor binding properties in Sf9 cell membranes was compared with its properties in rat striatum. In brief, on the basis of high affinity agonist binding fraction of receptors quite clear distinction can be made between full and partial D<sub>1</sub>R agonists in both systems used. In striatum, however, the fraction of receptors bound to G proteins was significantly higher than in Sf9 cell membranes. Considerably low affinity binding of butaclamol, approximately 2 orders of magnitude lower than stated previously, was seen both in rat striatum and Sf9 cell membranes. An extremely high Hill coefficient, with a value above 2 in Sf9 cell membranes, refers to a positive cooperativity in butaclamol binding. Though, abnormal properties of butaclamol was not seen on the level of second messengers (Argo Vonk's unpublished data).

## *Tänuavaldused*

Suurim tänu kuulub Ajukeemiale, mis andis põhjuse töö alustamiseks ja mis kriitilistel hetkedel aitas selle ka lõpule viia.

Samavõrd olulised on olnud ka nii töögrupi kui õppetooli sisesed „motivatsiooniüritused” – sügisesed müttamised ja kevadised väliseminarid ning nendega seotud inimesed, paigad ja loodusolud.

Eraldi tänan oma juhendajat, professor Ago Rinkenit tema vastutulelikkuses, ja kes ikka ja jälle oskab näha positiivset ka negatiivsetes tulemustes ja suudab seda usku ka teistesse süstida; Gerdat, tänu kellele üldse „ajukeemikute” juurde sattusin; Askot, kes lihtsalt vahetevahel koridori peal varrukast kinni haarab; Railit, kes alati oma Volvoga meie kõikvõimalikke ideid aitab ellu rakendada; Aini, kes on „alati valmis!” (ka lauda katma); ja Laurat, kes on meie labori hing.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- 1 **Franco, R.** et al., Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization, *Neuropsychopharmacology*, **2000**, 23, S50-9.
- 2 **Ferré, S.** et al., Adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine D1 receptors in stably cotransfected fibroblast cells, *The Journal of Biological Chemistry*, **1998**, 273, 4718-4724.
- 3 **Ferré, S.** et al., Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia, *Trends in Neuroscience*, **1997**, 20, 482-487.
- 4 **Ohtani, N.** et al., Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence, *The Journal of Neuroscience*, **2003**, 23(7), 2840-2850.
- 5 **Bergson, C.** et al., Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca<sup>2+</sup> connection in dopamine signalling, *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **2003**, 24, 486-492.
- 6 **Jackson, A.** et al., Opposing effects of phorbol-12-myristate-13-acetate, an activator of protein kinase C, on the signalling of structurally related human dopamine D1 and D5 receptors, *Journal of Neurochemistry*, **2005**, 95, 1387-1400.
- 7 **Cooper, J.R.**, Bloom, F.E, Roth, R.H., The Biochemical Basis of Neuropharmacology 7<sup>th</sup> ed., *Oxford University Press*, **1996**, 293-351.
- 8 **Agnati, L.F.** et al. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons, *Pharmacological Reviews*, **2003**, 55, 509-550.
- 9 **Franco, R.** et al., Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors, *Trends in Biochemical Sciences*, **2005**, 30, 360-366.
- 10 **Reader, T.A.**, et al., Dopamine D1 receptors labelled with [3H]SCH23390 in rabbit cerebral cortex and neostriatum, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **1989**, 340, 617-625.
- 11 **Missale, C.** et al., Dopamine Receptors: From Structure to Function *Physiological Reviews*, **1998**, 78, 1, 189-225.



- 12 Tumova, K.** et al., Role of the fourth intracellular loop of D1-like dopaminergic receptors in conferring subtype-specific signaling properties, *FEBS letters*, **2004**, 576(3),461-467.
- 13 Nickolls, S.A.**, The influence of G protein subtype on agonist action at D2 dopamine receptors, *Neuropharmacology*, **2004**, 47, 860-872.
- 14 Jin, X.H.** et al., Comparison of the characteristics and density of dopamine-1 receptors in membranes from different arteries using [<sup>3</sup>H]SCH23390 binding, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, **1995**, 17, 455-461.
- 15 Strange, P. G.**, Dopamine receptors, *Tocris Reviews*, **2000**, 15.
- 16 Saklayen, S.S.** et al., Negative feedback regulation of nigrostriatal dopamine release: mediation by striatal D1 receptors, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **2004**, 311(1), 342-348.
- 17** <http://www.eau.ee/~anat/nervus.pdf> (seisuga 15.05.06)
- 18 Rosa-Neto, P.** et al., Gradients of dopamine D1- and D2/3-binding sites in the basal ganglia of pig and monkey measured by PET, *Neuroimage*, **2004**, 22(3), 1076-1083.
- 19** <http://www.ut.ee/KK/spfysio/kesknarvisysteem.html> (seisuga 15.05.06)
- 20 Landry, Y.** et al., Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signalling, *Current Medicinal Chemistry*, **2006**, 13(1), 51-63.
- 21 Cabrera-Vera, T.M.** et al., Insights into G protein structure, function, and regulation, *Endocrine reviews*, **2003**, 24(6), 765-781.
- 22 Li, D.**, Roberts, R., WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases, *Cellular and molecular life sciences*, **2001**, 58(14), 2085-2097.
- 23 Lachance, M.** et al., Stable association of G proteins with  $\beta_2$ AR is independent of the state of receptor activation, *Cellular Signalling*, **1999**, 11, 523-533.
- 24 Shenoy, S.K.**, Lefkowitz, R.J., Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling, *The Biochemical journal*, **2003**, 375, 503-515.

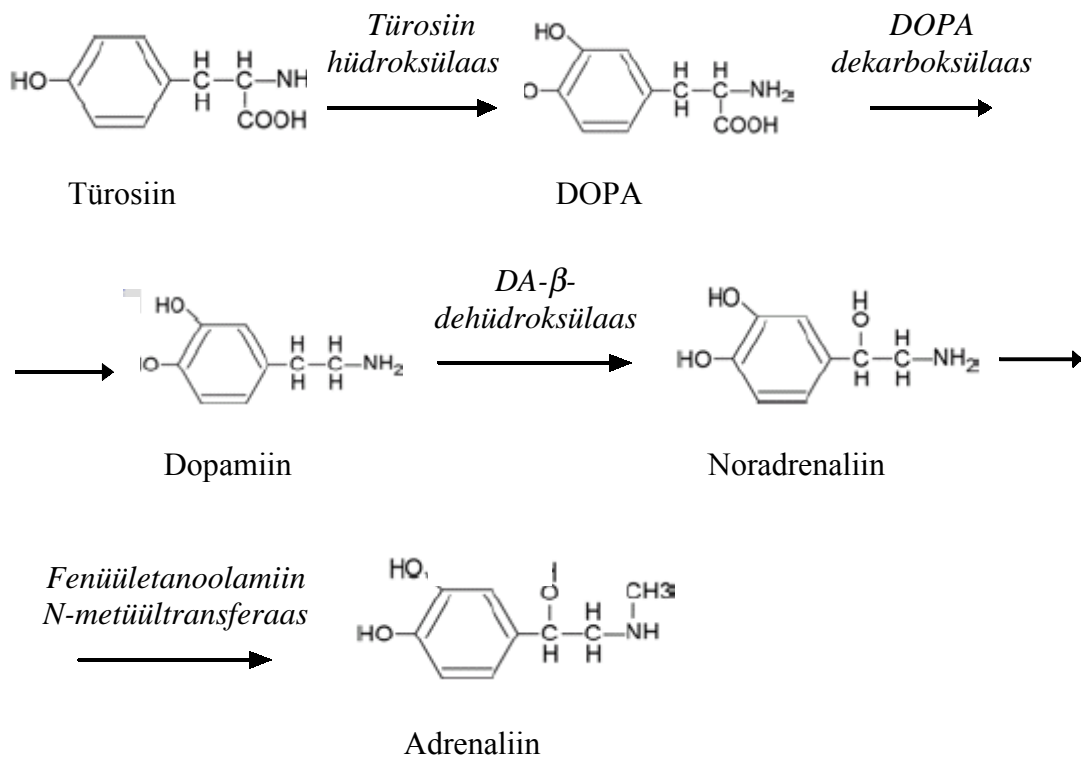
- 25 Kim, O.J.** et al., The role of phosphorylation in D1 dopamine receptor desensitization: evidence for a novel mechanism of arrestin association, *The Journal of biological chemistry*, **2004**, 279(9), 7999-8010.
- 26 Zhuang, X.** et al., G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling, *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **2000**, 20(16), RC91.
- 27 Corvol, J.C.** et al., Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease, *The Journal of neuroscience*, **2004**, 24(31), 7007-7014.
- 28 George, S.R.** et al., G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery, *Nature Reviews. Drug Discovery*, **2002**, 808-820.
- 29 Devi, L.A.**, Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signalling and trafficking, *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **2001**, 22, 532-537.
- 30 Gomes, I.** et al., G protein coupled receptor dimerization. Implications in modulating receptor function, *Journal of molecular medicine*, **2001**, 79, 226-242.
- 31 Franco, R.**, et al., THE "TWO-STATE DIMER RECEPTOR MODEL". A GENERAL MODEL FOR RECEPTOR DIMERS, *Molecular pharmacology*, **2006**, [Epub ahead of print]
- 32 Maggi, A.** et al., Beta-Adrenergic regulation of alpha 2-adrenergic receptors in the central nervous system, *Science*, **1980**, 207(4431), 645-647.
- 33 Fuxe, K.** et al., Modulation by cholecystokinins of 3H-spiroperidol binding in rat striatum: evidence for increased affinity and reduction in the number of binding sites, *Acta physiologica Scandinavica*, **1981**, 113(4), 567-569.
- 34 Rocheville, M.** et al., Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity, *Science*, **2000**, 288(5463), 154-157.
- 35 Gines, S.** et al., Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2000**, 97(15), 8606-8611.
- 36 Fiorentini, C.**, Missale, C., Oligomeric assembly of dopamine D1 and glutamate NMDA receptors: molecular mechanisms and functional implications, *Biochemical Society transactions*, **2004**, 32,1025-1028.

- 37 Salter, M.W.**, D1 and NMDA receptors hook up: expanding on an emerging theme, *Trends in neurosciences*, **2003**, 26(5), 235-237.
- 38 Torvinen, M.** et al., Interactions among adenosine deaminase, adenosine A(1) receptors and dopamine D(1) receptors in stably cotransfected fibroblast cells and neurons, *Neuroscience*, **2002**, 709-719.
- 39 Sun, W.** et al., Modulating effect of adenosine deaminase on function of adenosine A<sub>1</sub> receptors, *Acta Pharmacologica Sinica*, **2005**, 26, 160-165.
- 40 Andersen, B.**, Stevens R. C., The Human D1A Dopamine Receptor: Heterologous Expression in *Saccharomyces cerevisiae* and Purification of the Functional Receptor, *Protein Expression and Purification*, **1998**, 13, 111–119.
- 41 Marjamäki, A.**, Similar ligand binding in recombinant human azC2-adrenoceptors produced in mammalian, insect and yeast cells, *European Journal of Pharmacology*, **1994**, 267, 117-121.
- 42 Massotte, D.**, G protein-coupled receptor overexpression with the baculovirus insect cell system: a tool for structural and functional studies, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, **2003**, 1610, 77-89.
- 43 Knight, P.J.K** et al., A functional assay for G-protein-coupled receptors using stably transformed insect tissue culture cell lines, *Analytical Biochemistry*, **2003**, 320, 88-103.
- 44 Gille A.**, Co-expression of the  $\beta$ 2-adrenoceptor and dopamine D1-receptor with G<sub>s $\alpha$</sub>  proteins in Sf9 insect cells: limitations in comparison with fusion proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2003**, 1613, 101– 114
- 45 Näsman, J.** et al., Dual signalling by different octopamine receptors converges on adenylate cyclase in Sf9 cells, *Insect biochemistry and molecular biology*, **2002**, 32(3), 285-293.
- 46 Hollis, C.M.** et al., Binding of [<sup>3</sup>H]SCH23390 to a non-dopaminergic site in bovine kidney, *Biochemical Pharmacology*, **1992**, 43, 9, 1947-1955.
- 47 Cheng, Y.C.** And Prusoff W.H., Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction, *Biochemical Pharmacology*, **1973**, 22, 3099-3108.
- 48 Martin, M.W.**, Typical antipsychotics exhibit inverse agonist activity at rat dopamine D1-like receptors expressed in Sf9 cells, *European Journal of Pharmacology*, **2001**, 420(2-3), 73-82.

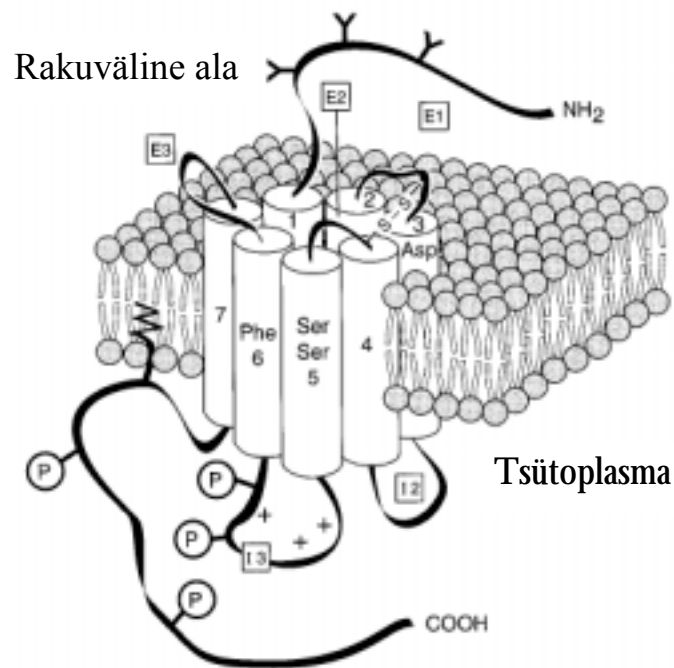
- 49 He, Y.** et al., Expression of dopamine D1 receptor in Sf9 insect cells and agonism of 1-12-chloroscoulerine on recombinant D1 receptor, *Acta Pharmacologica Sinica*, **2003**, 24, 225-229.
- 50 Uustare, A.** et al., Characterization of M2 muscarinic receptor activation of different G protein subtypes, *Neurochemistry international*, **2004**, 44(2),119-124.
- 51 Billard, W.** et al., Characterization of the binding of <sup>3</sup>H-SCH 23390, a selective D-1 receptor antagonist ligand, in rat striatum, *Life Sciences*, **1984**, 35, 1885-1893.
- 52 Kilpatrick, G.J.** et al., [<sup>3</sup>H]SCH 23390 identifies D-1 binding sites in rat striatum and other brain areas, *J. Pharm.Pharmacol.*, **1986**, 38, 907-912.
- 53 Motulsky H.,** Christopoulos, A., Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression. A practical guide to curve fitting, *GraphPad Software*, **2003**.
- 54 Järv, J.** et al., Isomerization of the muscarinic receptor\*antagonist complex. *Journal of Biological Chemistry*, **1979**, 254, 5595-5598.
- 55 Lepiku, M.** et al, Kinetic evidence for isomerization of the dopamine receptor-raclopride complex. *Neurochemistry International*, **1996**, 28, 5/6, 591-595.
- 56 Ruskin, D.N.** et al., Effects of full D1 dopamine receptor agonists on firing rates in the globus pallidus and substantia nigra pars compacta in vivo: tests for D1 receptor selectivity and comparisons to the partial agonist SKF 38393, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **1998**, 286, 272-281.
- 57 Uustare, A.,** Reinart, R., Rincken, A., Modulation of dopamine D1receptor signalling by adenosine A1 receptors in Sf9 cells require expression of Gi proteins, Manuscript for *Neuroscience Letters* (under review).
- 58 Andersen, P.H.** et al. A comparison between dopamine-stimulated adenylate cyclase and 3H-SCH 23390 binding in rat striatum, *Life Sciences*, **1985**, 37, 1971-1983.
- 59 Reader, T. A., et al.**, Specific [<sup>3</sup>H]SCH23390 binding to dopamine D1 receptors in cerebral cortex and neostriatum: Evidence for heterogeneities in affinity states and cortical distribution, *Journal of Neurochemistry*, **1988**, 50, 451-463.

- 60 Andersen, P.H.** et al., Dopamine receptor agonists: selectivity and dopamine D<sub>1</sub> receptor efficacy, *European Journal of Pharmacology- Molecular Pharmacology Section*, **1990**, 335-347.
- 61 Farrell, C.B.**, O'Boyle, K.M., The kinetics of [<sup>3</sup>H]SCH23390 dissociation from rat striatal dopamine D<sub>1</sub> receptors: effect of dopamine, *European Journal of Pharmacology - Molecular Pharmacology Section*, **1994**, 268, 79-88.
- 62 Mottola, D.M.**, et al, Functional Selectivity of Dopamine Receptor Agonists. I. Selective Activation of Postsynaptic Dopamine D<sub>2</sub> Receptors Linked to Adenylate Cyclase, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **2002**, 301(3), 1166-1178
- 63 Gili-Martin, E.** et al., Effects of chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal on [3H]SCH23390 binding to rat striatal membranes, *Neuropharmacology*, **1997**, 36(1),101-106.
- 64 Gulwadi, A.G.** et al., Dinapsoline: characterization of a D<sub>1</sub> dopamine receptor agonist in a rat model of Parkinson's disease, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **2001**, 296, 338-344.
- 65 Lewis, M.**, et al., Homologous desensitization of the D<sub>1A</sub> dopamine receptor: efficacy in causing desensitization dissociates from both receptor occupancy and functional potency, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **1998**, 286(1), 345-353.

## **LISAD**



**Joonis 1.** Dopamiini ja adrenaliini sünteesiskeem



**Joonis 2.** DA retseptori struktuur. Näidatud on D<sub>1</sub>-retseptori struktuuri-  
 elemendid. D<sub>2</sub>-tüüpi retseptoritel on lühem COOH-terminaliga ahel ja pikem  
 kolmas rakusisene (I3) aas. Dopamiini sidumisega seotud aminohappejäägid on  
 märgitud membraani läbivatel (TM) domeenidel. Kolmanda rakusisese aasa (I3) ja  
 COOH-terminali peal on märgitud tõenäolised fosforüleerimispiirkonnad. NH<sub>2</sub>  
 terminalil on märgitud võimalikud glükosüleerimise kohad. E1-E3: rakuvälised  
 aasad; 1-7: transmembraansed (TM) domeenid; I2-I3: rakusisesed aasad [11].



**Table 1.** G $\alpha$ -alatüüpide klassifikatsioon ja nende vastavad efektorid

Perekond	Alatüüp	Efektor
G <sub>s</sub>	G $\alpha_{s(S)}$ G $\alpha_{s(L)}$ G $\alpha_{olf}$	↑ AC ↑ tubuliini GTPaas ↑ src ↑ AC
G <sub>i</sub>	G $\alpha_{i1}$ G $\alpha_{i2}$ G $\alpha_{i3}$ G $\alpha_{oA}$ G $\alpha_{oB}$ G $\alpha_z$ G $\alpha_{t1}$ G $\alpha_{t2}$ G $\alpha_g$	↓ AC Rap 1 GAP GRIN 1 ja 2 ↑ tubuliini GTPaas ↑ src Ca <sup>2+</sup> ja K <sup>+</sup> kanalid ↑ cGMP-PDE Teadmata
G <sub>q</sub>	G $\alpha_q$ G $\alpha_{11}$ G $\alpha_{14}$ G $\alpha_{15}$ või 16	↑ PLC $\beta$ ↑ Bruton'i türosiini kinaas (G $\alpha_q$ )
G <sub>12</sub>	G $\alpha_{12}$ G $\alpha_{13}$	↑ NHE-1 ↑ PLD ↑ p115RhoGEF ↑ iNOS

PDE - fosfodiesteras A; iNOS – indutseeritav lämmastikoksiidi süntaas; NHE – Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> vahetusfaktor; PLD – fosfolipaa D; GEF – guaniini nukleotiidi vahetusfaktor [21].

**Tabel 2.** Gβγ dimeeride poolt reguleeritavad efektorid

Efektor	Regulatsioon
PLCβ	↑
AC I	↓
AC II, IV ja VII	↑
K <sup>+</sup> kanalid (GIRK <sub>1, 2, 4</sub> )	↑
Ca <sup>2+</sup> kanalid	↓
G valk seotud retseptori kinaas	Membraani juurde sidumine( <i>recruitment</i> )
PI <sub>3</sub> kinaas	↑
Bruton'i türosiini kinaas	↑
Tsk türosiini kinaas	↑
Proteiinkinaas D	↑
Kalmoduliin	Kalmoduliin kinaas ↓
Tubuliin	GTPaasne aktiivsus ↑
Dünamiin I	GTPaasne aktiivsus ↑
Shc fosforüleerimine	MAPK kaudne akitvatsioon
Raf-1 proteiinkinaas	Gβγ sekvestreerimine
Ras vahetusfaktor	MAPK kaudne akitvatsioon
KSR-1	Gβγ sekvestreerimine

↑ - stimuleerimine, ↓ - inhibeerimine [21].

**Tabel 3.** Homo- ja heteromeere moodustavad G-valk-seotud retseptorid

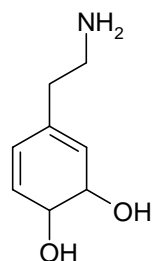
Homomeersed retseptorid	Heteromeersed retseptorid
$\beta_2$ -adrenergiline	$\beta_2$ - $\alpha_2$ adrenergilised
$\alpha_2$ -adrenergiline	$\beta_2$ -adrenergiline- $\delta$ -opioidne
Adenosiini A <sub>1</sub>	$\beta_2$ -adrenergiline- $\kappa$ -opioidne
Dopamiini D <sub>1, 2, 3</sub>	Adenosiini A <sub>1</sub> - mGlu <sub>1</sub>
M <sub>2, 3</sub> muskariinne ACh	Adenosiini A <sub>1</sub> - dopamiini D <sub>1</sub>
Histamiini H <sub>2, 4</sub>	Adenosiini A <sub>1</sub> - purinergiline P2Y <sub>1</sub>
Serotoniini 5-HT <sub>1B, 1D</sub>	Adenosiini A <sub>2</sub> - dopamiini D <sub>2</sub>
Metabotropne glutamaadi mGlu <sub>1, 5</sub>	Dopamiini D <sub>2</sub> - D <sub>3</sub>
Meltoniini MT <sub>1, 2</sub>	Dopamiini D <sub>2</sub> - somatostatiini SST <sub>1C</sub>
Opioidne $\mu$ -, $\delta$ -, $\kappa$ -	Dopamiini D <sub>2</sub> - somatostatiini SSTR <sub>1B</sub>
Angiotensiini II AT <sub>1</sub>	$\alpha_{2c}$ adrenergiline- M <sub>3</sub> muskariinne ACh
Vasopressini V <sub>2</sub>	M <sub>2</sub> - M <sub>3</sub> muskariinne ACh
Bradükiniini B <sub>2</sub>	Serotoniini 5-HT <sub>1B</sub> -5-HT <sub>1D</sub>
Somatostatiini SSTR <sub>1A, 1B, 1C, 2A</sub>	Meltoniini MT <sub>1</sub> -MT <sub>2</sub>
Gonadotropiini vabastava hormooni r.	$\delta$ - ja $\kappa$ -opioidsed
Türotropiini	$\mu$ - ja $\delta$ -opioidsed
Ig-Hepta	Kemokiini CCR2-CCR5
GABA <sub>B1</sub> , GABA <sub>B2</sub>	Angiotensiini AT <sub>1</sub> -AT <sub>2</sub>
Kemokiini CCR <sub>2, 5</sub> , CXCR <sub>4</sub>	Angiotensiini AT <sub>1</sub> -bradükiniini B <sub>2</sub>
Ca <sup>2+</sup> -tundlik r.	Somatostatiini SSTR <sub>2A</sub> -SSTR <sub>1B</sub>
Vereliistakuid aktiveeriva faktori r.	Somatostatiini SSTR <sub>1A</sub> -SSTR <sub>1C</sub>
	Somatostatiini SSTR <sub>1A</sub> - $\mu$ -opioidne
	GABA <sub>B1</sub> -GABA <sub>B2</sub>
	Kemokiini CCR <sub>2</sub> -CCR <sub>5</sub>
	Koletsüstokiniini-dopamiini

[28,29,30]

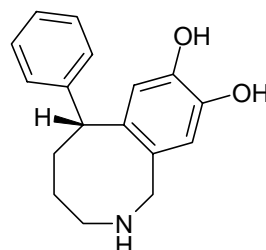
### **Joonis 3.** Töös kasutatud ligandid

#### *Dopamiini D<sub>1</sub> retseptori agonistid:*

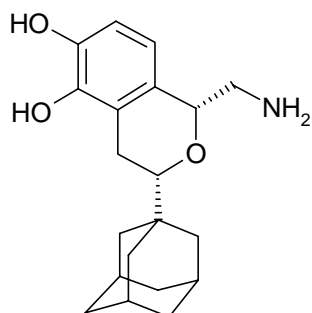
**Dopamiin**



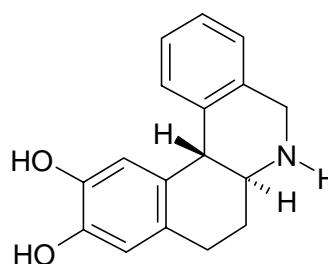
**SKF 38393**



**A 77636**

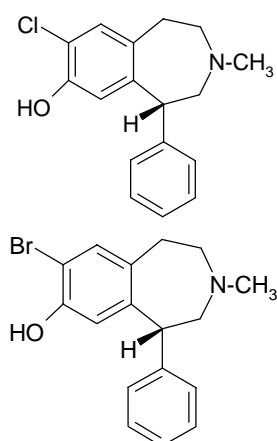


**DHX**

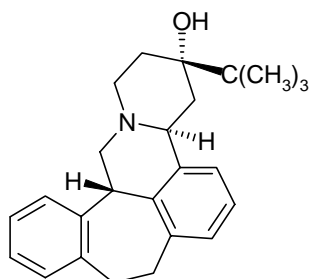


#### *Dopamiini D<sub>1</sub> retseptori antagonistid:*

**SCH 23390**



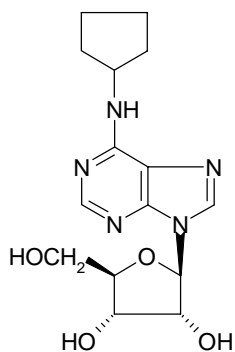
**Butaklomool**



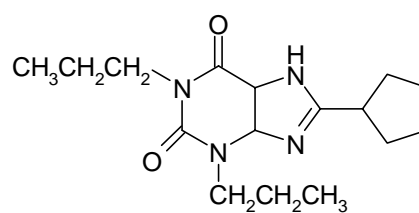
**SKF 83566**

Adenosiini A<sub>1</sub> retseptori ligandid:

**N-CPA**

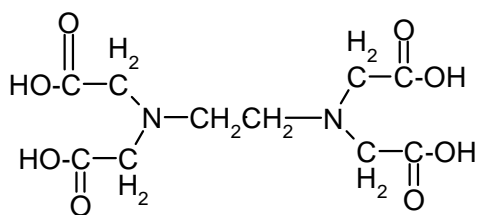


**DPCPX**

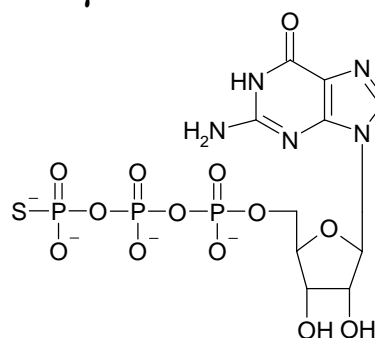


Teisi töös kasutatud ühendeid:

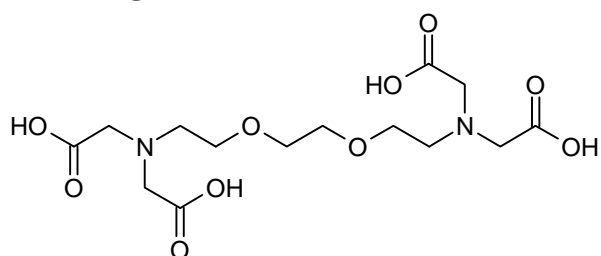
**EDTA**



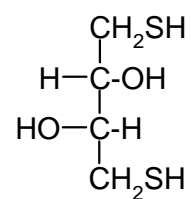
**GTPγS**



**EGTA**



**DTT**



Tabel 4 [<sup>3</sup>H]SCH 23390 konkureeriv väljatõrjumine DA D<sub>1</sub> retseptori ligandidega Sf9 rakumembraanides

<i>Ligand</i>	pIC50 (n <sub>H</sub> ) <sup>g</sup>	K <sub>i</sub> , nM	K <sub>H</sub> /K <sub>L</sub> , nM	R <sub>H</sub> , %	+GTPγS <sup>c</sup>			+N-CPA <sup>d</sup>		
					pIC50 (n <sub>H</sub> ) <sup>g</sup>	K <sub>i</sub> , nM	R <sub>H</sub> , %	pIC50 (n <sub>H</sub> ) <sup>g</sup>	K <sub>i</sub> , nM	R <sub>H</sub> , %
Dopamiin <sup>a</sup>	5,94±0,07 (0,85±0,10)	330	34/560	21±8	5,86±0,07 (1,20±0,21)	400	ET <sup>f</sup>			
<sup>b</sup>	5,35±0,06 (0,77±0,06)	1200	110/2200	23±8	5,22±0,11 (0,84±0,14)	1600	13±4	5,32±0,06 (0,77±0,08)	1300	17±5
								+DPCPX <sup>e</sup>		
SKF38393 <sup>a</sup>	6,22±0,04 (0,78±0,05)	170	6,5/250	17±5	5,96±0,06 (0,83±0,11)	310	ET <sup>f</sup>			
<sup>b</sup>	5,90±0,06 (1,06±0,14)	350	ET <sup>f</sup>	ET <sup>f</sup>	5,78±0,07 (0,96±0,14)	450	ET <sup>f</sup>	5,83±0,08 (1,06±0,19)	400	ET <sup>f</sup>
SCH23390 <sup>a</sup>	8,30±0,08 (0,81±0,11)	1,1								
<sup>b</sup>	8,32±0,09 (0,72±0,06)	1,1								
Butaklomool <sup>a</sup>	6,50±0,09 (2,86±0,54)	180								
<sup>b</sup>	6,07±0,04 (2,23±0,42)	210			6,03±0,07 (2,04±0,69)	240				

<sup>a</sup> D<sub>1</sub>G<sub>s</sub> ekspressiooniga Sf9 rakumembraanid

<sup>b</sup> A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>G<sub>s</sub>G<sub>i</sub> ekspressiooniga Sf9 rakumembraanid

<sup>c, d, e</sup> 100 μM GTPγS, 10 nM N-CPA ja 10 nM DPCPX toime ligandide seostumisele

<sup>f</sup> ET - ei täheldatud: analüüsil sobis kahe sidumiskohaga mudeli asemel paremini ühe sidumiskohaga mudel (F-test P>0,05)

<sup>g</sup> n<sub>H</sub>- Hilli koefitsient

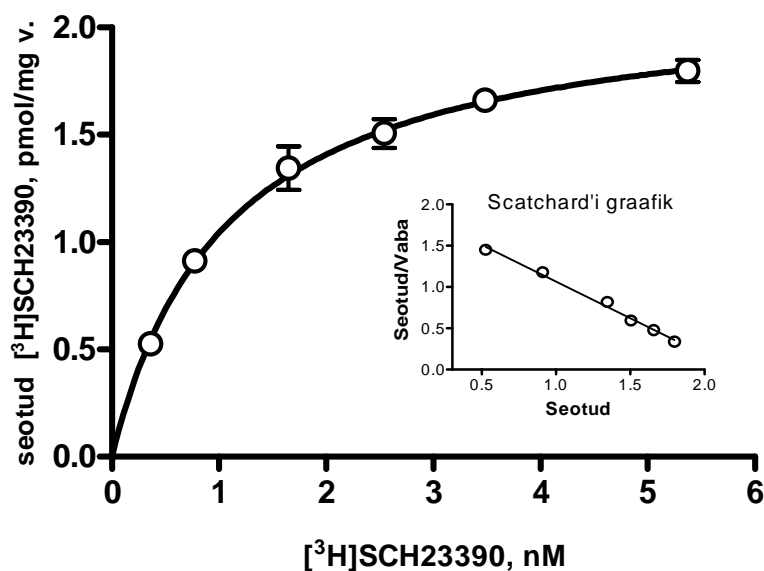
Tabel 5 [<sup>3</sup>H]SCH 23390 konkureeriv väljatõrjumine DA D<sub>1</sub> retseptori ligandidega roti aju juttkeha membraanides

<i>Juttkeha</i>	pIC50 (n <sub>H</sub> ) <sup>b</sup>	K <sub>i</sub> , nM	K <sub>H</sub> /K <sub>L</sub> , nM	R <sub>H</sub> , %	+GTPγS <sup>a</sup>		
					pIC50 (n <sub>H</sub> ) <sup>b</sup>	K <sub>i</sub> , nM	R <sub>H</sub> , %
Dopamiin	5,20±0,10 (0,65±0,09)	2000	640 29 800	65±7	4,34±0,11 (0,63±0,07)	15 000	26±6
SKF38393	6,52±0,08 (0,82±0,11)	97	ET <sup>c</sup>	ET <sup>c</sup>	6,25±0,05 (0,91±0,09)	180	ET <sup>c</sup>
DHX	6,57±0,05 (0,65±0,05)	86	15 410	47±7	6,18±0,05 (0,66±0,05)	210	26±9
A77636	8,61±0,08 (0,60±0,06)	0,7	0,3 7,9	64±5	8,33±0,08 (0,64±0,07)	1,4	53±6
SCH23390	8,80±0,03 (0,98±0,06)	0,5			8,70±0,03 (1,08±0,07)	0,6	
Butaklomool	6,41±0,04 (1,65±0,23)	120			6,44±0,04 (1,21±0,12)	110	
SKF83566	8,37±0,10 (1,00±0,20)	1,4			8,34±0,06 (0,97±0,12)	1,5	

<sup>a</sup> 100 μM GTPγS toime ligandide seostumisele

<sup>b</sup> n<sub>H</sub> – Hilli koefitsient

<sup>c</sup> ET - ei täheldatud: analüüsil sobis kahe sidumiskohaga mudeli asemel paremini ühe sidumiskohaga mudel (F-test P>0,05)

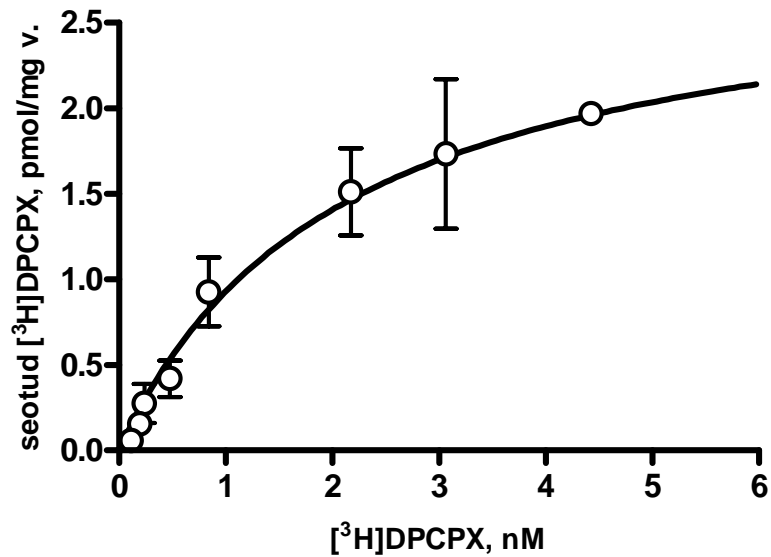


#### **Joonis 4**

**[<sup>3</sup>H]SCH23390 spetsiifiline seostumine D<sub>1</sub> retseptoritele Sf9 rakumembraanides (A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>G<sub>s</sub>G<sub>i</sub>).** Eelnevalt ADA-ga inkubeeritud (5 U/ml, 30 min, 25 °C) membraanid lisati erineva kontsentratsiooniga [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahustele ning inkubeeriti 60 minutit temperatuuril 25 °C sidumispuhvril SP1 (50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA). Mittespetsiifiline seostumine määrati 1 μM SCH23390 juuresolekul.  $K_d=1,1\pm0,1$  nM,  $B_{max}=2,2\pm0,1$  pmol/mg valk.

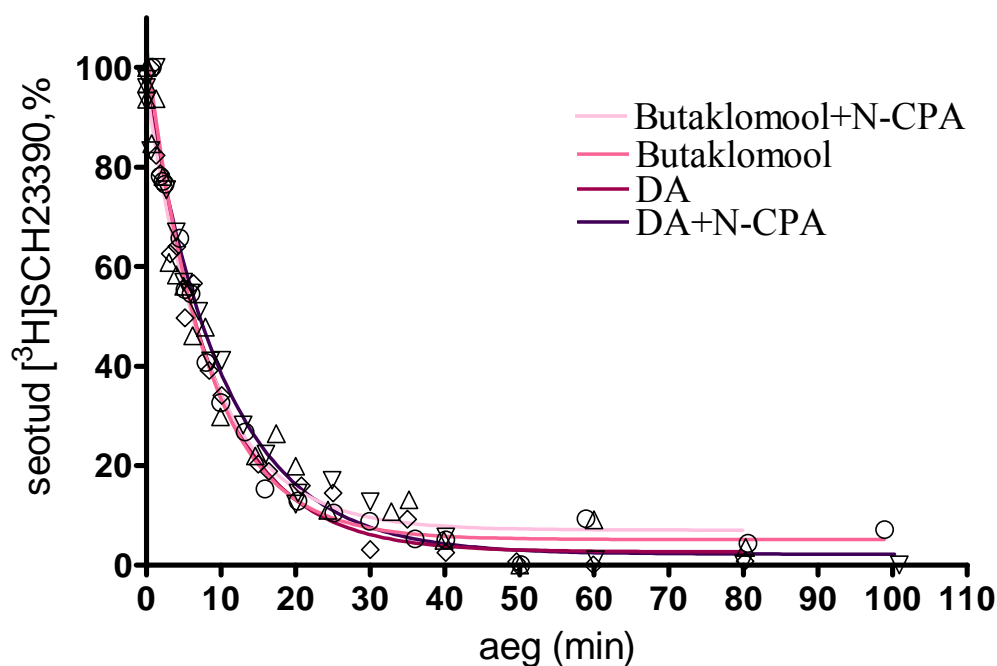
(+10 nM N-CPA:  $K_d=1,2\pm0,2$  nM,  $B_{max}=2,3\pm0,1$  pmol/mg valk.; + 10 nM DPCPX:  $K_d=1,1\pm0,1$  nM,  $B_{max}=2,1\pm0,1$  pmol/mg valk (Graafikul esitamata)).





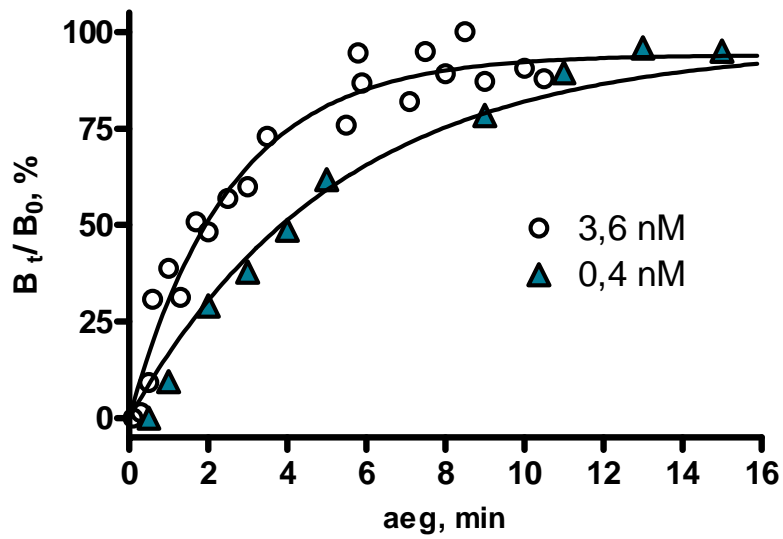
### **Joonis 5**

**[<sup>3</sup>H]DPCPX spetsiifiline seostumine D<sub>1</sub> retseptoritele Sf9 rakumembraanides (A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>G<sub>s</sub>G<sub>i</sub>).** Eelnevalt ADA-ga inkubeeritud (5 U/ml, 30 min, 25 °C) membraanid lisati erineva kontsentratsiooniga [<sup>3</sup>H]DPCPX lahustele ning inkubeeriti 60 minutit temperatuuril 25 °C sidumispuhvril SP1 (50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, + 1 U/ml ADA). Mittespetsiifiline seostumine määrati 1 μM DPCPX juuresolekul. K<sub>d</sub>=2,1±0,8 nM, B<sub>max</sub>=2,9±0,4 pmol/mg valk.



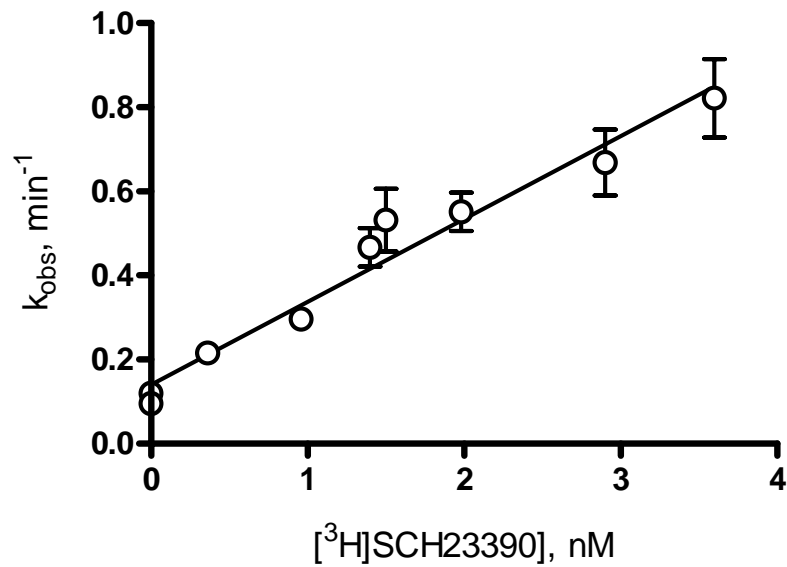
### Joonis 6

**[<sup>3</sup>H]SCH23390 dissotsiatsioonikineetika Sf9 rakumembraanides (A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>G<sub>s</sub>G<sub>i</sub>).** Eelnevalt ADA-ga töödeldud (5 U/ml, 30 min, 25 °C) membraane inkubeeriti sidumispuhvis SP1 [<sup>3</sup>H]SCH23390 juuresolekul (erinevates katsetes konts. 1,7-2,1 nM) 60 minutit temperatuuril 25 °C. A<sub>1</sub>R agonisti sisaldavates katsetes oli radioligandi lahusesse lisatud N-CPA (10 μM). Dissotsiatsiooni algatamiseks lisati ajahetkel t<sub>0</sub> reaktsioonisegusse butaklomool (lõppkonts. 1 μM) või dopamiin (lõppkonts. 1 mM). Sidumispuhver SP1: 50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA + 1 U/ml ADA, + 1 mM DTT (DA sisaldavates katsetes). Dissotsiatsiooni kiiruskonstant k<sub>-1</sub> (min<sup>-1</sup>): 0,12±0,01 (DA); 0,13±0,02 (DA+N-CPA); 0,13±0,01 (But.); 0,13±0,01 (But.+N-CPA). Poolestusaeg τ=5,0±0,7 min. (D<sub>1</sub>G<sub>s</sub>: dissotsiatsioon 1 μM butaklomooliga: k<sub>-1</sub> = 0,11±0,01 min<sup>-1</sup>, τ=6,5±0,7 min (Graafikul esitamata)).



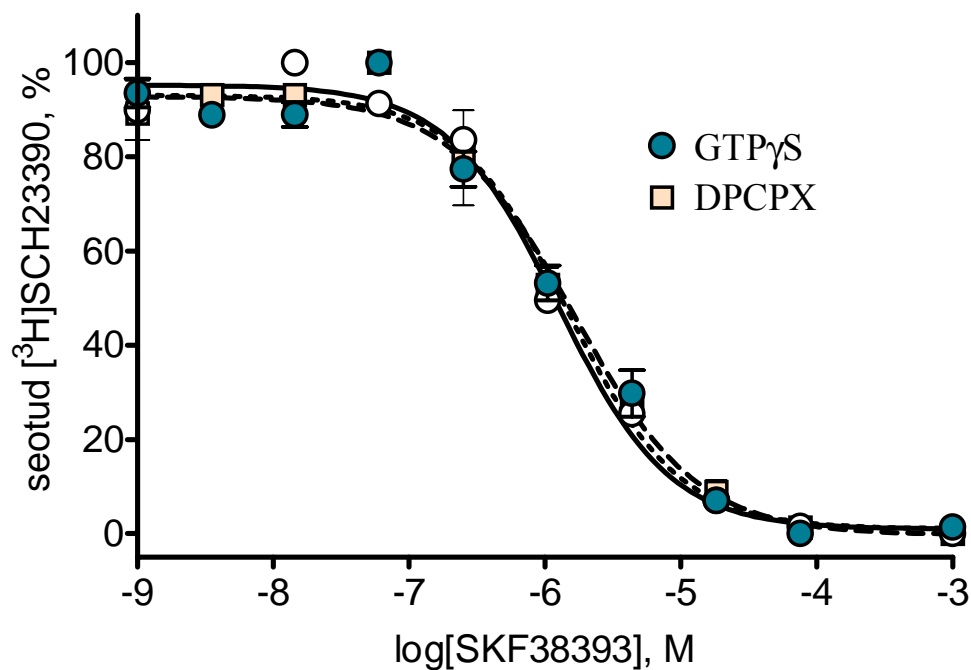
### Joonis 7

[<sup>3</sup>H]SCH23390 spetsiifiline seostumine Sf9 rakumembraanidele (D<sub>1</sub>G<sub>s</sub>). Ajahetkel t<sub>0</sub> lisati membraanilahusele [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahus (lõppkontsentratsiooniga: ▲ 0.4 nM ja ○ 3,6 nM) ning mõõdeti seostunud radioaktiivsus erinevatel ajahetkedel (B<sub>t</sub>). Mittespetsiifiline sidumine määrati eraldi katses 1 μM butaklomooli juuresolekul. Spetsiifilise seostumise saamiseks lahutati üldisest sidumisest mittespetsiifiline sidumine.



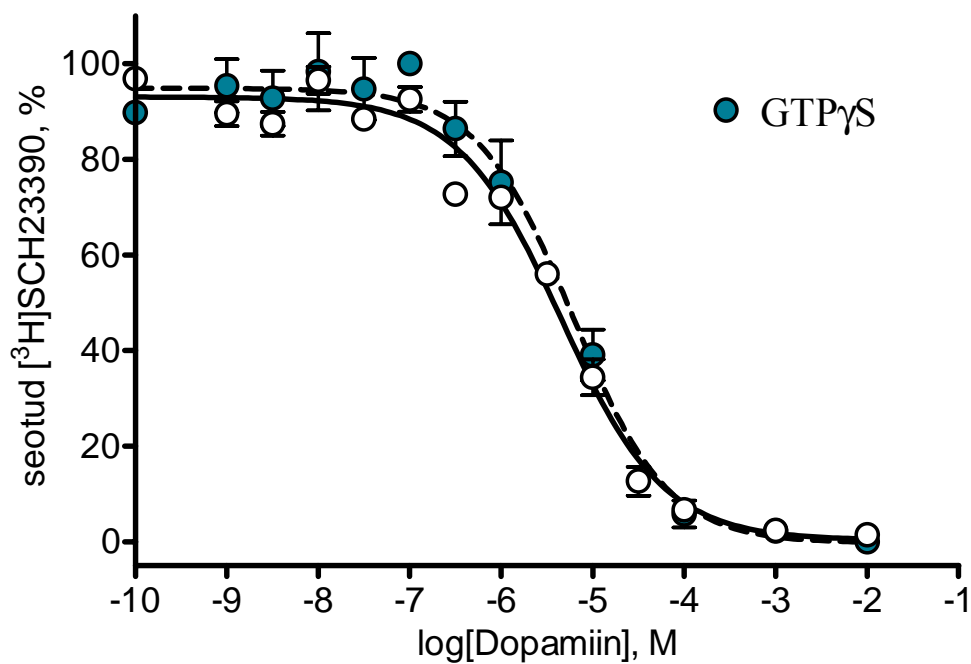
### **Joonis 8**

**[<sup>3</sup>H]SCH23390 seostumise näiva kiiruskonstandi (k<sub>obs</sub>) sõltuvus [<sup>3</sup>H]SCH23390 kontsentratsioonist Sf9 rakumembraanides (D<sub>1</sub>G<sub>s</sub>).** Näiva kiiruskonstandi väärtused (k<sub>obs</sub>) on leitud erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel teostatud assotsiatsioonikineetika andmete lähendamisel võrrandile:  $B = B_{\max} * (1 - e^{-k_{\text{obs}} * t})$ , kus B on seostunud ligand, B<sub>max</sub> - spetsiifiliselt seostunud ligand tasakaalu tingimustes ja t – aeg. Parameetri k<sub>obs</sub> väärtus on esitatud kujul keskmine ±SEM. Sirge lahendamisel saadi *assotsiatsiooni ja dissotsiatsiooni kiiruskonstandid*  $k_{\text{on}} = 0,20 \pm 0,02 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ja  $k_{\text{off}} = 0,14 \pm 0,02 \text{ min}^{-1}$  (k<sub>obs</sub><sup>0</sup>).



### **Joonis 9**

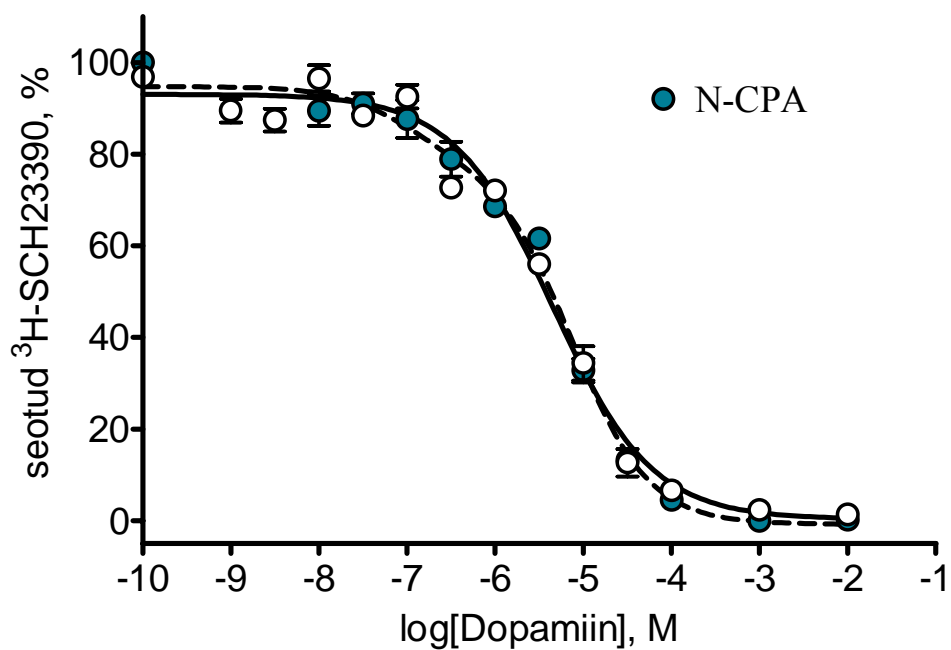
**[<sup>3</sup>H]SCH23390 väljatõrjumine SKF38393-ga Sf9 rakumembraanidest (A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>G<sub>s</sub>G<sub>i</sub>).** Eelnevalt ADA-ga inkubeeritud (5 U/ml, 30 min, 25 °C) membraanid lisati [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahusele (lõppkonts. 2,9 nM), millele oli lisatud erineva kontsentratsiooniga SKF38393 ja GTPγS (lõppkonts. 100 μM), DPCPX (lõppkonts. 10 nM) või puhver SP1 (50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA + 1 U/ml ADA). Inkubeeriti 60 minutit temperatuuril 25 °C. K<sub>i</sub> =350 nM, n<sub>H</sub>=1,06±0,14; +GTPγS: K<sub>i</sub>=400 nM, n<sub>H</sub>=1,06±0,19.



### **Joonis 10**

#### **[<sup>3</sup>H]SCH23390 väljatõrjumine dopamiiniga Sf9 rakumembraanidest (A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>G<sub>s</sub>G<sub>i</sub>).**

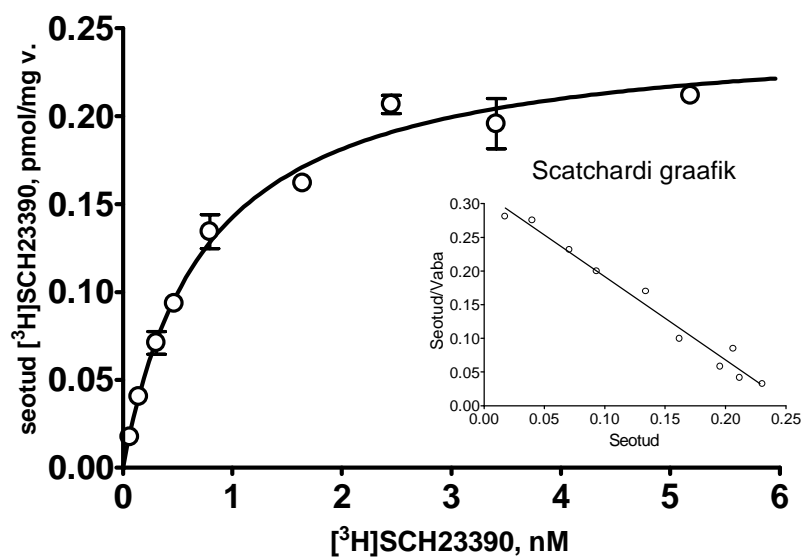
Eelnevalt ADA-ga inkubeeritud (5 U/ml, 30 min, 25 °C) membraanid lisati [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahusele (lõppkonts. 3,0 nM), mis sisaldas erinevatel kontsentratsioonidel dopamiini ja GTPγS (lõppkonts. 100 μM) või puhvrit SP1 (50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA + 1 U/ml ADA, + 1 mM DTT). Inkubeeriti 60 minutit temperatuuril 25 °C. K<sub>i</sub> =1200 nM, n<sub>H</sub>=0,77±0,06; %R<sub>H</sub>= 23±8; +GTPγS: K<sub>i</sub>=1600 nM, n<sub>H</sub>=0,84±0,14; %R<sub>H</sub>=13±4.



### **Joonis 11**

#### **[<sup>3</sup>H]SCH23390 väljatõrjumine dopamiiniga Sf9 rakumembraanidest (A<sub>1</sub>D<sub>1</sub>G<sub>s</sub>G<sub>i</sub>).**

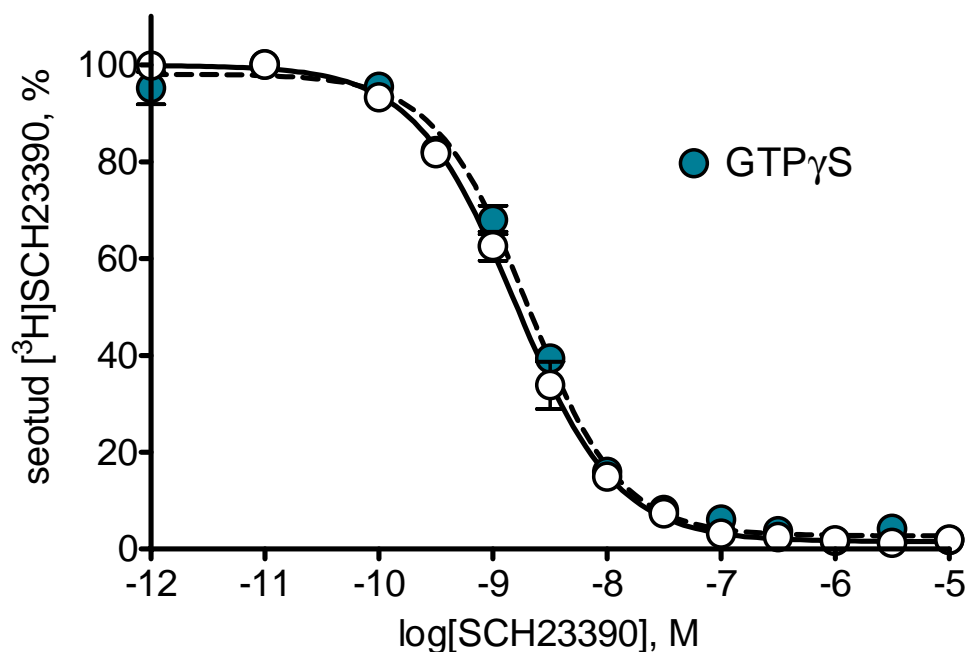
Eelnevalt ADA-ga inkubeeritud (5 U/ml, 30 min, 25 °C) membraanid lisati [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahusele (lõppkonts. 3,0 nM), millele oli lisatud erineva kontsentratsiooniga dopamiini lahused ja N-CPA (lõppkonts. 10 nM) või puhver SP1 (50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA + 1 U/ml ADA, + 1 mM DTT). Inkubeeriti 60 minutit temperatuuril 25 °C. K<sub>i</sub> =1200 nM, n<sub>H</sub>=0,77±0,06; %R<sub>H</sub>= 23±8; +GTPγS: K<sub>i</sub>=1300 nM, n<sub>H</sub>=0,77±0,08; %R<sub>H</sub>=17±5.



## **Joonis 12**

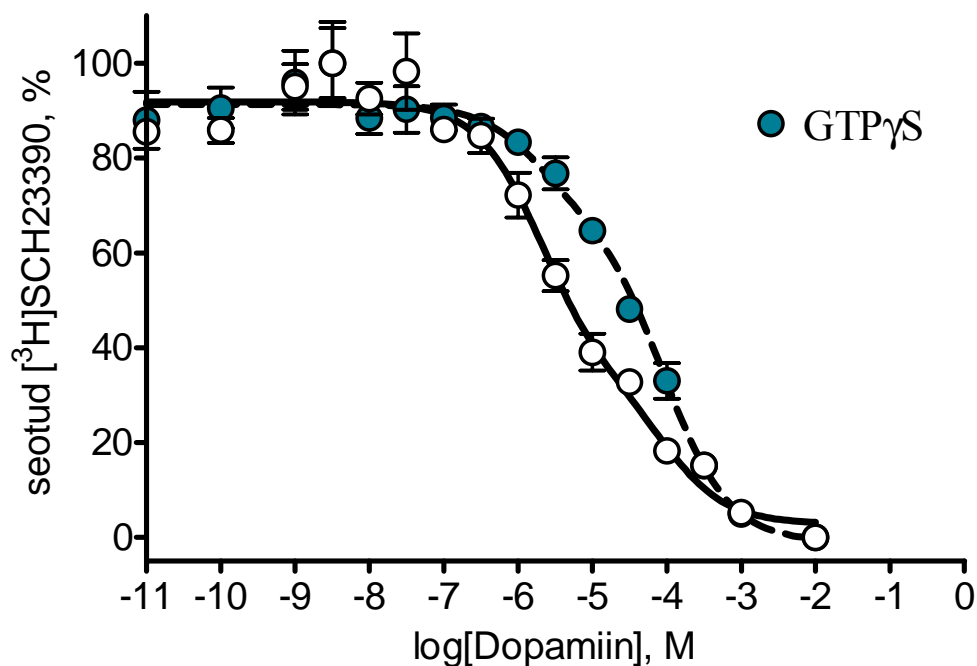
**[<sup>3</sup>H]SCH23390 spetsiifiline seostumine D<sub>1</sub> retseptoritele roti aju juttkeha membraanides.** Membraanid lisati erineva kontsentratsiooniga [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahustele ning inkubeeriti 45 minutit temperatuuril 30 °C sidumispuhvril SP2 (30 mM Tris-HCl (pH=7,4), 100 mM NaCl, 7,5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM EGTA). Mittespetsiifiline seostumine määrati 1 μM SKF83566 juuresolekul.  $K_d=0,8\pm0,1$  nM,  $B_{max}=0,25\pm0,01$  pmol/mg valk.





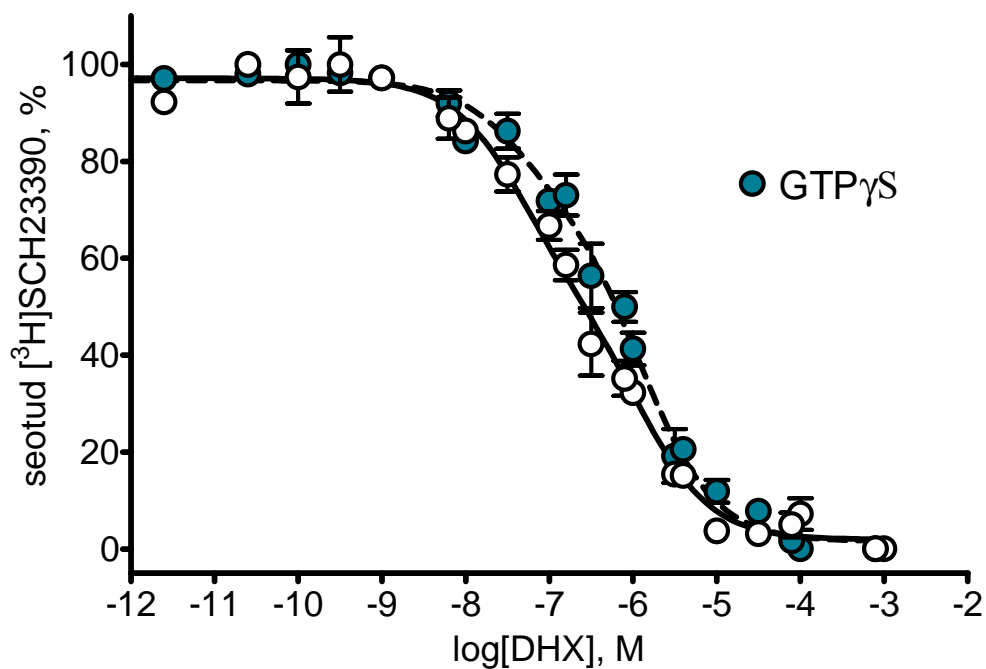
### **Joonis 13**

**[<sup>3</sup>H]SCH23390 väljatõrjumine SCH23390-ga roti aju juttkeha membraanidelt.** Membraanid lisati [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahusele (lõppkonts. 2,1 nM), millele oli lisatud erineva kontsentratsiooniga SCH23390 ja GTP $\gamma$ S (lõppkonts. 100  $\mu$ M) või puhver SP2 (30 mM Tris-HCl (pH=7,4), 100 mM NaCl, 7,5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM EGTA). Inkubeeriti 45 minutit temperatuuril 30 °C.  $K_i=0,5$  nM,  $n_H=0,98\pm0,06$ ; +GTP $\gamma$ S:  $K_i=0,6$  nM,  $n_H=1,08\pm0,07$ .



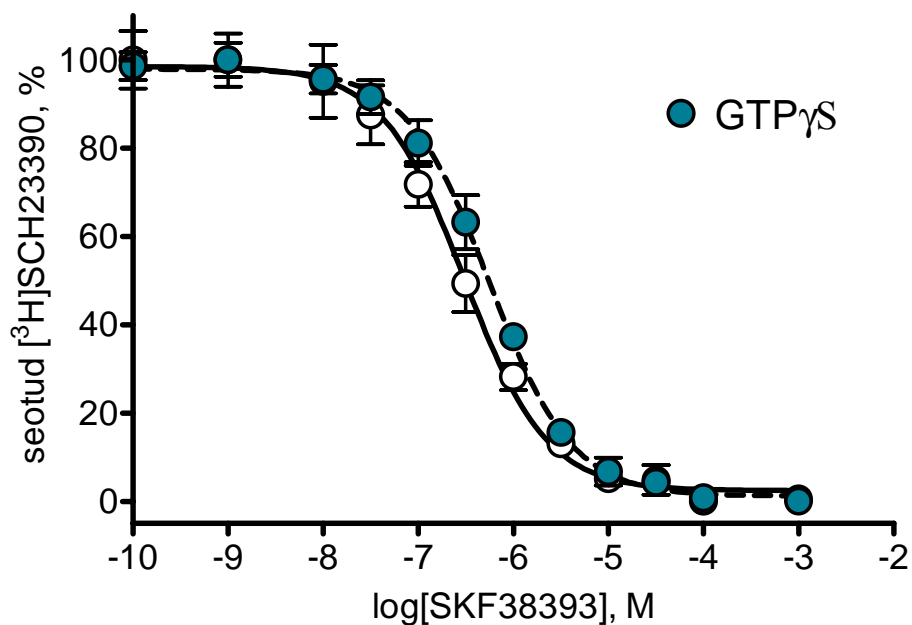
### **Joonis 14**

**[<sup>3</sup>H]SCH23390 väljatõrjumine dopamiiniga roti aju juttkeha membraanidelt.** Membraanpreparaat lisati [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahusele (lõppkonts. 1,7 nM), millele oli lisatud erineva kontsentratsiooniga dopamiin ja GTP $\gamma$ S (lõppkonts. 100  $\mu$ M) või puhver SP2 (30 mM Tris-HCl (pH=7,4), 100 mM NaCl, 7,5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM EGTA + 1 mM DTT). Inkubeeriti 45 minutit temperatuuril 30 °C.  $K_i=2000$  nM,  $n_H=0,65\pm0,09$ ; % $R_H=65\pm7$ ; +GTP $\gamma$ S:  $K_i=15\ 000$  nM,  $n_H=0,63\pm0,07$ ; % $R_H=26\pm6$ .



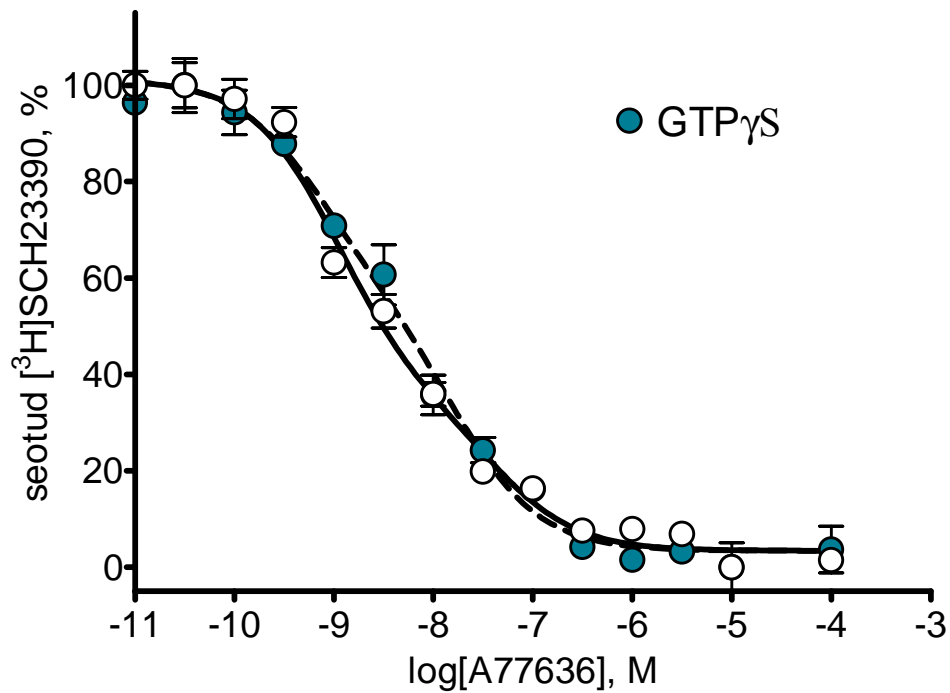
### **Joonis 15**

**[<sup>3</sup>H]SCH23390 väljatõrjumine dihidreksidiiniga roti aju juttkeha membraanidelt.** Membraanpreparaat lisati [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahusele (lõppkonts. 1,7 nM), millele oli lisatud erineva kontsentratsiooniga DHX ja GTP $\gamma$ S (lõppkonts. 100  $\mu$ M) või puhver SP2 (30 mM Tris-HCl (pH=7,4), 100 mM NaCl, 7,5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM EGTA). Inkubeeriti 45 minutit temperatuuril 30 °C.  $K_i$ = 86 nM,  $n_H$ =0,65 $\pm$ 0,05; % $R_H$ =47 $\pm$ 7; +GTP $\gamma$ S:  $K_i$ =210 nM,  $n_H$ =0,66 $\pm$ 0,05; % $R_H$ =26 $\pm$ 9.



### **Joonis 16**

**[<sup>3</sup>H]SCH23390 väljatõrjumine dihidreksidiiniga roti aju juttkeha membraanidest.** Membraanpreparaat lisati [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahusele (lõppkonts. 1,7 nM), millele oli lisatud erineva kontsentratsiooniga SKF38393 ja GTPγS (lõppkonts. 100 μM) või puhver SP2 (30 mM Tris-HCl (pH=7,4), 100 mM NaCl, 7,5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM EGTA). Inkubeeriti 45 minutit temperatuuril 30 °C.  $K_i=97$  nM,  $n_H=0,82\pm0,11$ ; +GTPγS:  $K_i=180$  nM,  $n_H=0,91\pm0,09$ .



### **Joonis 17**

#### **[<sup>3</sup>H]SCH23390 väljatõrjumine A77636-ga roti aju juttkeha membraanidelt.**

Membraanpreparaat lisati [<sup>3</sup>H]SCH23390 lahusele (lõppkonts. 1,9 nM), millele oli lisatud erineva kontsentratsiooniga A77636 ja GTP $\gamma$ S (lõppkonts. 100  $\mu$ M) või puhver SP2 (30 mM Tris-HCl (pH=7,4), 100 mM NaCl, 7,5 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM EGTA). Inkubeeriti 45 minutit temperatuuril 30 °C.  $K_i=0,7$  nM,  $n_H=0,60\pm0,06$ ; %R<sub>H</sub>=64 $\pm$ 5; +GTP $\gamma$ S:  $K_i=1,4$  nM,  $n_H=0,64\pm0,07$ ; %R<sub>H</sub>=53 $\pm$ 6.